



Revista de Osteoporosis  
y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)  
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

[www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)





## Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)  
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

© Copyright 2024. SEIOMM y © ARÁN EDICIONES, S.L.

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.  
Publicación trimestral con 4 números al año

Esta publicación se encuentra incluida en Scopus, Web of Science, Scielo, DOAJ, ERIHPLUS, Redalyc, IBECs, Embase, Open J-Gate, Free Medical Journals, Sociedad Americana de Investigación Científica (SIIC), Google Academic, Medes, ÄZ3, e-revist@s, WorldCat, Latindex, EBSCO, Medic Latina, Dialnet, Safetylit, Mosby's, Emdex, Academic Keys, CRUE, Hinari, REDIB, Emerging Sources Citation Index, British Library y ROAD.  
Factor de impacto (JCR 2023): 0,8 / Q4

La *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* es una revista *open access*, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de *open access*.

Esta revista se publica bajo licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas.

ISSN (versión papel): 1889-836X. ISSN: (versión electrónica): 2173-2345  
Depósito Legal: M-8158-2023

ARÁN EDICIONES, S.L.

C/ Orense, 11, 4.º - 28020 Madrid - Tel. 91 782 00 30 - Fax: 91 561 57 87  
e-mail: [osteoporosis@grupoaran.com](mailto:osteoporosis@grupoaran.com)  
[www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com](http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com)  
[www.grupoaran.com](http://www.grupoaran.com)



## Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)  
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

### DIRECTORAS

**Dra. Arancha Rodríguez de Gortázar  
(Co-directora)**

Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Facultad de Medicina. Universidad San Pablo CEU. Madrid (España)

Correo electrónico: [argortazar@ceu.es](mailto:argortazar@ceu.es)

**Dra. Marta Martín Millán  
(Co-directora)**

Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Santander (España)

Correo electrónico: [marta.martinm@scsalud.es](mailto:marta.martinm@scsalud.es)

### COMITÉ EDITORIAL

**Dra. Teresita Bellido**

Directora del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas. Departamento de Medicina. División de Endocrinología y Metabolismo y Departamento de Ortopedia.

Investigadora en el Sistema de Atención Médica de Veteranos de Arkansas Central-John L. McClellan Memorial Hospital. Little Rock, Arkansas (Estados Unidos)

Correo electrónico: [tmbellido@uams.edu](mailto:tmbellido@uams.edu)

**Dr. Jesús Delgado Calle**

Department of Physiology and Cell Biology. University of Arkansas for Medical Sciences. Little Rock, Arkansas (EE. UU.)

Correo electrónico: [JDelgadocalle@uams.edu](mailto:JDelgadocalle@uams.edu)

**Dr. Manuel Díaz Curiel**

Ex-Director de la Cátedra de Enfermedades Metabólicas Óseas. Universidad Autónoma Madrid. Consultor de Enfermedades Metabólicas Óseas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Presidente Honorífico de la Fundación Hispánica de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (FHOEMO) (España)

Correo electrónico: [mdcuriel@fjd.es](mailto:mdcuriel@fjd.es)

**Dr. Adolfo Díez Pérez**

Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM) y Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona.

CIBER en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Instituto Carlos III. Barcelona (España)

Correo electrónico: [Adiez@parcdosalutmar.cat](mailto:Adiez@parcdosalutmar.cat)

**Dr. Luis Fernández de Castro**

Skeletal Disorders and Mineral Homeostasis Section. National Institutes of Dental and Craniofacial Research. Bethesda, Maryland (EE. UU.)

Correo electrónico: [luis.fernandezdecastrodiaz@nih.gov](mailto:luis.fernandezdecastrodiaz@nih.gov)

**Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero**

Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Sevilla (España). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: [mjgtr@us.es](mailto:mjgtr@us.es)

**Dr. Oswaldo Daniel Messina**

Jefe de Reumatología. Hospital Argerich de Buenos Aires (Argentina). Profesor Asociado de Reumatología y Director de la carrera de postgrado en Reumatología.

Universidad de Buenos Aires (Argentina). Director Médico de Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas de Buenos Aires (IRO SRL) (Argentina). Miembro del Board y del Comité de Asesores Científicos de la International Osteoporosis Foundation (IOF)

Correo electrónico: [drosvaldodanielmessina@gmail.com](mailto:drosvaldodanielmessina@gmail.com)

**Dr. Manuel Naves Díaz**

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). REDinREN del ISCIII. Universidad de Oviedo. Oviedo (España)

Correo electrónico: [mnaves.huca@gmail.com](mailto:mnaves.huca@gmail.com)

**Dra. Lilian I. Plotkin**

Departamento de Anatomía y Biología Celular y Centro de Indiana para la Salud Musculoesquelética. Facultad de Medicina. Universidad de Indiana. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)

Correo electrónico: [lplotkin@iupui.edu](mailto:lplotkin@iupui.edu)

**Dr. José Antonio Riancho Moral**

Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

Correo electrónico: [rianchoj@unican.es](mailto:rianchoj@unican.es)

**Dr. Manuel Sosa Henríquez**

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Unidad Metabólica ósea. Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: [manuel.sosa@ulpgc.es](mailto:manuel.sosa@ulpgc.es)



Revista de Osteoporosis  
y Metabolismo Mineral

---



**JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y DEL METABOLISMO MINERAL**

---

**Presidente**

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

**Vicepresidente**

Mercedes Giner García

**Secretaría**

Marta Martín Millán

**Tesorero**

Manel Ciria Recasens

**Vocales**

Enric Duaso Magaña  
María Pilar Aguado Acín

---

## Sumario

Vol. 16 ■ Octubre-Diciembre ■ N.º 4

### Originales

#### La regulación del fosfato y su asociación con alteraciones en el metabolismo óseo y mineral

*M. Rodríguez García, C. Gómez Alonso, N. Avello Llano, C. García Gil-Albert, L. Sobrino Díaz, L. Naves Mendivil, J. Montero Muñoz, C. Palomo Antequera, M. Naves Díaz* ..... 113

#### The activation of the purinergic system modulates the formation of foreign body giant cells in the presence of different metal alloys for clinical use

*J. J. Aguilera-Correa, M. Marco-Bonilla, E. Torrecilla-Sábada, A. Conde, M. Á. Arenas, J. J. de Damborenea, R. Largo, G. Herrero-Beaumont, J. Esteban, A. Mediero* ..... 123

#### Efecto de los niveles deficientes de vitamina D sobre la actividad motora y la salud vascular en ratones de ambos sexos

*J. Martín Virgala, P. Sosa Calleja, S. Fernández Villabrille, B. Martín Carro, L. Naves Mendivil, N. González García, C. Alonso Montes, S. Panizo García, N. Carrillo López, M. P. Ruiz Torres, A. Dusso, M. Naves Díaz* ..... 133

#### Proteómica aplicada al estudio de la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica

*C. Quirós-Caso, N. Carrillo-López, J. L. Fernández-Martín, C. Alonso-Montes, J. B. Cannata-Andía* ..... 140

### Artículo Especial

#### Diálogos entre investigadores básicos y clínicos: hiperfosfatemia

*M. Rodríguez García, M. Naves Díaz* ..... 149

#### Imagen de portada:

Radiografía simple de mano que muestra alteraciones esqueléticas de artritis reumatoide evolucionada: osteoporosis yuxtaarticular y difusa, colapso articular, erosiones subcondrales y luxaciones.

*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander*

## Original

# La regulación del fosfato y su asociación con alteraciones en el metabolismo óseo y mineral

Minerva Rodríguez García<sup>1,6</sup>, Carlos Gómez Alonso<sup>2,6</sup>, Noelia Avello Llano<sup>3</sup>, Carmen García Gil-Albert<sup>3</sup>, Lucía Sobrino Díaz<sup>1</sup>, Laura Naves Mendivil<sup>2</sup>, Javier Montero Muñoz<sup>4</sup>, Carmen Palomo Antequera<sup>5</sup>, Manuel Naves Díaz<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Área Gestión Clínica de Nefrología. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. <sup>2</sup>Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. <sup>3</sup>Laboratorio de Medicina. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>4</sup>Servicio de Geriátrica. Hospital Monte Naranco. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. <sup>5</sup>Área de Gestión Clínica de Medicina Interna. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. <sup>6</sup>RICORS2040 (RD21/0005/0019)

## Resumen

**Introducción y objetivo:** aunque un elevado fosfato sérico se ha relacionado con fractura y calcificación aórtica se desconoce si existe alguna asociación del fosfato urinario con la incidencia de fractura osteoporótica y calcificación aórtica.

**Material y métodos:** 141 mujeres posmenopáusicas > 50 años realizaron radiología dorso-lumbar que se repitió 4 años después, determinando marcadores bioquímicos en sangre y orina fresca; se recogieron parámetros clínicos y antropométricos y se confirmó radiográficamente la aparición de nuevas fracturas vertebrales y no vertebrales. Radiográficamente se evaluó la aparición de nuevas calcificaciones aórticas. Se excluyeron mujeres con tratamiento estrogénico y antirresortivo > 3 meses.

**Resultados:** se detectaron 11 nuevas fracturas no vertebrales (7 de Colles, 2 de cadera y 2 en otras localizaciones) y 10 fracturas vertebrales incidentes confirmadas radiográficamente. En las mujeres con fractura incidente se observaron niveles significativamente menores de índice de masa corporal, fosfatúria, creatinuria y filtrado glomerular estimado (FGe), mientras que la edad fue significativamente mayor. Incrementos de 10 mg/dL de fosfatúria se asociaron con 29 % menos fracturas incidentes [OR = 0,71; IC 95 % = (0,46-0,98)], tras regresión logística ajustada por edad, índice de masa corporal, creatinuria y FGe. Este efecto fue más marcado con las fracturas incidentes no vertebrales [OR = 0,50; IC 95 % = (0,10-0,91)], mientras que en vertebrales se perdió esta asociación [OR = 0,83; IC 95 % = (0,54-1,14)]. El 17 % de la cohorte tuvo nuevas calcificaciones aórticas. A nivel multivariante incrementos de 10 mg/dL de fosfatúria se asociaron con menor incidencia de calcificación aórtica [OR = 0,80; IC 95 % = (0,64-0,97)].

**Conclusiones:** fosfatúrias bajas parecen asociarse con mayor incidencia de fractura osteoporótica y calcificación aórtica en mujeres. La fosfatúria podría ser un indicador de los efectos hormonales y renales en la regulación del fosfato y utilizarse como factor del riesgo de fractura y calcificación aórtica.

### Palabras clave:

Fosfatúria.  
Calcificación aórtica abdominal.  
Fractura osteoporótica.

Recibido: 05/07/2024 • Aceptado: 21/10/2024

Financiación: este artículo original ha sido financiado con una beca de investigación FEIOMM 2023 cuya investigadora principal es Minerva Rodríguez García.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Rodríguez García M, Gómez Alonso C, Avello Llano N, García Gil-Albert C, Sobrino Díaz L, Naves Mendivil L, Montero Muñoz J, Palomo Antequera C, Naves Díaz M. La regulación del fosfato y su asociación con alteraciones en el metabolismo óseo y mineral. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(4):113-122

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00051

### Correspondencia:

Manuel Naves Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Avenida de Roma, s/n. 33011 Oviedo  
e-mail: mnaves.huca@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Las fracturas por fragilidad ósea constituyen un importante problema sanitario y económico para los sistemas de salud pública (1) y se han relacionado con alta morbilidad y mortalidad en la población general.

Cada vez hay más evidencias de que los niveles elevados de fosfato se relacionan con un incremento del riesgo de fractura (2,3). De hecho, 2 grandes estudios de cohortes poblacionales, el de Rotterdam y los estudios de fracturas osteoporóticas en hombres (MrOS), informaron que el aumento de fosfato sérico se asoció con riesgo de fractura en participantes sin enfermedad renal crónica (3). Recientemente, en población en diálisis de ambos sexos se ha observado este mismo efecto, sugiriendo que la reducción del fosfato sérico podría prevenir la aparición de fracturas (4). De hecho, un estudio observacional de 13 427 pacientes en diálisis mostró que los pacientes no tratados con captadores de fosfato presentaron un 20 % más de riesgo de fractura que los tratados (5). Estos hallazgos están respaldados por la evidencia obtenida de modelos animales en los que el aumento de fosfato en la dieta produce fragilidad ósea, incluso aunque las concentraciones circulantes de fosfato se mantengan dentro del rango de la normalidad (6).

Desde hace tiempo se viene afirmando la asociación directa que existe entre el deterioro del tejido óseo y el desarrollo de la calcificación arterial (7,8). El papel del fosfato sobre el desarrollo y progresión de la calcificación arterial es bien conocido en presencia de una función renal comprometida (9), pero también en la población general (10).

Como es bien sabido, la fractura por fragilidad se asocia al envejecimiento, pero es en las mujeres donde la fractura es más frecuente. Uno de los principales factores que se ha atribuido a esta diferencia por sexos es la deprivación estrogénica que ocurre en la mujer tras la menopausia y que va a condicionar una pérdida acelerada de tejido óseo, lo que en última instancia conducirá a una mayor susceptibilidad a la fractura por fragilidad (11). Pero también la enfermedad cardiovascular y su manifestación clínica con la aparición de la calcificación arterial en la mujer empiezan a manifestarse con la menopausia y la pérdida de estrógenos (12).

Las mujeres posmenopáusicas con depleción de estrógenos exhiben hiperfosfatemia que es secundaria a un incremento en la reabsorción del túbulo proximal de fosfato (13), sin embargo, no hay estudios que hayan analizado si existe alguna asociación entre los niveles urinarios de fosfato y la presencia de fracturas y/o calcificaciones arteriales. Por tanto, el objetivo de este estudio fue valorar el efecto del fosfato urinario sobre la incidencia de fractura osteoporótica y calcificación aórtica en mujeres de la población general.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron aleatoriamente del registro municipal de Oviedo 316 mujeres mayores de 50 años. El protocolo al que hace referencia este estudio consistió en la cumplimentación de un cuestionario sobre factores de riesgo relacionados con osteoporosis, 2 radiografías laterales dorso-lumbares, un estudio densitométrico en columna lumbar y cadera, recogida de mediciones antropométricas como altura y peso para determinar el índice de masa corporal (IMC), historia ginecológica y de medicación. Todos los sujetos tenían suficiente capacidad ambulatoria para subir 2 pisos sin ascensor y el 99 % vivía en su propio domicilio.

A los 4 años se les invitó a repetir el estudio radiológico, densitométrico y las mediciones antropométricas, un cuestionario sobre factores de riesgo de osteoporosis y un estudio bioquímico. En el segundo control participaron 213 mujeres, de las que 168 estuvieron de acuerdo en realizar el estudio bioquímico. Un total de 18 mujeres se excluyeron del análisis por haber recibido tratamiento osteoporótico o estrogénico y otras 9 por estar aún con periodos. Se dispuso de todos los datos al inicio y a los 4 años en 141 mujeres.

## INCIDENCIA DE FRACTURA OSTEOPORÓTICA

Para el diagnóstico de nuevas fracturas vertebrales se compararon las radiografías del estudio prospectivo con las radiografías basales por 2 lectores independientes que hicieron una evaluación radiológica cualitativa sin conocer las condiciones clínicas de los sujetos evaluados. Se definió como nueva fractura o fractura incidente la existencia de una reducción, evidente a la inspección visual, de cualquiera de las alturas de la vértebra y cuerpo vertebral respecto a la radiografía del primer estudio transversal siguiendo el método de Genant (14). En caso de no existir coincidencia de los 2 lectores se definió la fractura por consenso tras una revisión conjunta. La reproducibilidad interobservador (coeficiente kappa de Cohen) de los 2 lectores al definir fractura incidente fue de 0,82, cifra que indica una buena reproducibilidad. Todas las fracturas osteoporóticas no vertebrales, excluidas las de cráneo y extremidades, fueron confirmadas mediante radiografía.

## EVALUACIÓN DE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR INCIDENTE

La presencia de una nueva calcificación aórtica se determinó comparando las radiografías del inicio con las realizadas 4 años más tarde.

La calcificación aórtica abdominal fue evaluada por 2 investigadores independientes y se definió y clasificó en grado 0 (ausente), grado 1 (leve-moderada) y grado 2 (severa). Calcificaciones aisladas puntiformes, una calcificación lineal visible en menos de 2 cuerpos vertebrales o una placa densa calcificada se definió como calcificación leve-moderada (15). La presencia de una calcificación lineal visible a lo largo de al menos 2 cuerpos vertebrales y/o la presencia de dos o más placas densas calcificadas se definió como calcificación severa. La reproducibilidad intra e interobservador (coeficiente kappa de Cohen) en el análisis de las radiografías para definir calcificación aórtica incidente fue de 0,78 y 0,73, datos que indican una buena reproducibilidad (15).

## EVALUACIÓN DENSITOMÉTRICA

La densidad mineral ósea (DMO) se midió con un densitómetro Hologic® QDR-1000 DXA (Hologic Inc., Waltham, MA). En todos los casos se analizaron la columna lumbar antero-posterior (L2-L4) y la densidad de fémur derecho. Los coeficientes de variación (CV) fueron de 1,2 % y 1,9 % respectivamente (15). El control de precisión y calidad fue realizado diariamente con un Phantom de columna lumbar, con el que se obtuvo un CV de  $0,0 \pm 0,1$  %. En el cuarto año se determinó la DMO en las mismas áreas utilizadas en el primer estudio, el porcentaje de cambio entre ambas mediciones fue utilizado para evaluar los cambios en DMO.

## ANÁLISIS BIOQUÍMICO

En el estudio basal no se realizó estudio bioquímico. A los 4 años, se tomó una muestra de sangre y orina fresca en ayunas a cada sujeto participante en el estudio. Una vez separado el suero, este último y la orina, se mantuvieron congeladas a  $-80$  °C hasta su cuantificación. En suero se midió entre otros creatinina, filtrado glomerular estimado, calcio, fósforo, albúmina, fosfatasa alcalina total, fosfatasa ácida y fosfatasa ácido tartrato resistente. En orina se determinaron entre otros creatinina, fósforo y calcio. Tanto en suero como en orina se utilizó un autoanalizador (Hitachi Mod. 717, Ratigen, Alemania).

Los niveles séricos de calcidiol (25OHD) se determinaron mediante extracción previa con acetonitrilo (IDS, Ltd., Bolton, Reino Unido), cuyos coeficientes de variación (CV) intra e interensayo fueron respectivamente del 5,2 % y del 8,2 %. Los niveles de 1,25-dihidroxi-vitamina D se midieron por radioinmunoensayo (IDS, Ltd.); los CV intra e interensayo fueron 6,5 % y 9 %, respectivamente. Los niveles PTH intacta se midieron por radioinmunoensayo (Instituto Nichols, San Juan de Capistrano, CA); los valores de CV intra e interensayo fueron 2,6 % y 5,8 %.

Todos los estudios realizados siguieron los principios enunciados en la declaración de Helsinki y fueron formalmente aprobados por el Comité de Ensayos Clínicos del Principado de Asturias.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la versión 17.0 de SPSS para Windows. Las variables cuantitativas se analizaron mediante t de Student. Las variables cualitativas se analizaron mediante chi cuadrado. Se realizaron correlaciones de Pearson entre variables cuantitativas.

Para analizar, a nivel multivariante, el efecto de la fosfaturia posee sobre la incidencia fractura osteoporótica vertebral y no vertebral, así como de la incidencia de calcificación aórtica se utilizó regresión logística ajustada por las variables que en el modelo univariante hubieran resultado estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

En el período de 4 años de seguimiento se detectaron 11 nuevas fracturas no vertebrales (7 de Colles, 2 de cadera y 2 en otras localizaciones) y 10 fracturas vertebrales incidentes. Todas las fracturas fueron confirmadas radiográficamente.

La tabla I recoge las variables demográficas, antropométricas y bioquímicas a los 4 años del inicio del estudio en mujeres con fractura incidente vertebral y no vertebral. En las mujeres con fractura incidente se observaron niveles significativamente menores de IMC, fosfaturia, creatinuria y filtrado glomerular estimado (FGe), mientras que la edad fue significativamente mayor.

Teniendo en cuenta que las mujeres con fractura incidente se asocian con niveles más bajos y significativos de la fosfaturia a nivel univariante, se llevó a cabo un modelo de regresión logística utilizando como variable dependiente la fractura osteoporótica incidente y como variable independiente la fosfaturia ajustada por edad, IMC, creatinuria y FGe. Incrementos de 10 mg/dL de fosfaturia se asocian con 29 % menos fracturas incidentes [*odds ratio* (OR) = 0,71; Intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %) = (0,46-0,98)].

En la tabla II se recogen las variables demográficas, antropométricas y bioquímicas a los 4 años del inicio del estudio separándolas en mujeres con y sin fractura no vertebral incidente. En mujeres fracturadas se observaron niveles significativamente menores de IMC, fosfaturia y creatinuria.



**Tabla I.** Variables demográficas, antropométricas y marcadores séricos y urinarios generales y del metabolismo óseo y mineral en mujeres con y sin fracturas incidentes vertebrales y no vertebrales

Variables	Fracturados (n = 17)	No fracturados (n = 124)	Valor de p
Edad (años)	67,8 ± 8,1	63,6 ± 7,9	0,044
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,2 ± 2,4	29,0 ± 4,7	0,001
Creatinina (mg/dL)	0,95 ± 0,19	0,92 ± 0,11	0,481
Filtrado glomerular estimado (FGe) (mL/min)	52,9 ± 10,9	66,8 ± 16,9	< 0,001
Fósforo sérico (mg/dL)	3,51 ± 0,47	3,62 ± 0,41	0,304
Calcio sérico (mg/dL)	9,34 ± 0,16	9,40 ± 0,33	0,181
Calcidiol (ng/mL)	14,3 ± 7,2	14,9 ± 8,9	0,774
Calcitriol (pg/mL)	36,0 ± 10,1	38,1 ± 12,8	0,531
Fosfatasa alcalina total (U/L)	181 ± 59	186 ± 88	0,821
PTH (pg/mL)	63,7 ± 37,4	54,8 ± 21,4	0,360
Fosfatasa ácida (U/L)	2,79 ± 0,65	2,83 ± 0,92	0,839
Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR) (U/L)	2,26 ± 0,62	2,16 ± 0,70	0,567
Albúmina sérica (g/L)	44,6 ± 2,3	45,3 ± 2,1	0,228
Fósforo orina (mg/dL)	47,8 ± 15,0	73,8 ± 33,8	< 0,001
Calcio orina (mg/dL)	12,7 ± 6,4	14,1 ± 8,4	0,509
Creatinina orina (mg/dL)	63,6 ± 26,8	79,9 ± 37,6	0,034
Reabsorción tubular de fosfatos (RTP)	0,78 ± 0,08	0,76 ± 0,07	0,258

**Tabla II.** Variables demográficas, antropométricas y marcadores séricos y urinarios generales y del metabolismo óseo y mineral en mujeres con y sin fracturas incidentes no vertebrales

Variables	Fracturados (n = 9)	No fracturados (n = 132)	Valor de p
Edad (años)	67,3 ± 8,8	63,9 ± 7,9	0,214
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,7 ± 2,3	28,9 ± 4,6	0,033
Creatinina (mg/dL)	0,99 ± 0,22	0,92 ± 0,11	0,352
Filtrado glomerular estimado (FGe) (mL/min)	54,2 ± 12,3	66,0 ± 16,9	0,054
Fósforo sérico (mg/dL)	3,43 ± 0,42	3,62 ± 0,41	0,195
Calcio sérico (mg/dL)	9,32 ± 0,17	9,40 ± 0,33	0,500
Calcidiol (ng/mL)	14,0 ± 7,6	14,9 ± 8,8	0,780
Calcitriol (pg/mL)	38,0 ± 10,1	37,8 ± 12,7	0,972
Fosfatasa alcalina total (U/L)	166 ± 71	187 ± 85	0,465
PTH (pg/mL)	76,1 ± 48,7	54,5 ± 21,1	0,212
Fosfatasa ácida (U/L)	2,80 ± 0,79	2,83 ± 0,90	0,923
Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR) (U/L)	2,26 ± 0,72	2,16 ± 0,69	0,698
Albúmina sérica (g/L)	44,46 ± 18	45,3 ± 2,1	0,253
Fósforo orina (mg/dL)	42,2 ± 12,2	72,6 ± 33,3	< 0,001
Calcio orina (mg/dL)	11,7 ± 6,5	14,1 ± 8,3	0,396
Creatinina orina (mg/dL)	58,2 ± 19,1	79,3 ± 37,3	0,012
Reabsorción tubular de fosfatos (RTP)	0,78 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,345

El análisis de regresión logística ajustado por IMC y creatinuria mostró que incrementos de 10 mg/dL de fosfatúria se asociaron con 50 % menos fracturas incidentes [OR = 0,50; IC 95 % = (0,10-0,91)].

En la tabla III se recogen las variables demográficas, antropométricas y bioquímicas a los 4 años del inicio del estudio separándolas en mujeres con y sin fractura vertebral incidente. En mujeres fracturadas, se observaron niveles significativamente menores de fosfatúria y creatinuria. Sin embargo, en el análisis de regresión logística tras ajustar por creatinuria, la fosfatúria (incrementos de 10 mg/dL) no se asoció con la incidencia de fractura vertebral [OR = 0,83; IC 95 % = (0,54-1,14)].

A la vista de los resultados previos y considerando que existe un mayor efecto de la fosfatúria sobre la fractura no vertebral que sobre la vertebral, se analizaron los porcentajes de cambio en densidad mineral ósea a nivel lumbar y en cuello femoral entre los 2 cortes transversales. Ninguno de los 3 segmentos óseos analizados se correlacionó con la fosfatúria: columna lumbar:  $r = -0,077$ ,  $p = 0,431$ ; cuello femoral:  $r = -0,66$ ,  $p = 0,482$ ; cadera total:  $r = 0,028$ ,  $p = 0,764$ .

Sin embargo, cuando se analizaron las asociaciones del fosfato en la orina con la densidad mineral ósea en los tres segmentos analizados solo en el segundo corte transversal siguió sin encontrarse correlación entre DMO a nivel lumbar y fosfato en orina ( $r = 0,118$ ,  $p = 0,229$ ), pero sí que se encontró correlación entre DMO en cuello femoral y fosfato en orina ( $r = 0,239$ ,  $p = 0,004$ ) y entre DMO en cadera total y fosfato en orina ( $r = 0,232$ ,  $p = 0,006$ ) (Fig. 1).

Un total de 23 mujeres (17,1 %) desarrollaron nuevas calcificaciones aórticas en el periodo de seguimiento de 4 años. En la tabla IV se representan las variables demográficas, antropométricas y bioquímicas a los 4 años del inicio del estudio separándolas en mujeres con y sin calcificación aórtica considerando la presencia de una nueva calcificación que no apareciera en la radiografía a nivel basal. En mujeres con calcificación aórtica incidente se observaron niveles significativamente inferiores de albúmina sérica y fosfatúria. El análisis de regresión logística ajustado por albúmina sérica mostró que incrementos de 10 mg/dL de fosfatúria se asociaron con menor incidencia de calcificación aórtica [OR = 0,80; IC 95 % = (0,64-0,97)]. Destacó también que incrementos de 1 mg/dL de albúmina sérica disminuyó un 31 % la incidencia de calcificación aórtica [OR = 0,69; IC 95 % = (0,54-0,88)].

**Tabla III.** Variables demográficas, antropométricas y marcadores séricos y urinarios generales y del metabolismo óseo y mineral en mujeres con y sin fracturas incidentes vertebrales

Variables	Fracturados (n = 10)	No fracturados (n = 131)	Valor de p
Edad (años)	68,5 ± 7,2	63,8 ± 8,0	0,072
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,7 ± 2,5	28,9 ± 4,6	0,053
Creatinina (mg/dL)	0,90 ± 0,12	0,92 ± 0,12	0,586
Filtrado glomerular estimado (FGe) (mL/min)	53,0 ± 9,9	66,1 ± 17,0	0,007
Fósforo sérico (mg/dL)	3,63 ± 0,47	3,60 ± 0,41	0,829
Calcio sérico (mg/dL)	9,34 ± 0,15	9,40 ± 0,33	0,615
Calcidiol (ng/mL)	13,7 ± 7,1	14,9 ± 8,8	0,675
Calcitriol (pg/mL)	32,9 ± 10,2	38,2 ± 12,7	0,198
Fosfatasa alcalina total (U/L)	213 ± 47	184 ± 87	0,289
PTH (pg/mL)	57,9 ± 25,6	55,6 ± 23,9	0,771
Fosfatasa ácida (U/L)	2,87 ± 0,64	2,83 ± 0,91	0,879
Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR) (U/L)	2,35 ± 0,68	2,16 ± 0,69	0,398
Albúmina sérica (g/L)	44,7 ± 2,7	45,3 ± 2,1	0,407
Fósforo orina (mg/dL)	50,1 ± 16,5	71,8 ± 33,5	0,002
Calcio orina (mg/dL)	12,7 ± 6,2	14,0 ± 8,3	0,649
Creatinina orina (mg/dL)	65,7 ± 31,0	78,6 ± 37,1	0,286
Reabsorción tubular de fosfatos (RTP)	0,79 ± 0,08	0,76 ± 0,07	0,188

**Tabla IV.** Variables demográficas, antropométricas y marcadores séricos y urinarios generales y del metabolismo óseo y mineral en mujeres con y sin calcificaciones aórticas incidentes

Variables	Calcificación (n = 23)	No calcificación (n = 110)	Valor de p
Edad (años)	69,6 ± 6,1	68,0 ± 8,3	0,296
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29,7 ± 4,4	28,6 ± 4,6	0,314
Creatinina (mg/dL)	0,90 ± 0,11	0,93 ± 0,13	0,296
Filtrado glomerular estimado (FGe) (mL/min)	67,1 ± 14,6	65,0 ± 17,4	0,596
Fósforo sérico (mg/dL)	3,64 ± 0,48	3,61 ± 0,39	0,775
Calcio sérico (mg/dL)	9,34 ± 0,24	9,40 ± 0,33	0,390
Calcidiol (ng/mL)	14,6 ± 7,2	14,7 ± 8,6	0,976
Calcitriol (pg/mL)	40,3 ± 14,2	37,0 ± 11,3	0,223
Fosfatasa alcalina total (U/L)	214 ± 169	180 ± 55	0,347
PTH (pg/mL)	60,7 ± 27,0	55,1 ± 33,8	0,320
Fosfatasa ácida (U/L)	2,70 ± 0,89	2,87 ± 0,90	0,436
Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR) (U/L)	2,08 ± 0,82	2,19 ± 0,67	0,495
Albúmina sérica (g/L)	44,1 ± 2,3	45,5 ± 2,1	0,004
Fósforo orina (mg/dL)	59,1 ± 26,9	73,8 ± 34,5	0,047
Calcio orina (mg/dL)	13,0 ± 8,7	14,0 ± 8,2	0,591
Creatinina orina (mg/dL)	69,6 ± 35,0	80,2 ± 37,8	0,219
Reabsorción tubular de fosfatos (RTP)	0,78 ± 0,06	0,75 ± 0,07	0,148

## DISCUSIÓN

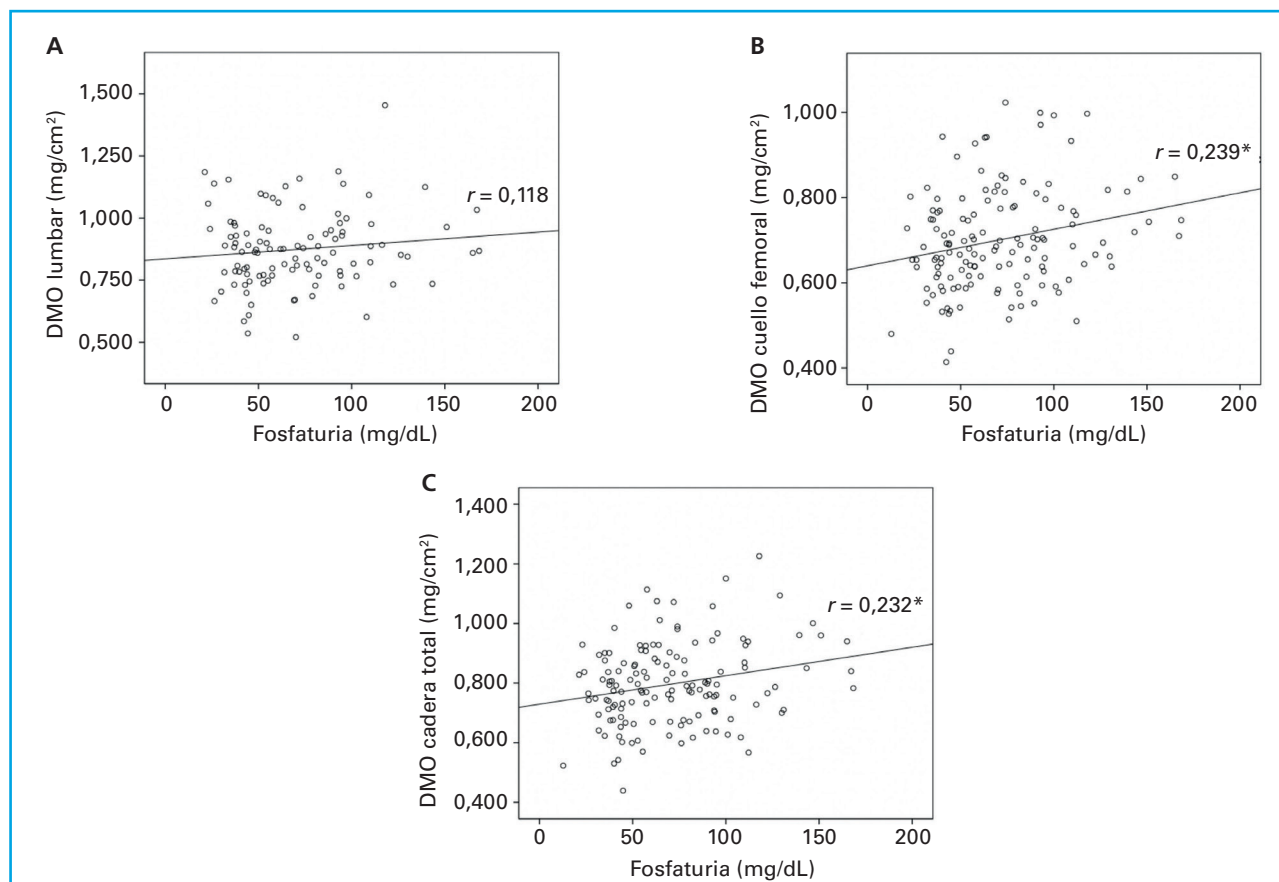
Los resultados de este trabajo muestran por vez primera en la literatura una asociación entre los descensos de fosfatasa y el aumento en la incidencia en fractura osteoporótica y calcificación aórtica. De hecho, incrementos de 10 mg/dL de fosfatasa en mujeres posmenopáusicas disminuyó en un 29 % la incidencia de fractura vertebral y no vertebral, efecto mucho más marcado en el caso de la fractura no vertebral, hueso con contenido más cortical, como lo demuestra la correlación significativa entre fosfatasa y DMO en cuello femoral y cadera total. Tal efecto no se observó con la DMO a nivel lumbar que posee un contenido más trabecular. Por otro lado, los aumentos de 10 mg/dL de fosfatasa en esta misma cohorte redujeron en un 20 % la incidencia de calcificación aórtica.

A nivel bioquímico, la PTH no ha sido capaz de explicar este efecto. Los niveles séricos de PTH se encontraron ligeramente, pero no significativamente, incrementados tanto en aquellas mujeres con fractura o con calcificación aórtica incidente. Este leve incremento debería en tal caso haber contribuido a un incremento en la excreción urinaria de fosfatos algo

que no solo no ocurrió, sino que incluso fue en sentido contrario.

Existen varios mecanismos que podrían explicar porque el fosfato podría afectar la calidad y resistencia ósea. En cuanto a la formación ósea, el fosfato inorgánico puede estimular varias moléculas reguladoras (antígeno 1 relacionado con fos, osteopontina, factor de crecimiento similar a la insulina I y esclerostina), que inhibirían Wnt/beta-catenina y la proliferación de osteoblastos (16,17). El fosfato inorgánico también afecta la resorción ósea al limitar la supervivencia y diferenciación de los osteoclastos, induciendo cambios en la expresión de RANKL, miR-223 y osteoprotegerina (18-22).

Sin embargo, en nuestro trabajo no se han observado niveles séricos superiores de fosfato en el grupo de mujeres fracturadas, siendo los niveles urinarios de fosfato los que sí han marcado las diferencias encontradas. El hecho de que en nuestro estudio no veamos en mujeres un efecto del fosfato sérico sobre la incidencia de fracturas ya ha sido descrito previamente en otros estudios epidemiológicos. Así, en un estudio en población envejecida, el decil superior (D10) de fosfato sérico en hombres tenía un 78 % mayor riesgo de fractura incidente (HR 1,78; IC 95 %, 1,25-2,54), aso-



**Figura 1.** Correlaciones entre fosfatúria y densidad mineral ósea (DMO) en el segundo corte transversal en columna lumbar (A); cuello femoral (B); cadera total (C). \* $p < 0,05$ .

ciación no encontrada en mujeres (HR 1,09; IC 95 %, 0,83-1,44) (2). Estos resultados son similares a los de otros estudios en los que la asociación entre niveles altos de fosfato sérico y las fracturas incidentes fueron sustancialmente superiores en hombres que en mujeres (3). La disparidad entre hombres y mujeres podría reflejar una diferencia en la sensibilidad a los niveles altos de fosfato sérico, no olvidando que en general las mujeres tienen niveles más altos de fosfato sérico que los hombres de una edad similar.

A diferencia de lo descrito por otros autores (23-25), no encontramos ningún tipo de asociación entre los niveles séricos de fosfato y la incidencia de calcificación aórtica.

Dado que a nivel bioquímico los principales reguladores del metabolismo del fósforo no nos permiten discernir porque hemos encontrado esta asociación del fosfato en orina con la incidencia de fractura y/o calcificación aórtica, debemos pensar en otro mecanismo regulador. En esta cohorte estudiada de mujeres posmenopáusicas existe un déficit de estrógenos. Se sabe que los estrógenos son un importante regulador fisiológico involucrado en la modulación funcional de varias hormonas, lo que indica que los mecanismos por

los cuales los estrógenos regulan el metabolismo mineral podrían ser complejos e implicar efectos directos y/o indirectos.

Debemos destacar el efecto hipofosfatémico e hiperfosfatúrico de los estrógenos en diferentes estudios clínicos. Varios estudios han observado que la administración de estrógenos en mujeres posmenopáusicas se asocia con hipofosfatemia que, en ciertos casos, es secundario a una reducción en la reabsorción de fosfato en el túbulo proximal (26-28), y a la regulación negativa de NaPi-IIa en el túbulo proximal (29). Por contra, los descensos de estrógenos llevan aparejado un incremento del fosfato sérico (hiperfosforemia) y un aumento de la reabsorción tubular de fosfatos en el túbulo proximal con un descenso de su eliminación en la orina (hipofosfatúria). Por tanto, en el contexto de estudios previos, estos datos sugieren que los estrógenos pueden inducir directa o indirectamente la fosfatúria en humanos (30).

Existen datos sólidos que indican que los estrógenos pueden ejercer un efecto rápido y no genómico en ciertos tejidos diana (31,32). Quedaría por determinar si estas vías contribuyen al efecto fosfatúrico de los estrógenos (33).

Después de la menopausia, el estrógeno principal de la edad reproductiva,  $17\beta$ -estradiol, disminuye notablemente y la estrona se convierte en el principal estrógeno en los tejidos y en la circulación. La estrona se produce a través de conversión de androstenediona suprarrenal por aromatasa, principalmente en tejido adiposo. La estrona aumenta casi 2 veces en la obesidad debido a su mayor aromatización en el tejido adiposo (34).

Los niveles séricos de  $17\beta$ -estradiol y estrona son más del doble en personas obesas en comparación con mujeres posmenopáusicas delgadas (35). Por tanto, podríamos hipotetizar la existencia de una producción de estrógenos por la grasa lo que podría contribuir a que aquellas mujeres con sobrepeso tengan una secreción extra de estrógenos que incrementa la fosfatúria a diferencia de lo que ocurre en la típica mujer osteoporótica que es delgada y frágil. De hecho, al analizar la incidencia de fractura vertebral y no vertebral en el análisis univariante, el IMC fue inferior significativamente en aquellas mujeres con fractura.

Es interesante y sorprendente el efecto de la fosfatúria sobre la incidencia de calcificación aórtica al igual que ocurre con la fractura incidente, pero no podemos soslayar que ambas alteraciones se asocian con la edad, lo que tal vez pueda estar relacionado con la posibilidad de que ante estímulos calcificantes las células de músculo liso vascular se desdiferencian en células tipo osteoblasto capaces de sintetizar marcadores osteogénicos (36). Resulta interesante destacar cómo los descensos en albúmina sérica contribuyen al incremento de la calcificación, algo descrito por otros autores (37).

No podemos descartar la existencia de limitaciones en este estudio. En primer lugar, no disponemos de los niveles séricos de estrógenos que pudieran indicar esas diferencias en la fosfatúria. En segundo lugar, no disponemos de los niveles séricos de FGF23 que podría aportarnos un valor añadido, pero cuando se realizó el estudio no disponíamos de este marcador sérico y desgraciadamente no hay muestra para poder realizarlo. En tercer lugar, la determinación de fosfatúria solo se realizó en el segundo corte transversal lo que limita las posibles asociaciones encontradas. Por último, no debemos olvidar que el tamaño muestral resulta bastante limitado.

No obstante, a pesar de reconocer las limitaciones, este estudio también presenta fortalezas como que es un estudio prospectivo con una participación en el seguimiento superior al 50 % en una época en la que en nuestro país no estábamos muy acostumbrados a estudios de tipo epidemiológico. El carácter prospectivo y no transversal del estudio refuerza la validez de los resultados encontrados y su mayor grado de asociación.

A modo de resumen podemos concluir que la existencia de fosfaturias bajas parece asociarse con mayor

incidencia de fractura osteoporótica y calcificación aórtica en mujeres posmenopáusicas. Sobre la fractura osteoporótica el efecto parece más marcado en el hueso con un mayor contenido cortical que trabecular. Si los niveles séricos de estrógenos contribuyen a este efecto es algo que deberá ser refrendado en estudios posteriores. A tenor de estos resultados, en mujeres de edad avanzada, la fosfatúria podría ser un indicador de los efectos hormonales y renales en la regulación del fosfato y utilizarse como otro factor del riesgo de fractura osteoporótica y de calcificación aórtica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Estudio Europeo sobre Osteoporosis Vertebral (EVOS), Unión Europea (1991–1993); Estudio Europeo Prospectivo sobre Osteoporosis (EPOS), Unión Europea (BIOMED 93-95), BMHI-CT 092-0182 (1993-1997); Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 94/1901-E); Retic REDinREN de ISCIII (RD06/0016/1013, RD12/0021/0023, RD16/0009/0017, RICORS2040 (RD21/0005/0019), Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Financiado por la Unión Europea – Next Generation EU”, Mecanismo para la Recuperación y la Resiliencia (MRR); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080; IDE/2024/000706); Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos* 2021;16:82. DOI: 10.1007/s11657-020-00871-9
2. Hussain SM, Seeman E, Schneider HG, Ebeling PR, Barker AL, Polkinghorne K, et al. Association of serum phosphate, calcium and alkaline phosphatase with risk of incident fractures in healthy older adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2024;109(12):e2188-e2195. DOI: 10.1210/clinem/dgae099
3. Campos-Obando N, Koek WNH, Hooker ER, van der Eerden BC, Pols HA, Hofman A, et al. Serum phosphate is associated with fracture risk: the Rotterdam Study and MrOS. *J Bone Miner Res* 2017;32(6):1182-93. DOI: 10.1002/jbmr.3094
4. Barrera-Baena P, Rodríguez-García M, Rodríguez-Rubio E, González-Llorente L, Ortiz A, Zoccali C, et al. Serum phosphate is associated with increased risk of bone fragility fractures in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2024;39:618-26. DOI: 10.1093/ndt/gfad190
5. Kwon YE, Choi HY, Kim S, Ryu DR, Oh HJ; ESRD Registry Committee of the Korean Society of Nephrology. Fracture risk in chronic kidney disease: a Korean population-based cohort study. *Kidney Res Clin Pract* 2019;38:220-8. DOI: 10.23876/j.krcp.18.0099
6. Roberts JL, Yu M, Viggewarapu M, Arnst JL, Pacifici R, Beck GR Jr. Dietary phosphorus consumption alters T cell populations,

- cytokine production, and bone volume in mice. *JCI Insight* 2023;8(10):e154729. DOI: 10.1172/jci.insight.154729
7. Szulc P, Blackwell T, Kiel DP, Schousboe JT, Cauley J, Hillier T, et al. Abdominal aortic calcification and risk of fracture among older women - The SOF study. *Bone* 2015;81:16-23. DOI: 10.1016/j.bone.2015.06.019
  8. Mazziotti G, Tupputi U, Ferrante G, Guglielmi G. Abdominal aortic calcification as a marker of relationship between atherosclerosis and skeletal fragility. *J Clin Densitom* 2020;23(4):539-42. DOI: 10.1016/j.jocd.2020.05.001
  9. Zhang R, Lu Y, Ye L, Yuan B, Yu S, Qin C, et al. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. *J Bone Miner Res* 2011;26:1047-56. DOI: 10.1002/jbmr.294
  10. Khurrani L, Møller JE, Lindholt JS, Urbonaviciene G, Steffensen FH, Lambrechtsen J, et al. Cross-sectional study of aortic valve calcification and cardiovascular risk factors in older Danish men. *Heart* 2021;107(19):1536-43. DOI: 10.1136/heartjnl-2021-319023
  11. Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41(3):475-86. DOI: 10.1016/j.ecl.2012.04.006
  12. Davezac M, Buscato M, Zahreddine R, Lacolley P, Henrion D, Lenfant F, et al. Estrogen receptor and vascular aging. *Front Aging* 2021;2:27380. DOI: 10.3389/fragi.2021.727380
  13. Adami S, Gatti D, Bertoldo F, Rossini M, Fratta-Pasini A, Zamberlan N, et al. The effects of menopause and estrogen replacement therapy on the renal handling of calcium. *Osteoporos Int* 1992;2(4):180-5. DOI: 10.1007/BF01623924
  14. Genant HK, Wu CY, Van Kujik C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 1993;8:1137-48. DOI: 10.1002/jbmr.5650080915
  15. Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-López JB, Gómez-Alonso C, Cannata-Andía JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int* 2008;19(8):1161-6. DOI: 10.1007/s00198-007-0539-1
  16. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Chihara K. IGF-I mediates the stimulatory effect of high phosphate concentration on osteoblastic cell proliferation. *J Cell Physiol* 2002;190:306-12. DOI: 10.1002/jcp.10067
  17. Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8352-7. DOI: 10.1073/pnas.140021997
  18. Gupta A, Guo XL, Alvarez UM, Hruska KA. Regulation of sodium-dependent phosphate transport in osteoclasts. *J Clin Invest* 1997;100:538-49. DOI: 10.1172/JCI119563
  19. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Kanzawa M, Chihara K. Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone resorbing activity. *J Cell Physiol* 2003;196:180-9. DOI: 10.1002/jcp.10270
  20. Koyama Y, Rittling SR, Tsuji K, Hino K, Salincarnboriboon R, Yano T, et al. Osteopontin deficiency suppresses high phosphate load-induced bone loss via specific modulation of osteoclasts. *Endocrinology* 2006;147:3040-9. DOI: 10.1210/en.2005-0671
  21. Yates AJ, Oreffo ROC, Mayor K, Mundy GR. Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1991;6:473-8. DOI: 10.1002/jbmr.5650060508
  22. M'Baya-Moutoula E, Louvet L, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:2202-12. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.08.003
  23. Linefsky JP, O'Brien KD, Katz R, de Boer IH, Barasch E, Jenny NS, et al. Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular health study. *J Am Coll Cardiol* 2011;58(3):291-7. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.11.073
  24. Linefsky JP, O'Brien KD, Sachs M, Katz R, Eng J, Michos ED, et al. Serum phosphate is associated with aortic valve calcification in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2014;233(2):331-7. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.051
  25. Kinugasa M, Mori S, Takaya T, Ito T, Tanaka H, Satomi-Kobayashi S, et al. Serum phosphate is an independent predictor of the total aortic calcification volume in non-hemodialysis patients undergoing cardiovascular surgery. *J Cardiol* 2016;68(4):308-15. DOI: 10.1016/j.jjcc.2015.10.005
  26. Citrin DL, Elson P, Kies MS, et al. Decreased serum phosphate levels after high-dose estrogens in metastatic prostate cancer. Possible implications. *Am J Med* 1984;76:787-93. DOI: 10.1016/0002-9343(84)90987-2
  27. Stock JL, Coderre JA, Mallette LE. Effects of a short course of estrogen on mineral metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:595-600. DOI: 10.1210/jcem-61-4-595
  28. Uemura H, Irahara M, Yoneda N, Yasui T, Genjida K, Miyamoto KI, et al. Close correlation between estrogen treatment and renal phosphate reabsorption capacity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1215-9. DOI: 10.1210/jcem.85.3.6456
  29. Farouqi S, Levi M, Soleimani M, Amlal H. Estrogen downregulates the proximal tubule type IIa sodium phosphate cotransporter causing phosphate wasting and hypophosphatemia. *Kidney Int* 2008;73(10):1141-50. DOI: 10.1038/ki.2008.33
  30. Meng J, Ohlsson C, Laughlin GA, Chonchol M, Wessel CL, Ljunggren O, et al. Sex hormones and serum phosphorus in older men: The Osteoporotic Fractures in Men (MrOs) Study. *Kidney Int* 2010;78(4):415-22. DOI: 10.1038/ki.2010.161
  31. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:904-10. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.191
  32. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16:70-84. DOI: 10.1210/mend.16.1.0758
  33. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833-42. DOI: 10.1210/me.2004-0486
  34. Qureshi R, Picon Ruiz M, Aurrekoetxea-Rodríguez I, Nunes de Paiva V, D'Amico M, Yoon H, et al. The major pre- and post-menopausal estrogens play opposing roles in obesity driven mammary inflammation and breast cancer development. *Cell Metabolism* 2020;31(6):1154-72. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.05.008
  35. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Brinton LA, Helzlsouer KJ, et al. Steroid hormone measurements from different types of assays in relation to body mass index and breast cancer risk in postmeno-

- pausal women: Reanalysis of eighteen prospective studies. *Steroids* 2015;99(Pt A):49-55. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.09.001
36. Fernández-Villabrille S, Martín-Carro B, Martín-Virgala J, Alonso-Montes C, Fernández-Fernández A, Martínez-Salgado C, et al. Phosphorus may induce phenotypic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells through the reduction of microRNA-145. *Nutrients* 2023;27;15(13):2918. DOI: 10.3390/nu15132918
37. Manolis AA, Manolis TA, Melita H, Mikhailidis DP, Manolis AS. Low serum albumin: A neglected predictor in patients with cardiovascular disease. *Eur J Intern Med* 2022;102:24-39. DOI: 10.1016/j.ejim.2022.05.004

## Original

# The activation of the purinergic system modulates the formation of foreign body giant cells in the presence of different metal alloys for clinical use

John Jairo Aguilera-Correa<sup>1,2</sup>, Miguel Marco-Bonilla<sup>3</sup>, Estíbaliz Torrecilla-Sábada<sup>1</sup>, Ana Conde<sup>2,4</sup>, María Ángeles Arenas<sup>2,4</sup>, Juan José de Damborenea<sup>2,4</sup>, Raquel Largo<sup>3</sup>, Gabriel Herrero-Beaumont<sup>3</sup>, Jaime Esteban<sup>1,2</sup>, Aránzazu Mediero<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Clinical Microbiology Department. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain. <sup>2</sup>CIBERINFEC - Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Infecciosas. Madrid, Spain. <sup>3</sup>Bone and Joint Research Unit. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain. <sup>4</sup>Department of Surface Engineering, Corrosion, and Durability. Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas - CENIM. CSIC. Madrid, Spain

## Abstract

**Objective:** two major complications after arthroplasty are prosthetic joint infection, mainly due to *Staphylococcus aureus*, and the experience of a foreign body reaction by macrophages and foreign body giant cells (FBGCs) regardless of the infection. Our aim is to study the role of purinergic receptors with fusogenic function (P2X7, adenosine A1 and A2A receptors) in the formation of *S. aureus*-induced FBGCs and their possible differential modulation in the presence of Ti-6Al-4V and Cr-Co-Mo alloys.

**Methods:** RAW264.7 cells were differentiated to FBGCs with 20 ng/mL of IL-4 in the presence of adhered unviable *S. aureus*, metal alloys and/or CGS21680/ZM241385 1  $\mu$ M. Cell supernatant was collected for nucleotide analysis by HPLC as well as cytokine expression, and cells were lysed for RNA expression.

**Results:** the presence of *S. aureus* induces an increase in FBGCs formation in a concentration-dependent manner. Furthermore, phalloidin staining demonstrated that both Ti-6Al-4V and Cr-Co-Mo alloys reduce the formation of FBGCs. The expression of adenosine A1 and A2A receptors increased after 5 days of differentiation in the presence of *S. aureus*, and this expression was enhanced with metal alloys. HPLC analyses showed an increase in adenosine in the presence of Ti-6Al-4V and Cr-Co-Mo alloys while ATP was not changed in any of the conditions. The presence of metal alloys induced an increased in IL1 $\beta$ , IL-6 and RANTES.

**Conclusions:** the increased levels of adenosine and the adenosine A2A receptor induced by the presence of Ti-6Al-4V and Cr-Co-Mo alloys would be responsible for the inhibition of cell fusion and the following reduction of *S. aureus*-induced FBGCs.

**Keywords:**  
Adenosine. A2A receptor. FBGCs. Metal alloys. Prosthetic joint infection.

Received: 08/08/2024 • Accepted: 14/11/2024

*Authors' contributions:* AM designed the experiments, performed experiments, analyzed and interpreted the results, drafted and revised the manuscript. JJA-C and ET-S were responsible of bacterial preparation and plate coating, interpreted the results, drafted and revised the manuscript. MM-B. performed HPLC analyses, interpreted the results, drafted and revised the manuscript. AC, MA, JJD supplied and prepared the samples of both alloys for the present study, edited and revised the manuscript, RL, GH-B and JE interpreted the results, edited and revised the manuscript.

*Data availability statement:* the original contributions presented in the study are included in the article/supplementary data; further inquiries can be directed to the corresponding author.

*Conflict of interest:* J. E. received travel grants from Pfizer and conference fees from bioMérieux and Heraeus. The funders had no role in the design of the study, the collection, analyses, or interpretation of data; the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The remaining authors declare no conflict of interest.

*Artificial intelligence:* the authors declare that they did not use artificial intelligence (AI) or any AI-based tools for the drafting of this article.

Aguilera-Correa JJ, Marco-Bonilla M, Torrecilla-Sábada E, Conde A, Arenas MÁ, de Damborenea JJ, Largo R, Herrero-Beaumont G, Esteban J, Mediero A. The activation of the purinergic system modulates the formation of foreign body giant cells in the presence of different metal alloys for clinical use. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2024;16(4):123-132

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00058

## Correspondence:

Aránzazu Mediero. Bone and Joint Research Unit. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid, Spain  
e-mail: aranzazu.mediero@quironsalud.es



## INTRODUCTION

---

Arthroplasty has improved the quality of life of millions of patients and is highly effective, although implant-related complications can arise (1). Prosthetic joint infection (PJI) is one of the most important complications with a high morbidity and mortality rates, and associated costs. The incidence of PJI varies across countries from 0.5 % up to 2 % (2). Staphylococci are the most common etiological agents associated with PJI, with *Staphylococcus aureus* (30–40 %) and *S. epidermidis* being 2 of the main microorganisms involved (3). PJI results from the ability of microorganisms to develop a biofilm, a conglomerate of bacterial cells of, at least, 1 species that adheres to a surface or interface with complex socio-microbiological interactions among them (4).

Immediately after implantation with and without a perioperative PJI, the implantation surface is coated with plasma proteins that direct cellular adhesion and activation. Last step in the prosthesis implantation process is a foreign body reaction, that occurs when the inflammatory and wound healing responses have occurred including macrophages and foreign body giant cells (FBGCs) (9). These FBGCs are present on the surface of the implants throughout the life of the implant and produce stress cracks and oxidative damage (7). These macrophages and FBGCs secrete cytokines that in the early stages will modulate neutrophils and lymphocytes recruitment and activation (8). IL-4 and IL-13, both secreted by CD4+ T cells, are key cytokines for the formation of FBGCs involved in material degradation and implant rejection (9). In each one of the 4 phases for cell fusion, similar and different mechanisms for the formation of FBGCs or osteoclasts (multinucleated bone cells with the function of resorbing bone) have been described (10). At the end of this process, adherent macrophages and FBGCs induce biomaterial degradation with ensuing clinical device failure (5). Therefore, it is still being studied whether different materials respond differently to FBGCs adherence and how this biomaterial surface can be modulated to alter the presence and activity of adherent macrophages and FBGCs (11).

Purinergic signalling is also activated in cell fusion, especially in inflammation. Pharmacologically, 2 families of purinergic receptors are known: P1 receptors selective for adenosine, and P2 receptors selective for purine and pyrimidine nucleotides and dinucleotides (11,12). Adenosine is generated extra- and intra-cellularly by the hydrolysis of adenine nucleotides and performs its physiological functions through the activation of G-protein coupled transmembrane receptors (A1, A2A, A2B and A3), whose tissue distribution, pharmacological profile and effects are different (12). Purine and pyrimidine nucleotides activate 2 types of P2 receptors: P2X receptors—ionotropic, ion-linked channels—and P2Y receptors—metabotropic, G pro-

tein-coupled (11). The role of several P1 and P2 receptors in bone cells is well-known. The adenosine A1 receptor is critical and essential for differentiation and function of osteoclasts (13), while the adenosine A2A receptor induces an inhibition of osteoclast formation and function both *in vitro* (18) and in the osteolysis model (16). The adenosine A2B receptor is involved in osteoblast differentiation and function, with a more ambiguous role for the A2A receptor (16,17). Activation of adenosine A2A receptor both directly (by specific agonist) or indirectly (by drugs that increase extracellular adenosine levels by blocking its transport) promotes bone formation at levels similar to BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) (17). Among P2 receptors, P2X7 is especially relevant as its expression is positively regulated by pro-inflammatory cytokines (18). The P2X7 receptor is activated and is involved in cell fusion, where it intervenes in the late phases of membrane fusion and establishes union bridges between the cytoplasm of adjacent cells (19).

In orthopaedic surgery and traumatology, the most widely used medical alloys are Ti–6Al–4V and Co–Cr–Mo. Ti–6Al–4V alloy has favorable biocompatibility, mechanical properties and corrosion resistance (20). Furthermore, Co–Cr–Mo alloy exhibits high biocompatibility levels, with exceptional properties including abrasion, cracking-corrosion, pitting and wear resistance, malleability, and a high fatigue resistance and ductility (21).

Surprisingly, we know nothing of the effect that the presence of bacteria, such as *S. aureus* may or may not have during the formation process of these FBGCs. Therefore, we aim to investigate if variations in the metal alloys of the implants would change the recruitment of macrophages to the implantation area and, therefore, the formation of FBGCs since they would modulate the cell fusion process. More specifically, we believe that a differential activation of the purinergic system may be involved, and especially the P2X7 receptor and adenosine A1 and A2A receptors, as they are involved in the fusion of macrophages to osteoclasts.

## METHODS

---

### MATERIALS

An 18-mm diameter bar of ELI grade Ti–6Al–4V manufactured to ASTM F136-02, was supplied by Surgical Co., SAU (Valencia, Spain). The rod was cut into 2 mm thick disc specimens and ground through successive grades of SiC paper up to 2000 grade. To achieve a smooth surface with a final controlled roughness, chemical-mechanical polishing was then carried out in a commercial colloidal silica suspension (OP-S Suspension. 0.25 µm from Struers, Copenhagen, Denmark) with hydrogen peroxide with a volume ratio of 9:1.

A rod of Co-Cr-Mo alloy with a diameter of 19 mm was supplied by Carpenter Technology Corp. (Philadelphia, PA, USA), which was melted and tested in accordance with ASTM F1537-11. The rod was cut into 2 mm thick discs. One side of each disc was ground on silicon carbide paper and polished to a 3  $\mu\text{m}$  diamond finish. The chemical composition of both alloys has been described elsewhere (22).

## CELL LINES

Immortal murine macrophage line RAW264.7 (ATCC, LGC Standards S.L.U., Barcelona, Spain) were used. Cell culture was maintained in alpha MEM with 10 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin and maintained in a humidified chamber at 37 °C, in 95 % air and 5 % CO<sub>2</sub>.

The *S. aureus* strain chosen was a small colony variant strain (Sa35) isolated from a total hip PJI of a 79 years-old woman identified in the Clinical Microbiology Department at the Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain). Several colonies of Sa35 grown on chocolate-blood agar were inoculated in an 8-mL tube of brain-heart infusion (BHI, BD, New Jersey, United States) at 37 °C for 24 h, then centrifuged at 3500 rpm at 22 °C for 10 min. The supernatant was removed, and the pellet was washed 3 times with sterile 0.9 % NaCl saline solution (SS) (B. Braun, Melsungen, Germany) and then resuspended and diluted in SS to get a bacterial solution (approximately,  $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^9$  CFU/mL). The bacterial solution was autoclaved at 121 °C for 20 min. Both types of alloy coupons were incubated in 5 mL of this 1:100-bacterial solution in a sterile nontreated six-well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37 °C for 24 h to allow bacterial adhesion. Afterwards, the supernatant was discarded, and the metal samples were used in the next described experiment.

## FOREIGN BODY GIANT CELLS (FBGCs) FORMATION

To determine the optimal conditions for infection by *S. aureus* in the RAW264.7 cells, proliferation (alamar blue, Bio-Rad, Madrid, Spain) was performed on the cells at 72 hours, in 3 different culture medias: a) alpha MEM with 10 % FBS without penicillin/streptomycin; b) RPMI with 5 % FBS without penicillin/streptomycin; and c) RPMI with 50 % bovine serum albumin (BSA) ( $n = 5$ ).

A total of 10,000 RAW264.7 cells were differentiated with 20 ng/mL of IL-4 in the presence of adhered unviable *S. aureus* ( $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$ ,  $10^6$  and  $10^5$ , CFU/mL) for 5 days for giant cell formation. In some of the wells the co-culture will be performed in the presence of the material of the 2 above-mentioned alloys: Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo, and other well will be incubated with selective adenosine A2A agonist (CGS21680) and an-

tagonist (ZM241385) 1  $\mu\text{M}$  each. Cells were stained using the quick panoptic stain (PanReac Applichem, ITW Reagents, Barcelona, Spain) a non-vital, differential stain based on the May Grünwald-Giemsa staining. To check FBGCs formation in the metal alloys, phalloidin staining was performed when RAW264.7 cells were differentiated with 20 ng/mL of IL-4 in the presence of adhered unviable *S. aureus* ( $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$  CFU/mL) for 5 days. Briefly, cells were fixed with 4 % PFA, blocked in PBS BSA 1 % and 0.1 % Triton X-100 for 30 minutes and stained Alexa Fluor 555-phalloidin (Invitrogen, Fisher Scientific, Madrid, Spain) for 30 minutes.

## NUCLEOTIDE CONCENTRATION DETERMINATION VIA HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

A total of 10,000 RAW264.7 cells were differentiated with 20 ng/mL of IL-4 in the presence of adhered unviable *S. aureus* ( $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$  CFU/mL) alone or in the presence of Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo for 3 or 5 days and supernatant were collected ( $n = 8$  each). Samples were treated with EHNA and dipyrindamole 1  $\mu\text{M}$  each to avoid adenosine degradation/cellular uptake. Protein denaturation and HPLC analysis were performed as described previously by Vivero-Lopez et al. (23). Briefly, a heat shock step was performed for 2 min at 98 °C, and samples were centrifuged at 13 000 g for 10 min at 4 °C. Supernatants were collected and stored at -80 °C until use. Inosine, adenosine, AMP, ADP and ATP concentrations were determined via high-performance liquid chromatography (HPLC) using a liquid chromatography with a reversed phase column (Agilent 1100 Series Liquid Chromatography) and a UV detector set at 254 nm. The buffer (0.1 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, 18 % acetonitrile) was run at 1.5 mL/min for 20 min. Compounds were identified and quantified by their retention times and peak areas of known standards, calibrated via spectrophotometry. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All results were corrected according to heat shock lost and calculated as a percentage of basal cells.

## CYTOKINE AND CHEMOKINE ARRAY

A total of 10,000 RAW264.7 cells were differentiated with 20 ng/mL of IL-4 in the presence of adhered unviable *S. aureus* ( $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$  CFU/mL) alone or in the presence of Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys for 5 days and supernatant were collected ( $n = 5-6$  each). Cytokines were measured using the Mouse Cytokine Array Q1 (QAM-CYT-1-4, RayBiotech, CliniSciences, Madrid, Spain) which, simultaneously, detects 20 cytokines. The cytokines concentration was measured by fluorescence using GenePix 4000B following the manufacturer's recommendations.

## RNA ISOLATION AND RT-PCR

Total RNA was isolated from cultures using TRIzol reagent based on the manufacturer's protocol. RNA (1 µg) was reverse transcribed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (2.5 U/µL), with RNase Inhibitor 1 U/µL, Random Hexamers 2.5 U/µL, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, PCR buffer II 1× and dNTPs 1 mM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relative analysis of gene expression was performed via real-time RT-PCR on a Step One Plus with Power UP SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems). The primers used are listed in table I. Gene expression levels were calculated with the  $\Delta\Delta C_t$  method.

**Table I.** List of primers used for RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
A2AR	TCGCCATCCGAATTCCACTC	TTGTGCCACAGATCTAGCC
A2BR	ATGGGCCAGATTAGGAGCAC	CTCCAAAAGGGGACCCAGTC
P2X7	GACAAACAAAGTCACCCGGAT	CGCTCACCAAAGCAAAGCTAAT
GAPDH	CTACACTGAGGACCAGGTTGTCT	GGTCTGGGATGAAATTGTG

## STATISTICAL ANALYSES

Statistical significance among groups was determined using one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. All statistics were calculated using GraphPad® software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

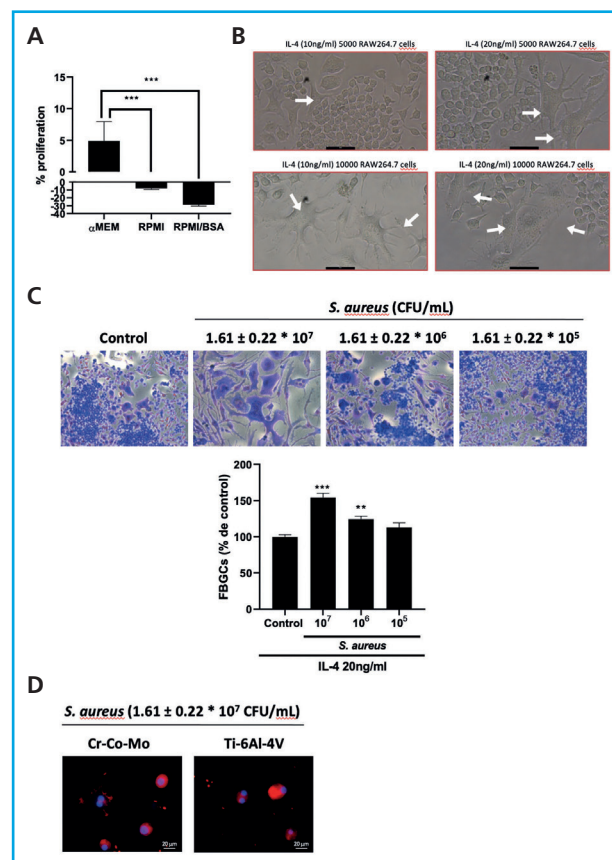
### THE PRESENCE OF ADHERED UNVIABLE *S. AUREUS* INDUCES AN INCREASE IN THE FORMATION OF FBGCs THAT IS ABROGATED IN THE PRESENCE OF METAL ALLOYS

To understand the role of *S. aureus* in the formation of FBGCs, we first tested the most suitable media for the growth of RAW264.7 cells and *S. aureus*. Figure 1A illustrates how RAW264.7 cells proliferated adequately when they were seeded in  $\alpha$ MEM medium with 10 % FBS and without antibiotics, while RPMI media with 5 % FBS but without antibiotics and RPMI with 50 % BSA, were not adequate for RAW264.7 cells proliferation. Afterwards, we tested the number of RAW264.7 cells and the concentration and IL-4 necessary for the correct differentiation of FBGCs. Figure 1B illustrates that the best formation of FBGCs was achieved with

10,000 RAW264.7 cells and 20 ng/mL of IL-4. Finally, we tested whether the presence of *S. aureus* modified FBGCs formation. We observed that the presence of *S. aureus* induced an increase in the formation of FBGCs in a concentration-dependent manner ( $54 \pm 6$  % increase for  $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$  CFU/mL,  $p < 0.0001$ ).

Therefore, we decided to conduct all experiments in  $\alpha$ MEM with 10 % FBS and without antibiotics, 10,000 RAW264.7 cells, 20 ng/mL of IL-4 and  $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$  CFU/mL.

When RAW264.7 cells and *S. aureus* were co-cultured in the presence of IL-4 and the metal alloys, immunofluorescence staining with phalloidin demonstrated that both Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys reduced the formation of FBGCs in the presence of  $1.61 \pm 0.22 \cdot 10^7$  CFU/mL *S. aureus* (Fig. 1D).



**Figure 1.** Adherent unviable *S. aureus* induces formation of FBGCs and presence of metal alloys inhibiting it. A. Optimal culture media condition determination. B. Determination of Raw264.7 cell number and IL-4 concentration optimal for culture. White arrows indicate the presence of giant cells. C. Panoptic staining representative images and quantification for FBGCs formation with adherent unviable *S. aureus*. D. Representative images for FBGCs formation with adherent unviable *S. aureus* in the presence of IL-4 and Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys. All images were taken at 40x magnification. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.0001$  and \*\* $p < 0.001$  to control. One-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

### S. AUREUS INDUCES THE SECRETION OF ADENOSINE INTO THE EXTRACELLULAR MEDIUM WHILE METAL ALLOYS Ti-6Al-4V AND CO-CR-MO INCREASE SUCH CONCENTRATION

The HPLC study of extracellular nucleotide concentrations reflected a significant increase in inosine in the presence of *S. aureus* on days 3 and 5 of differentiation with IL-4 20 ng/mL ( $p < 0.0001$ ,  $n = 8$ ), which were reduced significantly when co-culture was performed in the presence of Ti-6Al-4V alloy on days 3 and 5 of differentiation and in the presence of Co-Cr-Mo alloy at 5 days ( $p < 0.0001$ ,  $n = 8$ ) (Fig. 2A). Regarding extracellular concentrations of adenosine, we observed that no significant changes occurred in the presence of IL-4 20 ng/mL alone,

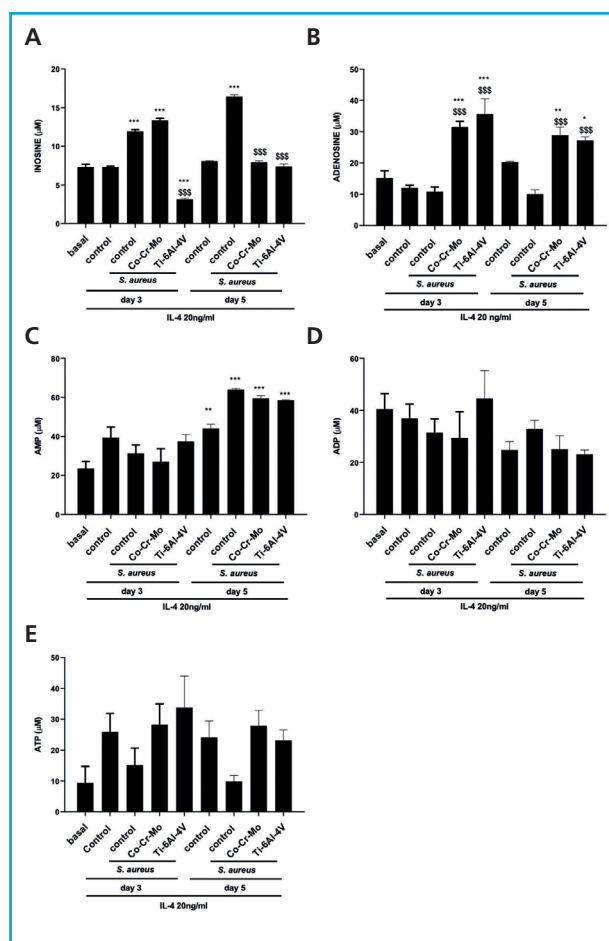
or *S. aureus* on days 3 or 5 of differentiation. However, both Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys induced a significant increase in extracellular adenosine levels vs both the basal and *S. aureus* at both time points ( $p < 0.0001$  vs *S. aureus*,  $n = 8$ ) (Fig. 2B). Extracellular levels of AMP increased significantly on day 5 of differentiation in all cases ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 8$ ) without significant differences between groups (Fig. 2C). No significant changes in the extracellular concentrations of ADP or ATP were found ( $p = ns$ ,  $n = 8$ ) (Fig. 2 D-E).

### ADENOSINE A1 AND A2A RECEPTORS AND P2X7 RECEPTORS EXPRESSION IS MODULATED BY S. AUREUS AND THE PRESENCE OF METAL ALLOYS

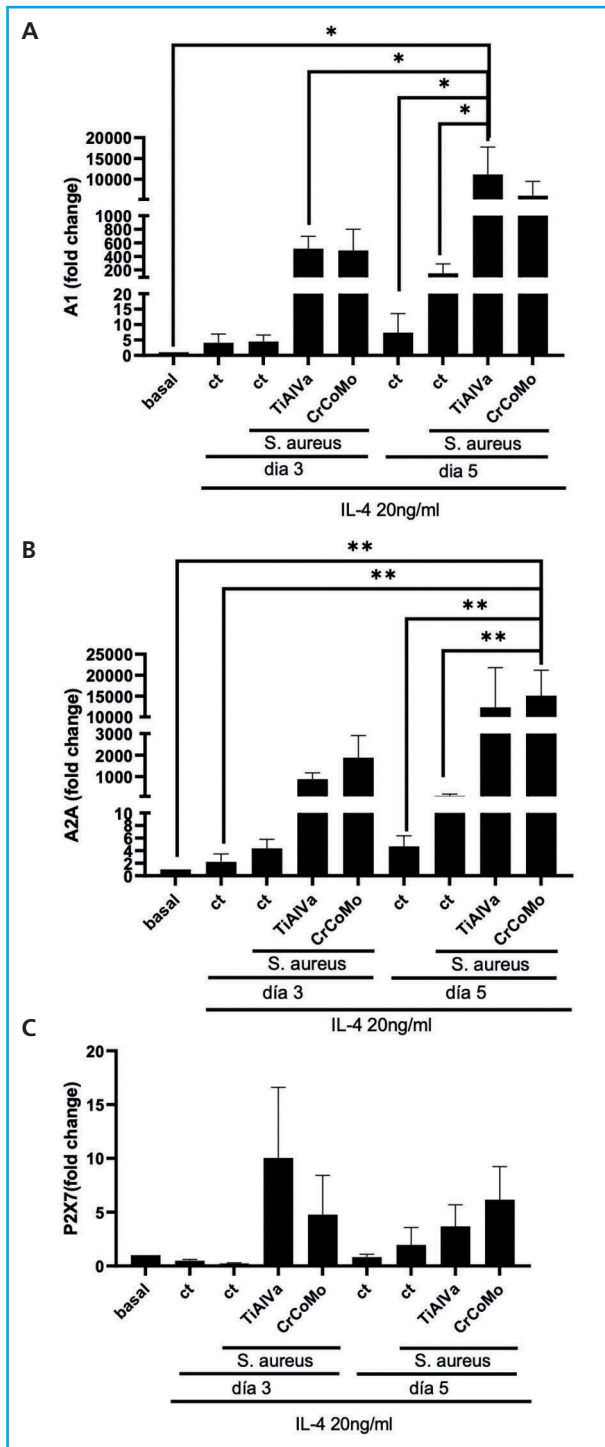
Following the increase in extracellular adenosine levels, we then tried to understand whether purinergic receptors involved in fusogenic functions (adenosine A1 and A2A receptors and P2X7 receptors) are also involved in the formation of FB-GCs in the presence of *S. aureus* and metal alloys. The expression of mRNA for adenosine A1 receptor in RAW264.7 cells increased at 3 and 5 days in the presence of 20 ng/mL IL-4 and was enhanced on day 5 of differentiation in the presence of *S. aureus* although this increase was not significant ( $p = ns$ ,  $n = 3-4$ ) (Fig. 3A). Although the Ti-6Al-4V alloy increased A1 receptor mRNA expression, this increase was significant on day 5 of differentiation ( $11120.6 \pm 6630$  fold change *S. aureus* + Ti-6Al-4V vs  $11.7 \pm 8.073$  fold change *S. aureus*,  $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ) (Fig. 3A). A similar trend was seen for the Cr-Co-Mo alloy, although in this case, the increased expression was not significant ( $p = ns$ ,  $n = 3-4$ ) (Fig. 3A).

A similar tendency was observed for adenosine A2A receptor in RAW264.7 cells. A2A receptor mRNA expression increased at 3 and 5 days in the presence of 20 ng/mL IL-4 and was enhanced on day 5 of differentiation in the presence of *S. aureus* although this increase was not significant ( $p = ns$ ,  $n = 3-4$ ) (Fig. 3B). Although the Ti-6Al-4V alloy increased A2A receptor mRNA expression, this increase was not significant ( $p = ns$ ,  $n = 3-4$ ). Furthermore, the Co-Cr-Mo alloy significantly increased A2A receptor mRNA expression on day 5 of differentiation ( $15114 \pm 6082$ -fold change *S. aureus* + Co-Cr-Mo vs  $8.17 \pm 2.95$ -fold change *S. aureus*,  $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ) (Fig. 3B).

The expression of the P2X7 ATP receptor does not increase significantly in the presence of IL-4 20 ng/mL, both on days 3 and 5 of differentiation. However, it does increase in the presence of *S. aureus*, with this increase being further enhanced by both metal alloys. Nevertheless, this increase was not found to be statistically significant ( $p = ns$ ,  $n = 3-4$ ) (Fig. 3C).



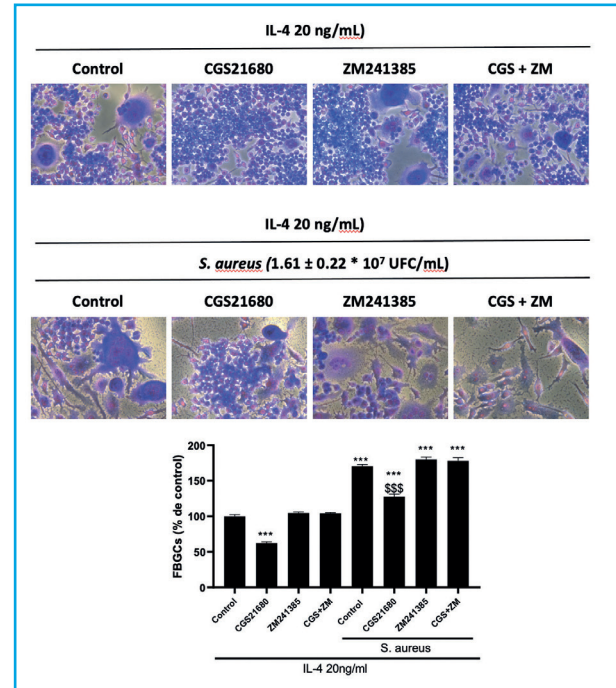
**Figure 2.** Nucleotide analysis via HPLC on days 3 and 5 of differentiation in the presence of adherent unviable *S. aureus* and metal alloys. A. Extracellular concentrations of inosine. B. Extracellular concentrations of adenosine. C. Extracellular concentrations of AMP. D. Extracellular concentrations of ADP. E. Extracellular concentrations of ATP. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.0001$  vs basal; \*\* $p < 0.001$  vs -basal; \$\$\$ $p < 0.0001$  vs *S. aureus*. One-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.



**Figure 3.** Purinergic receptor mRNA expression on days 3 and 5 of differentiation in the presence of adherent unviable *S. aureus* and metal alloys. A. mRNA expression for adenosine A1 receptor in the presence of adherent unviable *S. aureus* and Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys. B. mRNA expression for adenosine A2A receptor in the presence of adherent unviable *S. aureus* and Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys. C. mRNA expression for P2X7 receptor in the presence of adherent unviable *S. aureus* and Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . One-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

### ADENOSINE A2A RECEPTOR ACTIVATION INHIBITS *S. AUREUS*-INDUCED FBGC FORMATION

Incubation of RAW264.7 cells with the adenosine A2A receptor agonist CGS21680 1  $\mu$ M, inhibited FBGCs formation induced by IL-4 20 ng/mL (reduction of  $37.89 \pm 1.97$  % vs 100 % FBGCs in IL-4,  $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ ), being reversed in the presence of the A2A receptor antagonist ZM241385 1  $\mu$ M (Fig. 4). In the presence of *S. aureus*, there was an increased in FBGCs formation (increase of  $70.67 \pm 2.33$  % vs 100 % FBGCs in IL-4,  $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ ) as described above that was significantly reduced in the presence of CGS21680 1  $\mu$ M (decrease of  $43.17 \pm 3.7$  % vs IL-4 and *S. aureus*,  $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ ) which is also reversed in the presence of ZM241385 1  $\mu$ M (Fig. 4).



**Figure 4.** The formation of FBGCs in the presence of *S. aureus* is decreased by the adenosine A2A receptor agonist CGS21680. Panoptic staining representative images and quantification for FBGCs formation. RAW264.7 cells treated with IL-4 20 ng/mL and adenosine A2A receptor agonist CGS21680 1  $\mu$ M and antagonist ZM241385 1  $\mu$ M alone or in the presence of adherent unviable *S. aureus*. All images were taken at 40x magnification. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.0001$  vs control; SSS $p < 0.0001$  vs *S. aureus*. One-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

### *S. AUREUS* AND METAL ALLOYS SLIGHTLY CHANGE THE CYTOKINES PROLIFERATION SECRETION OF RAW264.7 CELLS

Afterwards, we tried to identify changes in cytokine secretion due to presence of *S. aureus* and metal al-

loys. For this purpose, we performed a cytokine array that measures 20 cytokines and chemokines (Table II). When we analyzed the expression of pro-inflammatory cytokines, we found that the presence of *S. aureus* only increased the expression of IL-6 and TNF $\alpha$  vs both with basal conditions and control conditions in the presence of IL-4 20 ng/mL ( $137.2 \pm 23.12$  pg/mL *S. aureus* vs  $2.28 \pm 1.23$  pg/mL IL-4 for IL-6; and  $781.1 \pm 289.9$  pg/mL *S. aureus* vs  $7.051 \pm 3.287$  pg/mL IL-4 for TNF $\alpha$ ,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.05$  respectively,  $n = 5-6$ ) (Table II). When RAW264.7 cells were differentiated in the presence of IL-4 20 ng/mL and the Co-Cr-Mo alloy, no differences in pro-inflammatory cytokines were observed vs control conditions in the presence of IL-4 20 ng/mL (Table II). However, when RAW264.7 cells were differentiated in the presence of *S. aureus* and the Co-Cr-Mo alloy, we observed a significant increase in IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression vs all conditions ( $336.6 \pm 139.5$  pg/mL *S. aureus* + Co-Cr-Mo vs  $22.98 \pm 10.5$  pg/mL *S. aureus* for IL-1 $\alpha$ ;  $114.5 \pm 23.21$  pg/mL *S. aureus* + Co-Cr-Mo vs  $2.636 \pm 1.895$  pg/mL *S. aureus* for IL-1 $\beta$ ; and  $925.9 \pm 283.621$  pg/mL *S. aureus* + Co-Cr-Mo vs  $137.2 \pm 23.12$  pg/mL *S. aureus* for IL-6,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$  respectively,  $n = 5-6$ ) (Table II). In a similar way, when RAW264.7 cells were differentiated in the presence of IL-4 20 ng/mL and the Ti-6Al-4V alloy, no differences in pro-inflammatory cytokines were observed vs control conditions in the presence of IL-4 20 ng/mL (Table II). Moreover, when RAW264.7 cells were differentiated in the presence of *S. aureus* and the Ti-6Al-4V alloy, we observed a significant increase in IL-1 $\beta$  and IL-6 expression when vs all conditions ( $209.5 \pm 52.88$  pg/mL *S. aureus* + Ti-6Al-4V vs  $2.636 \pm 1.895$  pg/mL *S. aureus* for IL-1 $\beta$ ; and  $3366 \pm 818.3$  pg/mL *S. aureus* + Ti-6Al-4V vs  $137.2 \pm 23.12$  pg/mL *S. aureus* for IL-6,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$  respectively,  $n = 5-6$ ) (Table II).

No changes were observed among conditions in any anti-inflammatory cytokine (Table II).

RANTES, a classical chemotactic cytokine also known as CCL5, was increased in the presence of *S. aureus* ( $528.3 \pm 66.47$  pg/mL *S. aureus* vs  $199.8 \pm 37.12$  pg/mL IL-4,  $p < 0.001$ ,  $n = 5-6$ ) and enhanced when co-culture was performed in the presence of metal alloys ( $609.6 \pm 81.64$  pg/mL *S. aureus* + Co-Cr-Mo vs  $528.3 \pm 66.47$  pg/mL *S. aureus* and  $994.4 \pm 185.4$  pg/mL *S. aureus* + Ti-6Al-4V vs  $528.3 \pm 66.47$  pg/mL *S. aureus*,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$  respectively,  $n = 5-6$ ) (Table II).

Finally, we found that the presence of IL-4 20 ng/mL induced an increased expression of VEGF ( $360.8 \pm 44.25$  pg/mL IL4 vs  $82.94 \pm 46.62$  pg/mL basal,  $p < 0.0001$ ,  $n = 5-6$ ) that was not significantly reduced in the presence of *S. aureus* but was significantly increased in the presence of both IL-4 and the Co-Cr-Mo alloy ( $669.3 \pm 144.5$  pg/mL Co-Cr-Mo vs  $82.94 \pm 46.62$  pg/mL basal,  $p < 0.0001$ ,  $n = 5-6$ ) (Table II).

## DISCUSSION

In this manuscript we have demonstrated that the presence of Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo alloys required purinergic system activation in macrophages to inhibit FBGCs formation induced by adhered unviable *S. aureus*.

As we can conclude from our data, adhered unviable *S. aureus* can form FBGCs although non-infectious activity. Although the use of non-viable *S. aureus* represents a limitation of our study, it is worth noting that during *S. aureus* biofilm formation bacterial lysis plays a key role (24), so this study may reveal what role these non-viable cells play in the development of FBGCs. *S. aureus* can attach to biotic surfaces through electrostatic and hydrophobic interactions under static conditions, even if it is not viable (25). These adhered unviable staphylococci which are not forming a biofilm will be detected by the Toll-like receptors and induce the phagocytic cell activation (26). Macrophage fusion to form a FBGC occurs in response to tissue injury and the presence of any biomaterial (7), whose physical features (ie, substrate stiffness, topography, and surface chemistry) will determine such response. Interestingly, this foreign body response is also regulated by Toll-like receptors (27). Our results illustrate that unviable *S. aureus* can induce the formation of FBGCs. Furthermore, it is plausible that the presence of metal alloys Ti-6Al-4V and Co-Cr-Mo would be necessary for the inhibition of that formation of FBGCs even in the presence of unviable *S. aureus*.

Fibrotic encapsulation emerged as a crucial tissue response to foreign objects inadvertently becoming lodged in the body. The immune capacity to successfully block access to the rest of the body by fibrotic encapsulation is pivotal since these foreign items pose numerous hazards, including the potential to spread infection (28). If fibrotic encapsulation were to take place on the *S. aureus*-infected implant, the infection foci would have access to fewer nutrients from the periprosthetic tissues. Hence, the inhibition of the development of FBGCs by those metal alloys may inhibit the fibrous encapsulation of these staphylococci-covered alloys (29), thus favoring the maintenance of the staphylococcal infection which would not have any fibrotic capsule impairing the arrival of nutrients into their immediate environment.

HPLC analysis showed increased adenosine extracellular levels induced by metal alloys that were not exert neither by IL-4 alone nor in combination with adhered unviable *S. aureus*. This adenosine increased correlates with the expression of adenosine receptors showed. Although both metal alloys increased in a similar manner adenosine levels, and both have the same trend in adenosine A1 and A2A receptors mRNA increased, Ti-6Al-4V only significantly increased mRNA levels for adenosine A1 receptor meanwhile Co-Cr-Mo only significantly induced adenosine A2A receptor.

Table II. Inflammatory cytokines level measured using the mouse cytokine array Q1

Cytokines (pg/mL)	Basal	Control	<i>S. aureus</i>	Cr-Co-Mo	<i>S. aureus</i> + CrCoMo	Ti-6Al-4V	<i>S. aureus</i> + Ti-6Al4V
<b>Pro-inflammatory</b>							
IFN $\gamma$	12.33 $\pm$ 9.696	12.54 $\pm$ 2.968	23.58 $\pm$ 14.54	31.18 $\pm$ 16.48	6.729 $\pm$ 3.414	15.01 $\pm$ 3.93	63.93 $\pm$ 30.65
IL-1 $\alpha$	0 $\pm$ 0	0.1422 $\pm$ 0.08105	22.98 $\pm$ 10.5	5.4793.424	336.6 $\pm$ 139.5*	83.27 $\pm$ 59.56	581.82 $\pm$ 281.9
IL-1 $\beta$	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2.636 $\pm$ 1.895	15.11 $\pm$ 5.793	114.5 $\pm$ 23.21***	26.07 $\pm$ 10.79	209.5 $\pm$ 52.88***
IL-2	0 $\pm$ 0	0.1456 $\pm$ 0.1018	0.4513 $\pm$ 0.289	0.3433 $\pm$ 0.2103	0.2461 $\pm$ 0.1813	0.1256 $\pm$ 0.08059	5.51 $\pm$ 3.437
IL-3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.0008575 $\pm$ 0.0008575	0 $\pm$ 0	0.0008473 $\pm$ 0.0008473	0.06079 $\pm$ 0.06079
L-6	0.08741 $\pm$ 0.08741	2.282 $\pm$ 1.226***	137.2 $\pm$ 23.12***	18.17 $\pm$ 8.755	925.9 $\pm$ 283.6***	62.05 $\pm$ 20.41	3366 $\pm$ 818.3***
IL-12	36.8 $\pm$ 27.04	22.1 $\pm$ 13.84	22.2 $\pm$ 22.2	53.17 $\pm$ 34.78	1.024 $\pm$ 0.9375	50.31 $\pm$ 34.34	57.24 $\pm$ 25.82
IL-17	18.81 $\pm$ 12.08	45.7 $\pm$ 21.8	49.75 $\pm$ 32.69	57.45 $\pm$ 32.05	36.84 $\pm$ 23.44	23.41 $\pm$ 15.74	44.41 $\pm$ 43.1
TNF $\alpha$	28.1 $\pm$ 10.07	7.051 $\pm$ 3.287	781.1 $\pm$ 289.9*	27.71 $\pm$ 19.72	638.8 $\pm$ 258.3	206.1 $\pm$ 108.9	839 $\pm$ 282.4
<b>Anti-inflammatory</b>							
IL-4	0 $\pm$ 0	990.3 $\pm$ 417.9	839.1 $\pm$ 313.3	1243 $\pm$ 553.6	1043 $\pm$ 448	1055 $\pm$ 576.4	1053 $\pm$ 382.2
IL-5	12.08 $\pm$ 12.08	11.57 $\pm$ 6.139	6.548 $\pm$ 3.407	68.58 $\pm$ 45.6	4.693 $\pm$ 2.211	102.2 $\pm$ 64.11	106.2 $\pm$ 48.8
IL-9	32.74 $\pm$ 32.74	0 $\pm$ 0	72.46 $\pm$ 53.64	68.58 $\pm$ 68.58	2.842 $\pm$ 2.842	43.19 $\pm$ 41.89	294.2 $\pm$ 135.7
IL-10	9.099 $\pm$ 6.118	26.76 $\pm$ 17.81	26.94 $\pm$ 13.94	40.2 $\pm$ 18.28	21.57 $\pm$ 12.59	31.86 $\pm$ 10.41	205.7 $\pm$ 124.8
IL-13	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.04131 $\pm$ 0.04131	79.55 $\pm$ 78.01
<b>Chemokines (pg/mL)</b>							
KC	0 $\pm$ 0	0.2814 $\pm$ 0.2259	0.05176 $\pm$ 0.05176	1.039 $\pm$ 0.7841	0.2598 $\pm$ 0.2598	0.01222 $\pm$ 0.01222	49.18 $\pm$ 32.2
RANTES	184.2 $\pm$ 51.74	199.8 $\pm$ 37.12	528.3 $\pm$ 66.47**	312.7 $\pm$ 92.16	609.6 $\pm$ 81.64**	230.2 $\pm$ 109.4	994.4 $\pm$ 185.4***
<b>Monocyte chemoattractant (pg/mL)</b>							
MCP-1	19344 $\pm$ 10709	24237 $\pm$ 11396	70425 $\pm$ 37955	196673 $\pm$ 138323	101614 $\pm$ 55319	8901 $\pm$ 5512	57306 $\pm$ 37478
<b>Differentiation and proliferation of macrophages (pg/mL)</b>							
GM-CSF	0 $\pm$ 0	0.4957 $\pm$ 0.4957	0.7988 $\pm$ 0.7988	16.03 $\pm$ 11.65	0.4237 $\pm$ 0.4237	0.3985 $\pm$ 0.3985	33.38 $\pm$ 18.46
M-CSF	0 $\pm$ 0	0.03008 $\pm$ 0.02416	0 $\pm$ 0	0.01709 $\pm$ 0.0115	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1.844 $\pm$ 1.839
<b>Vasculogenesis and angiogenesis (pg/mL)</b>							
VEGF	82.94 $\pm$ 46.62	360.8 $\pm$ 44.25***	24.77 $\pm$ 12.02	669.3 $\pm$ 144.5***	177.4 $\pm$ 32.91	299.6 $\pm$ 132.7	457.2 $\pm$ 172.1

*Cytokines and chemokines in pg/mL. Data are express as mean  $\pm$  SEM. \*p < 0.05, \*\*p < 0.001, and \*\*\*p < 0.0001. One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test.*

None of the conditions induce P2X7 changes, in correlation with no changes of ATP levels. Considering that both FBGCs and osteoclasts share some mechanism during their formation process (10), it is plausible that adenosine receptors have a similar role in both FBGCs and osteoclast formation. It has been extensively demonstrated that adenosine A2A receptor inhibits osteoclast formation (14,15). The increase in this receptor together with the rise in adenosine levels in-

duced by metal alloys indicate that similar role might be awarded to this receptor in FBGCs formation, primary in the presence of Co-Cr-Mo alloys.

On the other hand, it has been demonstrated that adenosine A1 receptors are involved in fusion of human peripheral blood monocytes into giant cells although it has not been fully established (30). It is known that adenosine A1 receptor induces osteoclast differenti-

ation (13), and blockade or deletion of the receptor suppresses osteoclast differentiation *in vitro* and *in vivo* (31). Furthermore, it has been demonstrated that adenosine A1 receptor on both primary murine and human osteoclast precursors is constitutively active, with selective antagonists working as an inverse agonists at A1 receptor (32), which might be the reason why changes in adenosine A1 receptor mRNA expression in IL-4 and *S. aureus* alone groups vs basal conditions are not significant.

Although the increase in A1 receptor in the presence of metal alloys needs to be address better, such an increase might be a compensatory mechanism induced by *S. aureus* as it has been observed that A1 receptor stimulation is essential for the formation of giant cells *in vitro* in the syncytia in giant cell arteritis, a characteristic where inflammation is crucial (33). Our data indicate that the presence of metal alloys induces a significant increase in IL-1 $\beta$  and IL-6, 2 key pro-inflammatory cytokines. This increase may be involved in the rise of the adenosine A1 receptor. However, the inflammatory role of adenosine A1 receptor is controversial. As it has been observed in some scenarios, A1 receptor can induce anti-inflammatory effects, including renal ischemia reperfusion, lungs (where the absence of adenosine A1 receptor induce leukocyte migration and increased cytokines), and sepsis where A1KO mice exhibit a higher degree of renal dysfunction and higher release of pro-inflammatory cytokines (34). These data indicate that the presence of endogenous A1 receptor is necessary to protect vs exacerbation of the disease and organ dysfunction. It is plausible that same as it occurs in sepsis, the imbalance in inflammation induced by *S. aureus* promotes the activation of A1 receptor by metal alloys in our system to counteract the hyper-inflammatory scenario, being in this situation not only the adenosine A2A receptor—the only anti-inflammatory receptor—but also the A1 receptor. Therefore, more data are needed to try to understand metal alloys induced A1 receptor expression in this system.

Finally, one of the limitations of this study was the impossibility of using live *S. aureus* bacteria in our assays. Although different bacterial infection assays were performed (data not shown), the results obtained were erratic and the amount of FBGCs remaining adhered after infection was too small to perform the assays conducted in this study. It would be convenient to conduct experiments with viable bacteria, with validation of the appropriate moments of infection, co-culture methods (adherence or non-adherence), etc.

In conclusion, the increased levels of adenosine would be responsible for the inhibition of cell fusion and the following reduction of *S. aureus*-induced FBGCs. Also relevant is the activation of the adenosine A2A receptor induced by the presence of Co-Cr-Mo alloys.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Becas FEIOMM INVESTIGACIÓN 2021 and Instituto de Salud Carlos III through the “Miguel Servet” program (CP15/00053, CPII20/00017), co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and a research grant from the Spanish Instituto de Salud Carlos III (PI19/00744, PI22/00347).

## REFERENCES

1. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Medical Weekly* 2005;135(1718):243-51. DOI: 10.4414/smw.2005.10934
2. Ayoade F, Li DD, Mabrouk A, Todd JR. Periprosthetic Joint Infection. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448131/>
3. Benito N, Mur I, Ribera A, Soriano A, Rodríguez-Pardo D, Sorlí L, et al. The Different Microbial Etiology of Prosthetic Joint Infections according to Route of Acquisition and Time after Prosthesis Implantation, Including the Role of Multidrug-Resistant Organisms. *J Clin Med* 2019;8(5):673. DOI: 10.3390/jcm8050673
4. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z jun, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011;3(2):55-65. DOI: 10.4248/IJOS11026
5. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20(2):86-100. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.004
6. Gibon E, Takakubo Y, Zwingenberger S, Gallo J, Takagi M, Goodman SB. Friend or foe? Inflammation and the foreign body response to orthopedic biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2024;112(8):1172-87. DOI: 10.1002/jbm.a.37599
7. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials (Basel)* 2015;8(9):5671-701. DOI: 10.3390/ma8095269
8. Brodbeck WG, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats NP, Anderson JM. Biomaterial surface chemistry dictates asherent monocyte/macrophage cytokine expression *in vitro*. *Cytokine* 2002;18(6):311-9. DOI: 10.1006/cyto.2002.1048
9. Fang J, Liu R, Chen S, Liu Q, Cai H, Lin Y, et al. Tuning the immune reaction to manipulate the cell-mediated degradation of a collagen barrier membrane. *Acta Biomaterialia* 2020;109:95-108. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.03.038
10. Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras JV. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J Cell Sci* 2018;131(11):jcs216267. DOI: 10.1242/jcs.216267
11. Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, Kennedy C, von Kügelgen I, Li B, et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol* 2020;177(11):2413-33. DOI: 10.1111/bph.15005
12. Fredholm BB, IJerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—



- An Update. *Pharmacol Rev* 2011;63(1):1-34. DOI: 10.1124/pr.110.003285
13. He W, Cronstein BN. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. *Purinergic Signal* 2012;8(2):327-37. DOI: 10.1007/s11302-012-9292-9
  14. Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A2A receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NF $\kappa$ B nuclear translocation. *Br J Pharmacol* 2013;169(6):1372-88. DOI: 10.1111/bph.12227
  15. Mediero A, Kara FM, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A2A Receptor Ligation Inhibits Osteoclast Formation. *Am J Pathol* 2012;180(2):775-86. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.017
  16. Mediero A, Frenkel SR, Wilder T, He W, Mazumder A, Cronstein BN. Adenosine A2A Receptor Activation Prevents Wear Particle-Induced Osteolysis. *Sci Transl Med* 2012;4(135):135ra65. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003393
  17. Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J* 2015;29(4):1577-90. DOI: 10.1096/fj.14-265066
  18. Miller CM, Boulter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, Saunders BM, et al. The Role of the P2X7 Receptor in Infectious Diseases. *PLoS Pathog* 2011;7(11):e1002212. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002212
  19. Falzoni S, Chiozzi P, Ferrari D, Buell G, Di Virgilio F. P2X7 Receptor and Polykation Formation. *Mol Biol Cell* 2000;11(9):3169-76. DOI: 10.1091/mbc.11.9.3169
  20. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials* 1998;19(18):1621-39. DOI: 10.1016/S0142-9612(97)00146-4
  21. Sánchez-De Jesús F, Bolarín-Miró AM, Torres-Villaseñor G, Cortés-Escobedo CA, Betancourt-Cantera JA. Mechanical alloying of biocompatible Co-28Cr-6Mo alloy. *J Mater Sci: Mater Med* 2010;21(7):2021-6. DOI: 10.1007/s10856-010-4066-9
  22. Martín-García M, Aguilera-Correa JJ, Arenas MÁ, García-Diego IM, Conde A, de Damborenea JJ, et al. Differences in In Vitro Bacterial Adherence between Ti6Al4V and CoCrMo Alloys. *Materials (Basel)* 2023;16(4):1505. DOI: 10.3390/ma16041505
  23. Vivero-Lopez M, Pereira-da-Mota AF, Carracedo G, Huete-Toral F, Parga A, Otero A, et al. Phosphorylcholine-Based Contact Lenses for Sustained Release of Resveratrol: Design, Antioxidant and Antimicrobial Performances, and In Vivo Behavior. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022;14(50):55431-46. DOI: 10.1021/acsaami.2c18217
  24. Sadykov MR, Bayles KW. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Curr Opin Microbiol* 2012;15(2):211-5. DOI: 10.1016/j.mib.2011.12.010
  25. Moormeier DE, Bayles KW. Staphylococcus aureus Biofilm: A Complex Developmental Organism. *Mol Microbiol* 2017;104(3):365-76. DOI: 10.1111/mmi.13634
  26. Hanke ML, Heim CE, Angle A, Sanderson SD, Kielian T. Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of S. aureus biofilm infections. *J Immunol* 2013;190(5):2159-68. DOI: 10.4049/jimmunol.1202348
  27. Garrigues GE, Cho DR, Rubash HE, Goldring SR, Herndon JH, Shanbhag AS. Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. *Biomaterials* 2005;26(16):2933-45. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.034
  28. Welch NG, Winkler DA, Thissen H. Antifibrotic strategies for medical devices. *Adv Drug Deliv Rev* 2020;167:109-20. DOI: 10.1016/j.addr.2020.06.008
  29. Anderson J, Cramer S. Chapter 2 - Perspectives on the Inflammatory, Healing, and Foreign Body Responses to Biomaterials and Medical Devices. In: Badylak SF, editor. *Host Response to Biomaterials* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2015. p. 13-36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001967000025>. DOI: 10.1016/B978-0-12-800196-7.00002-5
  30. Haskó G, Pacher P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(4):865-9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.226852
  31. Kara FM, Doty SB, Boskey A, Goldring S, Zaidi M, Fredholm BB, et al. Adenosine A1 Receptors (A1R) Regulate Bone Resorption II Adenosine A1R Blockade or Deletion Increases Bone Density and Prevents Ovariectomy-Induced Bone Loss. *Arthritis Rheum* 2010;62(2):534-41. DOI: 10.1002/art.27219
  32. He W, Wilder T, Cronstein BN. Rolofylline, an adenosine A1 receptor antagonist, inhibits osteoclast differentiation as an inverse agonist. *Br J Pharmacol* 2013;170(6):1167-76. DOI: 10.1111/bph.12342
  33. Merrill JT, Shen C, Schreiber D, Coffey D, Zakharenko O, Fisher R, et al. Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes. A mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1997;40(7):1308-15.
  34. Gallos G, Ruyle TD, Emala CW, Lee HT. A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased mortality, renal dysfunction, and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(2):F369-76. DOI: 10.1152/ajprenal.00470.2004

## Original

# Efecto de los niveles deficientes de vitamina D sobre la actividad motora y la salud vascular en ratones de ambos sexos

Julia Martín Virgala<sup>1,5</sup>, Patricia Sosa Calleja<sup>2</sup>, Sara Fernández Villabrille<sup>1,5</sup>, Beatriz Martín Carro<sup>1,5</sup>, Laura Naves Mendivil<sup>1</sup>, Nerea González García<sup>1</sup>, Cristina Alonso Montes<sup>1,5</sup>, Sara Panizo García<sup>1,5</sup>, Natalia Carrillo López<sup>1,5</sup>, María Piedad Ruiz Torres<sup>3,6</sup>, Adriana Dusso<sup>4</sup>, Manuel Naves Díaz<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo, España. <sup>2</sup>Fundación para la Investigación Biomédica. Hospital Universitario de Getafe. Getafe, Madrid, España. <sup>3</sup>Unidad de Fisiología. Departamento de Biología de Sistemas. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Alcalá de Henares. Alcalá de Henares, Madrid, España. <sup>4</sup>Division of Endocrinology, Metabolism & Lipid Research. John T. Milliken Department of Internal Medicine. Washington University. St. Louis, EE. UU. <sup>5</sup>Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS) RICORS2040 (RD21/0005/0019). <sup>6</sup>Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS) RICORS2040 (RD21/0005/0023)

## Resumen

**Introducción:** estudios previos muestran que niveles adecuados de calcidiol se asocian con mayor fuerza muscular, mantenimiento de actividades cotidianas y menor progresión de calcificación aórtica. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la deficiencia de vitamina D sobre la actividad motora y salud vascular en un modelo experimental.

**Material y métodos:** se utilizaron ratones machos y hembras FVB/N de 18 meses. Un grupo recibió dieta sin vitamina D (grupo deficiente,  $n = 20$ ) y otro grupo dieta normal (grupo control,  $n = 17$ ) durante 8 semanas. Para medir la actividad motora se utilizó una varilla de madera fijada a una mesa con una marca a 10 cm del extremo apoyado para indicar la línea de meta. Los ratones se colocaron en el extremo "abierto" de la varilla de espaldas a la meta. Después un proceso de entrenamiento previo, los animales fueron evaluados tres veces midiendo dos parámetros: tiempo de orientación (tiempo necesario para girar 180° desde la posición inicial y mirar hacia el extremo apoyado) y tiempo de transición (tiempo necesario para llegar a la meta). Al sacrificio, se extrajeron sangre y la aorta, donde se midió como marcador de fenotipo vascular la expresión génica de  $\alpha$ -actina y del miR-145. También se cuantificó la expresión génica de Runx2 para valorar el cambio de fenotipo vascular a osteogénico.

**Resultados:** los niveles de calcidiol fueron superiores en el grupo control ( $23,3 \pm 3,9$  vs.  $12,7 \pm 3,1$  ng/mL,  $p < 0,001$ ). Los tiempos de orientación ( $43 \pm 46$  vs.  $15 \pm 21$  segundos,  $p = 0,020$ ) y de transición ( $62 \pm 51$  vs.  $31 \pm 37$  segundos,  $p = 0,041$ ) fueron muy superiores en el grupo deficiente respecto al grupo control, lo que implicaría alteraciones en la actividad motora. A nivel aórtico, la expresión génica de  $\alpha$ -actina y del miR-145 se vieron muy comprometidos en el grupo deficiente como indicativos de un deterioro de la salud vascular. La expresión de Runx2 no se alteró.

**Conclusiones:** estos resultados experimentales confirman resultados clínicos previos donde mantener niveles adecuados de vitamina D previene la pérdida de funcionalidad motora y el daño vascular.

**Palabras clave:**  
Vitamina D.  
Actividad motora. Salud vascular.

Recibido: 28/08/2024 • Aceptado: 18/11/2024

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Martín Virgala J, Sosa Calleja P, Fernández Villabrille S, Martín Carro B, Naves Mendivil L, González García N, Alonso Montes C, Panizo García S, Carrillo López N, Ruiz Torres MP, Dusso A, Naves Díaz M. Efecto de los niveles deficientes de vitamina D sobre la actividad motora y la salud vascular en ratones de ambos sexos. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(4):133-139

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00060

## Correspondencia:

Manuel Naves Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Avenida de Roma, s/n. 33011 Oviedo  
e-mail: mnaves.huca@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El sistema endocrino de la vitamina D modula la expresión de más del 3 % de todos los genes del organismo, por lo que regula diferentes procesos fisiológicos en otros órganos y sistemas como, por ejemplo, el músculo (1). En los últimos años se ha hecho hincapié en mantener un estado adecuado de vitamina D para optimizar la fuerza muscular con objeto de reducir caídas y fracturas en población envejecida (2-4).

La vitamina D estimula la absorción de calcio del intestino y mantiene los niveles séricos de calcio que se requieren para el mantenimiento de la función muscular (5). Varios estudios *in vivo* sugieren el papel de la vitamina D en la regulación de la masa muscular y su función. Estudios observacionales demuestran que la deficiencia de vitamina D en personas de edad avanzada está asociada con una masa y fuerza muscular reducidas (6-8), un rendimiento físico más bajo (6,9), y un mayor riesgo de caídas (10). Además, un metaanálisis de 17 ensayos clínicos mostró que la suplementación con vitamina D en sujetos con niveles basales de calcidiol inferiores a 10 ng/mL tuvo un efecto positivo en la fuerza muscular de la cadera (11). Los estudios descritos anteriormente sugieren que la vitamina D puede afectar la masa muscular y su función; sin embargo, no está claro si la vitamina D desempeña un papel directo o indirecto.

En los últimos años, se le ha dado cada vez más importancia a la conversión local de calcidiol a calcitriol, el metabolito de la vitamina D más activo, que se sintetiza principalmente en el riñón a través de su precursor el calcidiol (5). Esta síntesis local se ha demostrado en varios tipos de células como en osteoblastos (12-15) y monocitos (16), lo que refuerza la importancia de alcanzar unos niveles adecuados de calcidiol en el organismo.

El sistema endocrino de la vitamina D también regula el sistema cardiovascular (17). De hecho, datos de nuestro grupo, en una cohorte de población general no seleccionada, han mostrado que los niveles adecuados de calcidiol se asocian no solo a una mayor fuerza muscular y mantenimiento de actividades cotidianas, sino también una menor progresión de calcificación aórtica (18,19).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la deficiencia de vitamina D sobre la actividad motora y salud vascular en un modelo experimental. Este tipo de estudios permite, con mayor precisión, limitar y controlar los posibles sesgos existentes e inherentes a los estudios epidemiológicos.

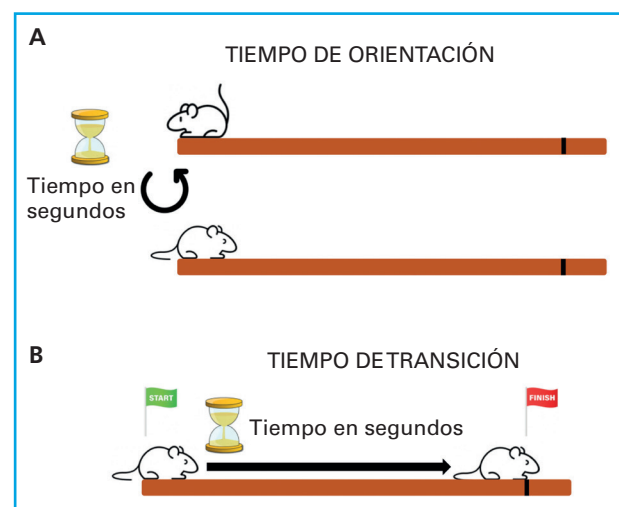
## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron machos y hembras de la cepa de ratones FVB/N de 18 meses de edad. Un grupo recibió die-

ta deficiente en vitamina D (Teklad 2014, Vitamin D omitted, Envigo, España) (grupo deficiente,  $n = 20$ ) y otro grupo se mantuvo con dieta normal (Teklad 2014, scratch versión, Envigo) (grupo control,  $n = 17$ ) durante 8 semanas.

Para inducir la expresión de CYP24A1 o 1- $\alpha$  hidroxilasa renal con el objetivo de acelerar el catabolismo de las reservas endógenas de calcidiol y calcitriol, los animales recibieron desde el inicio de las dietas inyecciones intraperitoneales de 3 ng de 19-nor-1,25-dihidroxitamina D2 (paricalcitol; Zemplar, amablemente proporcionado por Abbott, hoy AbbVie, Lake Bluff, IL, USA) los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12, siguiendo el protocolo utilizado por otros autores para acelerar el catabolismo de la vitamina D (20).

Al final de la última semana de tratamiento con la dieta deficiente o no en vitamina D, para medir la actividad motora se utilizó una varilla de madera (60 cm largo y 28 mm diámetro) fijada a una mesa 60 cm por encima de una superficie acolchada, con una marca a 10 cm del extremo apoyado para indicar la línea de meta (21). Los ratones se colocaron en el extremo "abierto" de la varilla de espaldas a la meta (Fig. 1). Dos semanas antes de la realización del estudio de actividad motora, se realizó un proceso de entrenamiento, aclimatando a los animales a la varilla y poniendo en la meta una golosina para premiar el esfuerzo. En el momento del estudio, los animales fueron evaluados tres veces midiendo dos parámetros: tiempo de orientación (tiempo necesario para girar 180° desde la posición inicial y mirar hacia el extremo apoyado) y tiempo de transición (tiempo necesario para llegar a la meta). Si un ratón se caía dos veces durante los tiempos de orientación o transición, se le sumaba al



**Figura 1.** Esquema para representar la actividad motora. A. El tiempo de orientación es el tiempo en segundos que el animal emplea, en darse la vuelta en la varilla, para cambiar la dirección de la marcha. B. El tiempo de transición representa el tiempo en segundos que tarda en recorrer la varilla hasta la línea de meta.

tiempo empleado 25 segundos. El tiempo que se le daba a cada ratón para realizar el total de la prueba era de 2 minutos. Al sacrificio, se extrajeron sangre y el tejido aórtico que se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento.

Para las determinaciones bioquímicas en suero se utilizaron kits específicos Quanti-Chrom™ (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA) para BUN, Ca y P. Para el resto de los marcadores bioquímicos se utilizaron kits de ELISA específico: PTH (Immutopics, Inc., San Clemente, CA, USA), FGF23 intacta (Immutopics) y calcidiol (Immunodiagnostic Systems Ltd, Scottsdale, AZ, USA).

No se incluyeron las aortas de los animales en parafina para mirar la existencia de calcificaciones, ya que el ratón no es un buen modelo para ver calcificaciones (22), salvo que sean mutantes ApoE (23). Además, en nuestro caso se trataba de ratones con función renal normal por lo que encontrar calcificaciones a este nivel y aunque los ratones fueran envejecidos, no tenía mucho fundamento.

El ARN total de riñón y aorta se extrajo utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se retrotranscribieron 2 µg de ARN total a ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de alta capacidad (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). La expresión de los genes en aorta ( $\alpha$ -actina, Runx2 y microARN (miR)-145) y en riñón (1- $\alpha$  hidroxilasa y 25- $\alpha$  hidroxilasa) se realizó mediante PCR (qPCR) utilizando ensayos prediseñados (Applied Biosystems) en un equipo Stratagene Sistema QPCR Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. La expresión genética relativa se cuantificó mediante el método  $\Delta\Delta CT$  utilizando como gen constitutivo GAPDH y U6 en el caso del microRNA (Applied Biosystems) y se expresaron con unidades relativas (U.R.) (24).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la versión 25.0 de SPSS para Windows. Las variables cuanti-

tativas se analizaron mediante t de Student utilizando el punto de corte  $p < 0,05$  para resaltar las diferencias estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

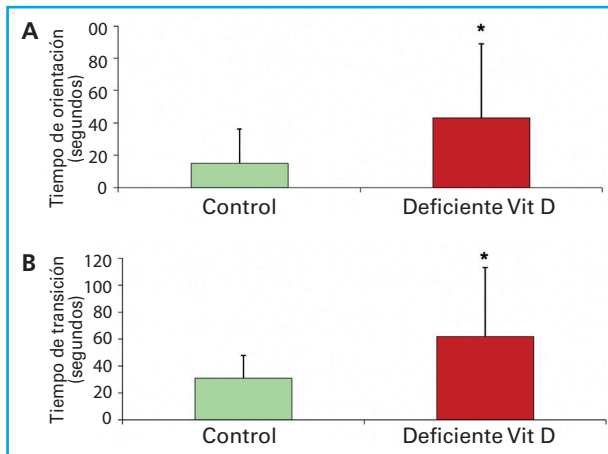
A nivel bioquímico no hubo diferencias entre los ratones que recibieron la dieta deficiente y normal en vitamina D ni en la función renal medida por BUN, ni en los niveles séricos de calcio, fósforo, PTH o FGF23 (Tabla I). Como era de esperar, los niveles de calcidiol fueron significativamente superiores en el grupo que recibió la dieta normal en vitamina D que en los que recibieron la dieta deficiente en vitamina D ( $23,3 \pm 3,9$  vs.  $12,7 \pm 3,1$  ng/mL,  $p < 0,001$ ) (Tabla I).

Al estudiar los parámetros de actividad muscular, se pudo objetivar que los tiempos de orientación ( $43 \pm 46$  vs.  $15 \pm 21$  segundos,  $p = 0,020$ ) y de transición ( $62 \pm 51$  vs.  $31 \pm 37$  segundos,  $p = 0,041$ ) fueron superiores significativamente en el grupo con dieta deficiente en vitamina D respecto a los que tomaron la dieta normal (Fig. 2). El tiempo mínimo empleado por los ratones para realizar la orientación fue de 2 segundos y para realizar la transición fue de 6 segundos. En ambos casos, el tiempo máximo empleado fue de 120 segundos. El 35 % de los ratones del grupo con dieta deficiente no fueron capaces de finalizar el recorrido, mientras que este porcentaje fue del 17,6 % en los que recibieron la dieta normal en vitamina D.

A nivel aórtico, la expresión génica de  $\alpha$ -actina, marcador de fenotipo vascular, se vio muy comprometida en el grupo que recibió la dieta deficiente en vitamina D ( $2,05 \pm 1,48$  vs.  $0,98 \pm 0,51$  U.R.,  $p = 0,041$ ). La expresión de miR-145, principal miR que regula el fenotipo contráctil también mostró un comportamiento similar al de la  $\alpha$ -actina, mostrando un claro descenso en la expresión de este miR en los ratones que recibieron la dieta deficiente ( $1,70 \pm 1,72$  vs.  $0,76 \pm 0,34$  U.R.,  $p = 0,048$ ). La expresión de Runx2 no se encontró alterada (Fig. 3).

Tabla I. Marcadores bioquímicos del estudio experimental en ratones con dieta normal y deficiente en vitamina D

Marcadores bioquímicos	Grupo dieta normal (n = 17)	Grupo dieta deficiente (n = 20)	Valor de p
BUN (mg/dL)	23,2 ± 4,5	22,7 ± 3,8	0,846
Calcio (mg/dL)	9,1 ± 0,6	8,9 ± 0,8	0,563
Fósforo (mg/dL)	5,3 ± 1,2	5,4 ± 1,3	0,929
PTH (pg/mL)	173 ± 58	202 ± 104	0,513
FGF23 (pg/mL)	239 ± 124	288 ± 58	0,398
Calcidiol (ng/mL)	23,3 ± 3,9	12,7 ± 3,1	< 0,001



**Figura 2.** Tiempo de orientación (A) y tiempo de transición (B) utilizados para medir la actividad motora en una varilla de madera en los grupos de ratones con dieta deficiente y no deficiente en vitamina D. \* $p < 0,05$  respecto al grupo control (grupo con dieta normal en vitamina D).

A nivel renal, la expresión génica de 1- $\alpha$  hidroxilasa y 25- $\alpha$  hidroxilasa no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales con deficiencia o sin deficiencia de vitamina D, si bien en el caso de la 1- $\alpha$  hidroxilasa, el grupo deficiente en vitamina D tuvo un descenso en su expresión génica del 39 % ( $1,83 \pm 2,19$  vs.  $3,00 \pm 4,77$  U.R.,  $p = 0,413$ ). Este descenso fue del 23 % para la 25- $\alpha$  hidroxilasa ( $1,60 \pm 2,39$  vs.  $2,08 \pm 2,00$  U.R.,  $p = 0,586$ ).

## DISCUSIÓN

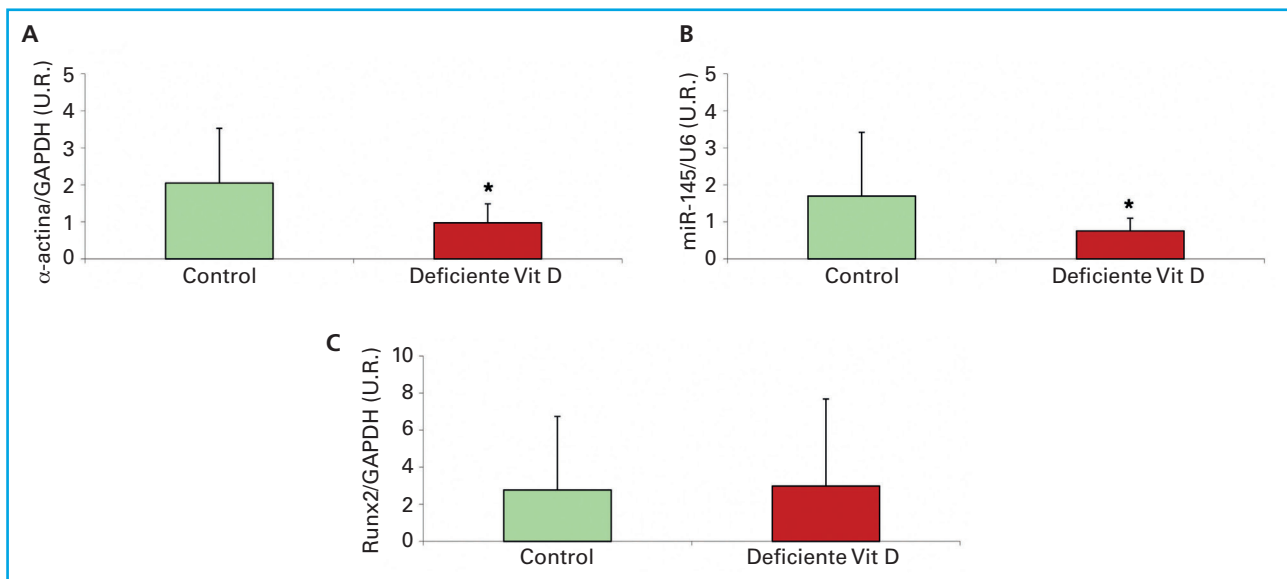
Estos resultados experimentales confirman resultados clínicos previos, donde mantener niveles adecuados de

vitamina D previene la pérdida de funcionalidad motora y el daño vascular.

Por un lado, hemos objetivado en ratones envejecidos cómo la falta de vitamina D condiciona la movilidad tanto el orientarse como realizar un determinado recorrido. Hace unos años, nuestro grupo publicó un artículo en población general describiendo cómo los niveles deficientes de vitamina D se asociaban con una menor fuerza de agarre en las manos, pero también una mayor dificultad para realizar actividades de la vida diaria lo que parece corroborarse con los datos de este estudio experimental (18).

La deficiencia de vitamina D es común en personas mayores y puede contribuir a un deterioro muscular mediante lo que se denomina sarcopenia (25,26). Todo ello lleva aparejado una serie de efectos devastadores con un incremento en la necesidad de atención de las personas mayores y un aumento de la morbimortalidad (25). Por otra parte, no debemos olvidar que las personas mayores corren un mayor riesgo de sufrir deficiencia de vitamina D debido a factores intrínsecos relacionados con la edad como cambios en la síntesis de vitamina D o exposición reducida a la luz solar (27). Si bien, un reciente metaanálisis cuestiona la utilidad de los suplementos de vitamina D para reducir el riesgo de caídas, disminución de la densidad mineral ósea (DMO) y fracturas, existen suficientes argumentos que evidencian la importancia de la vitamina D sobre la salud muscular y ósea (28).

Aunque sigue siendo controvertido si el receptor de la vitamina D (VDR) se expresa en el músculo, hay autores que han encontrado niveles significativamente más altos de VDR en el músculo de ratones jóvenes, lo que respalda un efecto predominante-



**Figura 3.** Expresión génica relativa de  $\alpha$ -actina (A); miR-145 (B) y Runx2 (C) en las aortas de ratones con dieta normal y deficiente en vitamina D. \* $p < 0,05$  respecto al grupo control (grupo con dieta normal en vitamina D).

mente pleiotrópico en este tejido (29-31). Además, se conoce que la expresión de VDR en el músculo disminuye con la edad (32,33), interpretando los autores que el sistema musculoesquelético es más vulnerable a los niveles bajos de vitamina D en el anciano. El músculo esquelético parece constituir un importante lugar de almacenamiento de vitamina D, pudiendo volver a difundirse a la circulación o posiblemente a zonas adyacentes siguiendo señales específicas (34,35).

No fuimos capaces de apreciar un descenso en los niveles de expresión de 1- $\alpha$  hidroxilasa a nivel renal en los ratones deficientes de vitamina D, si bien hubo una tendencia a un descenso probablemente debido a la falta del sustrato calcidiol para su conversión a la forma metabólicamente más activa o calcitriol. Por otro lado, no debemos olvidar que el músculo expresa la enzima 1- $\alpha$  hidroxilasa, lo que facilitaría la síntesis local del calcitriol (30,36,37), sobre todo en los ratones con niveles adecuados de calcidiol.

Si bien el ratón no es un buen modelo para estudiar la calcificación vascular por la resistencia que poseen a calcificar, sí que hemos objetivado modificaciones a nivel molecular que indican una alteración a nivel vascular. Los importantes descensos (más del 50 %) en la expresión del marcador más específico de fenotipo contráctil en los ratones deficientes en vitamina D,  $\alpha$ -actina, podrían indicar que aparecen señales de una transformación de fenotipo vascular a otro fenotipo óseo, si bien los niveles de Runx2 no se vieron incrementados. Por otro lado, es interesante destacar la importante bajada en la expresión del miR-145, principal miR regulador del fenotipo vascular. Hay evidencias, recientemente publicadas por nuestro grupo, que indican que en el proceso de cambio de fenotipo vascular a óseo el primer cambio a nivel molecular que se produce es la pérdida del miR-145, con anterioridad a los descensos de  $\alpha$ -actina o el aumento de los depósitos intracelulares de calcio (38).

Por tanto y como hemos objetivado, mantener niveles adecuados de miR-145 parece fundamental para mantener una salud vascular adecuada. De entre los inductores de la expresión del miR-145 se encuentra la vitamina D. De hecho, se ha descrito que miR-145 media los efectos antiproliferativos y reguladores de genes de la vitamina D, por lo que sugieren su utilidad para el pronóstico y desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer gástrico (39). Recientemente, nuestro grupo publicó un artículo donde en células de músculo liso vascular la administración de vitamina D pudo prevenir las reducciones en el contenido aórtico de miR-145 y  $\alpha$ -actina inducidas por la uremia, reduciendo las alteraciones en contractilidad vascular y diferenciación osteogénica (40).

Como ya han señalado otros autores (41), hay varios mecanismos que ayudan a comprender los vínculos entre la deficiencia de vitamina D y enfermedades

cardiovasculares. La deficiencia de vitamina D conduce a la estimulación de la transcripción del gen PTH, lo que a su vez promueve la hipertrofia de miocitos y mecanismos inflamatorios que involucran a células del músculo liso vascular en su desarrollo. El sistema endocrino de la vitamina D también induce la supresión de procesos inflamatorios, lo que se ha establecido como un mecanismo patogénico clave en la aterosclerosis, pudiendo ejercer un efecto antiproliferativo sobre la hipertrofia y proliferación de las células del miocardio, originando daño cardíaco (41).

Como posibles limitaciones del estudio no podemos olvidar que la dificultad de extrapolar los resultados de un modelo en roedores al humano, sin embargo, creemos que estos resultados confirman los observados en estudios clínicos, con la ventaja en el modelo animal de tener más controlados los posibles sesgos de confusión inherentes a los estudios con pacientes. Del mismo modo, el modelo del ratón no es el más adecuado para estudiar el proceso de calcificación vascular al ser un modelo resistente a la misma. No obstante, los resultados encontrados sí nos muestran alteraciones a nivel vascular que podrían indicar ese cambio de fenotipo vascular que pudiera ser el inicio del proceso de calcificación vascular.

Como conclusiones de este trabajo, podemos afirmar que el déficit de vitamina D en un modelo de ratón envejecido fue capaz de alterar la funcionalidad motora de los animales y que a nivel vascular estas alteraciones motoras se vieron acompañadas de cambios en el fenotipo vascular con una pérdida clara tanto de la  $\alpha$ -actina, principal proteína contráctil de las células de músculo liso vascular de las aortas, y del miR-145, principal miR que regula el fenotipo vascular.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Fondo de Investigación Sanitaria (PI16/00637, PI17/00715, PI17/00384 y PI19/00532), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080, IDE/2024/000706), Fundación Renal Ínigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Retic REDinREN del ISCIII (RD16/0009/0017 y RD16/0009/0018) y RICORS2040 (Kidney Disease; RD21/0005/0019 y RD21/0005/0023). Sara Panizo García y Natalia Carrillo López son investigadoras postdoctorales Miguel Servet. Cristina Alonso Montes es investigadora postdoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias. Julia Martín Vírjala y Beatriz Martín Carro son investigadoras postdoctorales por RICORS2040 (Kidney Disease; RD21/0005/0019). Sara Fernández Villabrille es investigadora predoctoral Severo Ochoa del Principado de Asturias. Nerea González García es investigadora predoctoral PFIS asociada al proyecto PI22/00195.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Casado E, Quesada JM, Naves M, Peris P, Jódar E, Giner M, et al. Recomendaciones de la SEIOMM en la prevención y tratamiento del déficit de vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2021;13:84-97. DOI: 10.4321/S1889-836X2021000200007
2. Morgan KT. Nutritional determinants of bone health. *J Nutr Elder* 2008;27:3-27. DOI: 10.1080/0161639360802059670
3. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:585-91. DOI: 10.1016/j.beem.2011.05.002
4. Bischoff-Ferrari HA. Relevance of vitamin D in muscle health. *Rev Endocr Metab Disord* 2012;13:71-7. DOI: 10.1007/s11154-011-9200-6
5. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92:4-8. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.016
6. Tieland M, Brouwer-Brolsma EM, Nienaber-Rousseau C, van Loon LJ, de Groot LC. Low vitamin D status is associated with reduced muscle mass and impaired physical performance in frail elderly people. *Eur J Clin Nutr* 2013;67:1050-5. DOI: 10.1038/ejcn.2013.144
7. Bischoff HA, Stahelin HB, Urscheler N, Ehrensam R, Vonthein R, Perrig-Chiello P, et al. Muscle strength in the elderly: Its relation to vitamin D metabolites. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:54-8. DOI: 10.1016/S0003-9993(99)90307-6
8. Zamboni M, Zoico E, Tosoni P, Zivelonghi A, Bortolani A, Maggi S, et al. Relation between vitamin D, physical performance, and disability in elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:M7-11. DOI: 10.1093/gerona/57.1.M7
9. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2058-65. DOI: 10.1210/jc.2006-1525
10. Snijder MB, van Schoor NM, Pluijm SM, van Dam RM, Visser M, Lips P. Vitamin D status in relation to one-year risk of recurrent falling in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2980-5. DOI: 10.1210/jc.2006-0510
11. Stockton KA, Mengersen K, Paratz JD, Kandiah D, Bennell KL. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: A systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2011;22:859-71. DOI: 10.1007/s00198-010-1407-y
12. Howard GA, Turner RT, Sherrard DJ, Baylink DJ. Human bone cells in culture metabolize 25-hydroxyvitamin D3 to 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and 24, 25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem* 1981;256:7738-40. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)43337-6
13. van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, et al. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1αhydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J* 2006;20:2417-9. DOI: 10.1096/fj.06-6374fje
14. Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, et al. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1α, 25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 2007;40:1517-28. DOI: 10.1016/j.bone.2007.02.024
15. van der Meijden K, Lips P, van Driel M, Heijboer AC, Schulten EA, den Heijer M, et al. Primary human osteoblasts in response to 25-Hydroxyvitamin D3, 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and 24R, 25-Dihydroxyvitamin D3. *PLoS ONE* 2014;9:e110283. DOI: 10.1371/journal.pone.0110283
16. Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, et al. Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res* 2013;28:46-55. DOI: 10.1002/jbmr.1740
17. Wang Y, DeLuca HF. Is the vitamin D receptor found in muscle? *Endocrinology* 2011;152(2):354-63. DOI: 10.1210/en.2010-1109
18. Gómez Alonso C, Díaz López JB, Rodríguez Rebollar A, Martínez Arias L, Martín Virgala J, Martín Carro B, et al. Niveles de calcidiol y mantenimiento de la función muscular, capacidad funcional y densidad mineral ósea en población española no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2019;11:6-11. DOI: 10.4321/s1889-836x2019000100002
19. 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. DOI: 10.1007/s00198-011-1550-0
20. Stavenuiter AWD, Arcidiacono MV, Ferrantelli E, Keuning ED, Vila Cuenca M, ter Wee PM, et al. A novel rat model of vitamin D deficiency: safe and rapid induction of vitamin D and calcitriol deficiency without hyperparathyroidism. *Biomed Res Int* 2015;2015:604275. DOI: 10.1155/2015/604275
21. Alcalde-Estévez E, Sosa P, Asenjo-Bueno A, Plaza P, Valenzuela PL, Naves-Díaz M, et al. Dietary phosphate restriction prevents the appearance of sarcopenia signs in old mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2023;14:1060-74. DOI: 10.1002/jcsm.13194
22. 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 Transpl* 2013;28:62-9. DOI: 10.1093/ndt/gfs333
23. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:133-40. DOI: 10.1161/01.ATV.14.1.133
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:4028. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
25. Sohl E, van Schoor NM, de Jongh RT, Visser M, Deeg DJ, Lips P. Vitamin D status is associated with functional limitations and functional decline in older individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1483-90. DOI: 10.1210/jc.2013-1698
26. Visser M, Deeg DJ, Lips P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5766-72. DOI: 10.1210/jc.2003-030604
27. Girgis CM. Vitamin D and muscle function in the elderly: the elixir of youth? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014;17:546-50. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000104
28. Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018;6:847-58. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30265-1
29. Choi M, Park H, Cho S, Lee M. Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. *Cytokine* 2013;63:27-35. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.03.018
30. Srikuea R, Zhang X, Park-Sarge OK, Esser KA. VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. *Am J*

- Physiol Cell Physiol 2012;303:C396-C405. DOI: 10.1152/ajpcell.00014.2012
31. Stratos I, Li Z, Herlyn P, Rotter R, Behrendt AK, Mittlmeier T. Vitamin D increases cellular turnover and functionally restores the skeletal muscle after crush injury in rats. *Am J Pathol* 2013;182:895-904. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.11.006
  32. Bischoff HA, Borchers M, Gudat F, Duermueller U, Theiler R, Stahelin HB, et al. In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem J* 2001;33:19-24. DOI: 10.1023/A:1017535728844
  33. Montero-Odasso M, Duque G. Vitamin D in the aging musculoskeletal system: an authentic strength preserving hormone. *Mol Aspects Med* 2005;26:203-19. DOI: 10.1016/j.mam.2005.01.005
  34. Abboud M, Puglisi DA, Davies BN, Rybchyn M, Whitehead NP, Brock KE, et al. Evidence for a specific uptake and retention mechanism for 25-Hydroxyvitamin D (25OHD) in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2013;154:3022-30. DOI: 10.1210/en.2012-2245
  35. Girgis CM, Mokbel N, Minn Cha K, Houweling PJ, Abboud M, Fraser DR, et al. The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. *Endocrinology* 2014;155:3227-7. DOI: 10.1210/en.2014-1016
  36. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Mokbel N, Cheng K, Gunton JE. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2014;155:347-57. DOI: 10.1210/en.2013-1205
  37. Ceglia L, Niramitmahapanya S, Morais MD, Rivas DA, Harris SS, Bischoff-Ferrari H, et al. A randomized study on the effect of vitamin D3 supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1927-E35. DOI: 10.1210/jc.2013-2820
  38. Fernández Villabrille S, Martín Carro B, Martín Virgala J, Alonso Montes C, Fernández Fernández A, Martínez Salgado C, et al. Phosphorus may induce phenotypic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells through the reduction of microRNA-145. *Nutrients* 2023;15:2918. DOI: 10.3390/nu15132918
  39. Chang S, Gao L, Yang Y, Tong D, Guo B, Liu L, et al. MiR-145 mediates the antiproliferative and gene regulatory effects of vitamin D3 by directly targeting E2F3 in gastric cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:7675-85. DOI: 10.18632/oncotarget.3048
  40. Carrillo López N, Panizo S, Arcidiacono MV, de la Fuente S, Martínez Arias L, Ottaviano E, et al. Vitamin D treatment prevents uremia-induced reductions in aortic microRNA-145 attenuating osteogenic differentiation despite hyperphosphatemia. *Nutrients* 2022;14:2589. DOI: 10.3390/nu14132589
  41. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-11. DOI: 10.1161/CIRCULATION-HA.107.706127



## Original

# Proteómica aplicada al estudio de la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica

Covadonga Quirós-Caso<sup>1</sup>, Natalia Carrillo-López<sup>2</sup>, José Luis Fernández-Martín<sup>2</sup>, Cristina Alonso-Montes<sup>2</sup>, Jorge B. Cannata-Andía<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Medicina. Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>2</sup>Metabolismo Óseo, Vascular y Enfermedades Inflamatorias Crónicas. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Unidad de Gestión Clínica del Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). REDinREN y RICORS2040. ISCIII. Oviedo. <sup>3</sup>Departamento de Medicina. Universidad de Oviedo. Oviedo

## Resumen

**Introducción:** la calcificación vascular (CV) se asocia a un incremento de la mortalidad en la población general y en pacientes con enfermedad renal crónica, en los que la prevalencia es mucho mayor. La necesidad de un diagnóstico efectivo y precoz de la CV para mejorar las estrategias preventivas y pronósticas ha impulsado la investigación sobre biomarcadores. El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión diferencial de proteínas asociadas al proceso de CV mediante técnicas de proteómica.

**Material y métodos:** se cultivaron células de músculo liso vascular en condiciones no calcificantes y calcificantes. La expresión diferencial de proteica se realizó mediante 2D-DIGE y LC-ESI-MS/MS y la identificación se realizó con el motor MASCOT.

**Resultados:** tras seis días de cultivo, se detectaron 121 spots de proteínas expresadas diferencialmente. De estas proteínas, 21 fueron identificadas en 24 spots. En las células cultivadas en medio calcificante, cuatro proteínas aumentaron significativamente su expresión; la del colágeno de tipo I fue la que mostró un mayor cambio (3,49 veces) respecto a las cultivadas en medio no calcificante. Otras proteínas, musculares y estructurales, mostraron una reducción en su expresión. Además, se observaron cambios en la expresión de nucleobindina-1 y endoplasmina que hasta la fecha no se habían relacionado con la CV.

**Conclusión:** los resultados confirmaron el descenso en la expresión de proteínas típicamente musculares y del citoesqueleto durante la CV. Además, se identificaron cambios en la expresión de proteínas que previamente no se habían relacionado con la CV y que podrían estar implicados en este proceso.

**Palabras clave:**  
Calcificación vascular.  
Enfermedad renal crónica.  
Proteómica.  
2D-DIGE.

Recibido: 13/09/2024 • Aceptado: 02/12/2024

Contribución de los autores: Cristina Alonso Montes y Jorge B. Cannata-Andía son los autores de correspondencia de este artículo. Covadonga Quirós Caso y Natalia Carrillo López han contribuido por igual como primeras autoras. José Luis Fernández-Martín y Jorge B. Cannata-Andía han contribuido por igual como autores sénior.

Beca o ayuda económica: este artículo original ha sido financiado con una Beca FEIOMM de Investigación Básica 2021. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la RETIC REDinREN del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (RD06/0016/1013, RD12/0021/0023, RD16/0009/0017), la Red de Investigación Cooperativa Orientada a Resultados en Salud RICORS2040 (RD21/0005/0019 financiado por la Unión Europea con cargo a NextGenerationEU que financia las acciones del Mecanismo de Recuperación y Resiliencia [MRR]), proyectos del ISCIII (PI11-00667 ICI14/00107, PI17/00384, PI20/00633 and PI24/01785 cofinanciado por la Unión Europea), Plan Nacional de I+D+I 2008- 2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI/2021/000080), Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT) y beca FEIOMM de Investigación Básica 2021.

Agradecimientos: a la Asociación para la Lucha Contra las Enfermedades Renales del Principado de Asturias (ALCER) y a la Asociación de Diabetes del Principado de Asturias (ASDIPAS).

Conflicto de intereses: Jorge B. Cannata-Andía ha recibido subvenciones institucionales y personales de FAES, SPAFARMA y MabXience. El resto de autores declaran no tener conflictos de intereses.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Quirós-Caso C, Carrillo-López N, Fernández-Martín JL, Alonso-Montes C, Cannata-Andía JB. Proteómica aplicada al estudio de la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(4):140-148

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00061

## Correspondencia:

Cristina Alonso Montes. Unidad de Gestión Clínica del Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Avda. de Roma, s/n. 33011 Oviedo  
e-mail: cristinaam.huca@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

En los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) los mecanismos de regulación de la homeostasis del calcio y del fósforo se hallan comprometidos, lo que da lugar a lo que se conoce como "alteraciones minerales y óseas de la enfermedad renal-crónica", más conocidas por su acrónimo en inglés, CKD-MBD (*Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders*), que incluye la calcificación vascular (CV) (1).

La CV se asocia a un incremento de la mortalidad en la población general (2) y principalmente en pacientes con ERC (3,4), en los que es más prevalente que en individuos de la misma edad con función renal preservada (5,6).

La elevada morbimortalidad de la ERC se ha atribuido a factores tradicionales y no tradicionales de riesgo. Igual que en la población general, los factores de riesgo tradicionales (tabaquismo, hipertensión, diabetes y sexo masculino) son responsables en gran medida de la progresión de la CV. Sin embargo, estos factores no son suficientes para explicar la elevada prevalencia de las complicaciones cardiovasculares en pacientes con ERC (7). Entre los factores no tradicionales, la hiperfosfatemia es uno de los más estudiados relacionados con el aumento de CV y de mortalidad en los pacientes con ERC (8,9).

La CV se produce a través de un proceso complejo, activo y regulado en el que intervienen diferentes mecanismos (10-12). Hasta la fecha se han publicado diversos estudios que han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes al proceso de CV (7,10). Sin embargo, la imposibilidad de una detección precoz de la CV ha impulsado la investigación sobre nuevos posibles biomarcadores que puedan utilizarse para el diagnóstico temprano de la CV y que podrían mejorar sus estrategias preventivas y pronósticas. La espectrometría de masas aplicada a estudios de proteómica permite la caracterización del perfil proteico (proteoma) de una muestra biológica de forma rápida en un momento determinado. Por tanto, el objetivo fundamental de este trabajo fue estudiar la expresión diferencial de proteínas asociadas al proceso de CV mediante técnicas de proteómica utilizando un modelo de CV *in vitro* con células de músculo liso vascular (CMLV).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR Y CONDICIONES DE CALCIFICACIÓN

Se utilizó como CMLV la línea celular inmortal A7r5 de aorta de rata (ATCC CRL-1444™). Las células se cultivaron en DMEM (1,8 mM de calcio [Ca] y 1 mM de fos-

fato [P]; Lonza) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (10 %), glutamina (1 %) (Biochrom), aminoácidos no esenciales (ANE) (1 %), penicilina y estreptomycin (1 %) (Biochrom).

Las células A7r5 se sembraron en 20 placas de 15 cm de diámetro (152 cm<sup>2</sup> de superficie). Para el análisis del contenido en calcio se usaron placas de seis pocillos (9,6 cm<sup>2</sup> de superficie). Cuando alcanzaron el 60-70 % de confluencia, se añadieron las condiciones experimentales. Para los experimentos de calcificación se utilizó el medio de cultivo DMEM-F12 para maximizar las diferencias entre las condiciones no calcificantes y calcificantes. Medio no calcificante (control): DMEM-F12 (1 mM de Ca y P) suplementado con BSA (0,1 %), penicilina y estreptomycin (1 %). Medio calcificante: al medio no calcificante se le añadió un estímulo calcificante para que las células A7r5 cambiaran su fenotipo a tipo osteoblasto; en este caso se suplementó con Ca y P hasta una concentración final de 2 y 3 mM, respectivamente. En nuestras condiciones experimentales, concentraciones superiores a 2 mM de calcio y a 3 mM de fosfato producen una precipitación espontánea de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>).

Ambos estudios se realizaron en paralelo y el medio de cultivo se renovó cada dos días.

### CONTENIDO EN CALCIO

El grado de mineralización se valoró mediante tinción con rojo de alizarina a los 6 días de cultivo en las condiciones calcificantes y no calcificantes. Brevemente, las células se lavaron con *phosphate buffer saline* (PBS), se fijaron con formaldehído (10 % en PBS) a 4 °C durante 45 minutos y, tras un lavado con agua desionizada, se tiñeron con rojo de alizarina al 2 % (pH del 4,2) durante 5 minutos.

### ESTUDIO DE PROTEÓMICA

Tras 6 días de cultivo y una vez comprobada la presencia de calcificación, las células se recogieron en 20 mL de PBS y se juntaron para obtener 4 muestras cultivadas en medio no calcificante (C1, C2, C3 y C4) y cuatro muestras del cultivo en MC (P1, P2, P3 y P4). En ambos grupos las muestras se solubilizaron mediante sonicación en tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4 % CHAPS y 30 mM Tris). La concentración total de proteínas se midió utilizando el método Bradford (13) (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante se añadieron 400 pmol de CyDye™ DIGE FluorDyes (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) por 50 µg de proteína (los fluorocromos Cy3 y Cy5 se usaron para la tinción de las muestras y Cy2, para el estándar interno, resultado de la mezcla de la misma cantidad de proteína de las muestras cultivadas en condiciones no calcificantes

y calcificantes). Las muestras se tiñeron por pares (condiciones no calcificantes y calcificantes) para evitar diferencias en el marcaje.

La separación de los extractos de proteínas marcadas se llevó a cabo en geles bidimensionales DIGE (2D *Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*), según las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Primera dimensión: las muestras se cargaron en tiras IPG (24 mm; pH de 3-10 NL) (GE Healthcare). Una vez realizada la primera dimensión, las tiras IPG se incubaron en un tampón de equilibrado (50 mM Tris-HCl, pH de 8,8, 6M urea, 30 % glicerol, 2 % SDS y trazas de azul de bromofenol) que contenía 0,5 % ditiotreitil (DTT) durante 15 minutos y a continuación, en el mismo tampón, con 4,5 % iodoacetamida otros 15 minutos. Para la segunda dimensión, las tiras se cargaron en geles de poliacrilamida (12,5 %) (Ettan DALT six system, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se corrieron (2W/gel) durante 4 horas y 30 minutos hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel. Después, los geles 2D fueron escaneados (EttanDige-rlmager, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) a 100  $\mu\text{m}$  de resolución con  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  de 488/520, 532/580 y 633/670 nm para Cy2, Cy3, y Cy5, respectivamente.

Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa informático DeCyder2D v7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Para la selección de *spots*, la cuantificación del volumen y la normalización de las muestras en el gel se usó el módulo de análisis diferencial (DIA o *differential in-gel analysis*). El módulo de análisis de variación biológica (BVA o *biological variation analysis*) se usó para comparar los *spots* de proteínas entre los distintos geles e identificar aquellos que mostraron diferencias significativas.

Se realizó un gel preparativo en poliacrilamida (12,5 %) con 500  $\mu\text{g}$  de proteína (la misma cantidad de cada muestra) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con Oriole™ Fluorescent Gel Stain (Biorad, Hercules, EE. UU.); la adquisición de las imágenes se realizó mediante un documentador de geles ChemiDoc™ XRS+ (Biorad, Hercules, EE. UU.).

Los *spots* expresados diferencialmente se cortaron manualmente. La digestión de los *spots* se realizó con 12,5 ng/ $\mu\text{l}$  tripsina en 50 mM bicarbonato de amonio durante 12 horas a 37 °C. Para la extracción de los péptidos se utilizó una disolución de ácido fórmico (1 %) y acetonitrilo (50 %) (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.).

## IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos de proteínas se analizaron usando un sistema de nanoHPLC (Ultimate 3000, Dionex/LC Packings) con muestreador automático conectado a un

espectrómetro de masas de trampa iónica (ion Q-trap) (Applied Biosystems) con fuente de nanoelectrospray (ESI). La columna cromatográfica fue C-18 de 75  $\mu\text{m}$  diámetro (Dionex/LC Packings) conectada a un capilar de óxido de silicio para generar el electroespray. El volumen de inyección de la muestra utilizado fue 1  $\mu\text{l}$  y el flujo de la fase móvil, 0,125 mL/min (modo *split*).

Los espectros de masas (MS/MS) obtenidos se analizaron con el *software* Analyst y se enfrentaron a la base de datos SwissProt para la identificación de las proteínas usando el motor MASCOT (MatrixScience). Los parámetros de búsqueda incluyeron una tolerancia de  $\pm 1,2$  Da y posibles modificaciones de las proteínas, como deamidación, carbametilación y oxidación de la metionina. Se consideró que una proteína estaba identificada cuando se detectaron al menos dos péptidos diferentes. La función y la localización de las proteínas identificadas se asignaron de acuerdo con la información depositada en las bases de datos PubMed y ExPasy.

En los datos suplementarios se muestra un esquema de los procesos que se realizaron en el estudio de proteómica (Fig. 1) y las imágenes representativas de los geles marcados con los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 y la imagen resultante de la unión de los tres fluorocromos (Fig. 2).

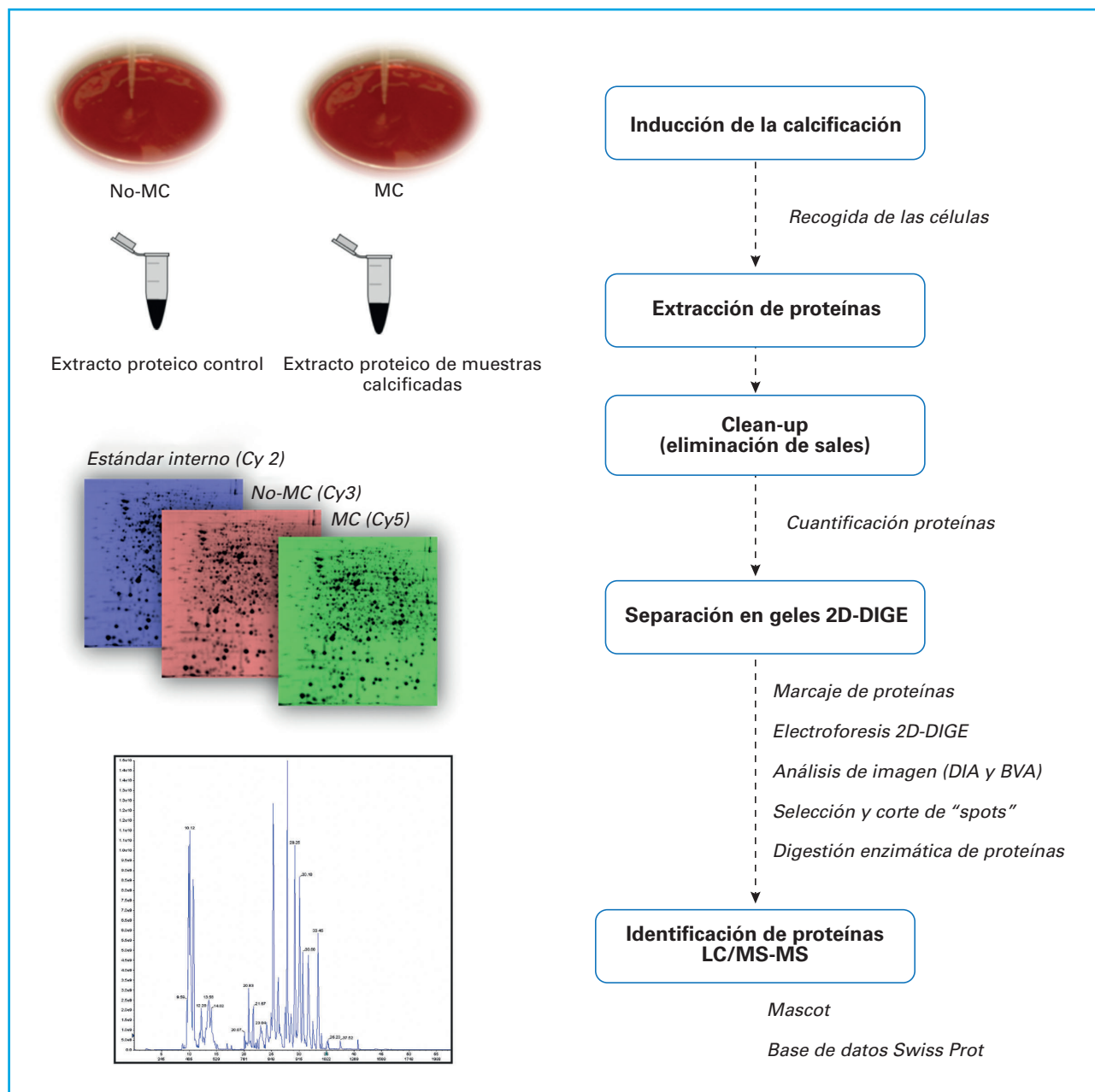
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados del DIGE se realizó con el programa informático DeCyder2D v7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) mediante análisis estadístico T-Student ( $p < 0,05$ ). Se seleccionaron los *spots* de proteínas, que mostraron cambios en la expresión por encima de un umbral de 1,5.

## RESULTADOS

Las condiciones experimentales de cultivo de las CMLV se mantuvieron hasta el sexto día de tratamiento, momento en el que se observó, mediante la tinción con rojo de alizarina, un aumento en la deposición de calcio en los cultivos tratados con medio calcificante (Fig. 3).

Para evaluar la expresión diferencial de proteínas en cultivo de CMLV tratadas con medio calcificante respecto a las células cultivadas en condiciones no calcificantes se llevó a cabo el análisis comparativo 2D-DIGE. Aproximadamente, se detectaron 1860 *spots* de proteínas, de los que 121 se expresaron diferencialmente ( $p < 0,05$ ), y de estos, 101 *spots* se analizaron por LC-ESI-MS/MS (Fig. 4). Los espectros de masas obtenidos se enfrentaron a las bases de datos de modo que una puntuación individual superior a 32 obtenida en el Mascot indicó identidad u homología ( $p < 0,05$ ). Se identificaron un total de 20 proteínas diferentes en 24 *spots*.



**Figura 1.** Tratamiento de las muestras para el análisis proteómico por LC-MS/MS.

De las proteínas identificadas, cuatro aumentaron su expresión en las células cultivadas en medio calcificante respecto a las cultivadas en medio no calcificante (Tabla I). El colágeno de tipo I y la anexina A2 mostraron las mayores diferencias entre las condiciones no calcificantes y calcificantes (ratio 3,49 y 2,17, respectivamente) después de 6 días.

En la tabla II se muestran las 16 proteínas cuya expresión resultó inhibida en células cultivadas en medio calcificante respecto a las cultivadas en medio no calcificante. Las tropomiosinas (cadena beta, alfa-1 y alfa-3) fueron las proteínas que mostraron un mayor

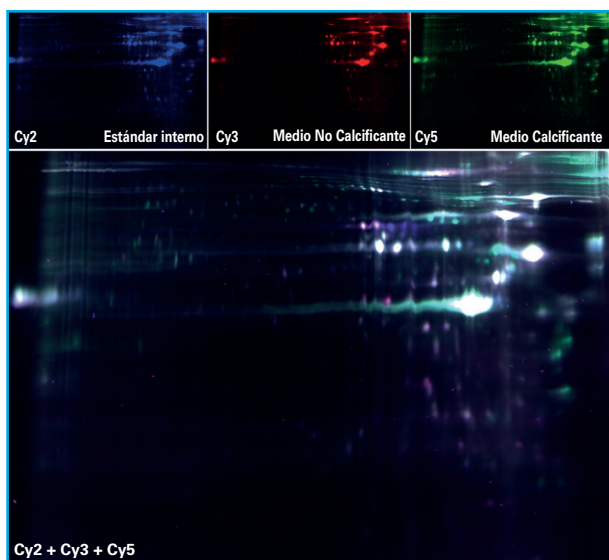
descenso cuando las CMLV se cultivaron en medio calcificante. Además, algunas de ellas se identificaron en varios spots, indicando posibles alteraciones en su estructura o modificaciones postraduccionales. Otras proteínas propias de células musculares que redujeron su expresión fueron la actina, la miosina-9, la desmina o la alfa-actina y otras proteínas del citoesqueleto, como la vimentina o la cadena alfa-1-A de la tubulina.

La proteína disulfuro isomerasa A6 y A1 y la endoplasmína fueron tres chaperonas localizadas en el retículo endoplásmico que redujeron su expresión más de seis, tres y dos veces, respectivamente, en las condiciones

**Tabla I.** Proteínas sobreexpresadas en cultivos de CMVL A7r5 cultivadas en condiciones calcificantes respecto a las cultivadas en condiciones no calcificantes e identificadas por LC-MS/MS

N.º spot	Símbolo MASCOT	Nombre	Función	Localización	p	Tasa de cambio	Score	Masa (Da)	pI	Péptidos
1	CO1A1_RAT	Cadena $\alpha$ -1 colágeno (I)	Estructural	Matriz extracelular	0,0023	3,49	80	137869	9,28	2 (1)
2	ANXA2_RAT	Anexina A2	Unión a Ca e interacción con citoesqueleto	Matriz extracelular	0,018	2,17	111	38654	7,53	3 (3)
3	CH60_RAT	Proteína de choque térmico 60 kDa mitocondrial	Estrés celular (chaperona)	Matriz mitocondrial	0,0072	1,57	136	60917	5,91	2 (2)
4	RCN2_RAT	Reticulocalbina-2	Unión a Ca	RER	0,017	1,54	131	37410	4,23	3 (2)

RER: retículo endoplasmático rugoso. MS Se muestra el número de spot, el símbolo del Mascot, la función y la localización de la proteína y el valor teórico de la masa (Da) y el punto isoeléctrico (pI) obtenido de las bases de datos, es decir, sin tener en cuenta posibles alteraciones o modificaciones postraslacionales. Otros datos del análisis por espectrometría de masas, como el número de péptidos identificados, también fueron incluidos (el número de péptidos únicos se indican entre paréntesis).

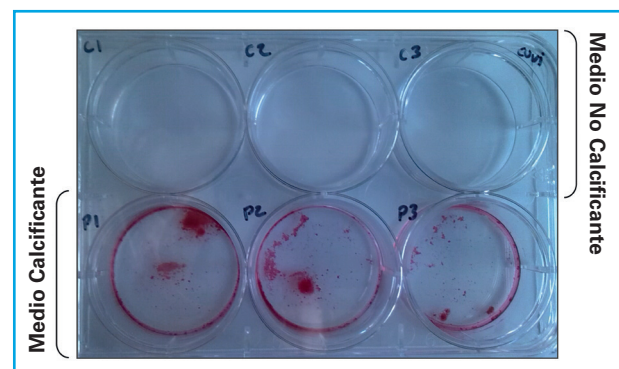


**Figura 2.** Imágenes representativas de los geles resultantes de la electroforesis de las proteínas de las células cultivadas en medio no calcificante (Cy3) y calcificante (Cy5), del estándar interno (Cy2) y el resultante de la unión de los tres (Cy2 + Cy3 + Cy5).

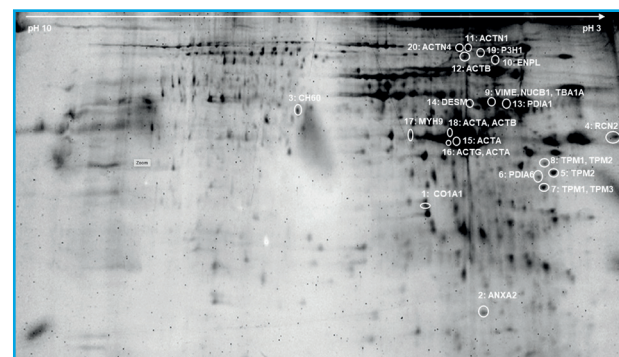
calcificantes respecto a las no calcificantes. También se observó una disminución en la expresión de nucleobindina-1, proteína de unión a calcio localizada en el aparato de Golgi y P3H1 que tiene función estructural y es un componente de la matriz extracelular.

## DISCUSIÓN

La publicación de numerosos estudios sobre CV y ERC ha permitido conocer parcialmente el proceso de CV asociado a ERC. En este sentido, las técnicas



**Figura 3.** Tinción con rojo alizarina de las CMLV tras 6 días de cultivo en condiciones no calcificantes y calcificantes.



**Figura 4.** Mapa del perfil de proteínas expresadas de forma diferencial en cultivos de CMLV en condiciones calcificantes respecto a las no calcificantes. Gel preparativo. Se indica el número de spot y el símbolo MASCOT de las proteínas identificadas.

ómicas (genómica, transcriptómica y proteómica, junto con otras técnicas de análisis) proporcionan una poderosa herramienta para obtener e integrar información biológica del proceso de CV (14).

**Tabla II.** Proteínas inhibidas en cultivos de CMVL A7r5 sometida a tratamiento de calcificación respecto al control

N.º spot	Símbolo MASCOT	Nombre	Función	Localización	p	Tasa de cambio	Score	Masa (Da)	pI	Péptidos
5	TPM2_RAT	Tropomiosina cadena beta	Citoesqueleto (estructural)	Citoplasma	0,0075	-10,4	170	32817	4,66	6 (5)
6	PDIA6_RAT	Proteína disulfuro isomerasa A6	Chaperona	RE	0,016	-6,45	83	48100	4,95	2 (1)
7	TPM1_RAT	Tropomiosina cadena alfa-1	Citoesqueleto (estructural) y adhesión celular	Citoplasma	6 e <sup>-006</sup>	-6,39	299	32661	4,69	11 (9)
	TPM3_RAT	Tropomiosina cadena alfa-3	Citoesqueleto (estructural)	Citoplasma			100	28989	4,75	5 (3)
8	TPM1_RAT	Tropomiosina cadena alfa-1	Citoesqueleto (estructural) y adhesión celular	Citoplasma	0,0055	-6,21	89	32661	4,69	2 (2)
	TPM2_RAT	Tropomiosina cadena beta	Citoesqueleto (estructural)				89	32817	4,66	2 (2)
9	VIME_RAT	Vimentina	Citoesqueleto	Citoplasma	0,018	-5,17	248	53700	5,05	7 (7)
	NUCB1_RAT	Nucleobindina-1	Unión a Ca	Aparato de Golgi			138	53474	5,01	4 (3)
	TBA1A_RAT	Tubulina alfa-1 <sup>a</sup>	Citoesqueleto	Citoplasma			132	50104	4,94	2 (2)
10	ENPL_RAT	Endoplasmina	Chaperona (estrés oxidativo) Unión a Ca	RE	0,02	-3,49	235	92713	4,69	4 (4)
11	ACTN1_RAT	Alfa-actinina-1	Citoesqueleto y motilidad celular interna	Citoplasma	0,0098	-2,63	523	102896	5,23	16 (13)
12	ACTB_RAT	Actina, citoplasmática 1	Citoesqueleto Estructural	Citoplasma	0,0098	-2,63	53	41710	5,21	2 (1)
13	PDIA1_RAT	Proteína disulfuro-isomerasa A1	Chaperona (estrés)	RE	0,016	-2,37	278	56916	4,77	5 (5)
14	DESM_RAT	Desmina	Estructural	Citoplasma	0,0043	-2,32	47	53424	5,21	2 (1)
15	ACTA_RAT	Actina, músculo liso aorta	Citoesqueleto y motilidad celular	Citoplasma	0,032	-2,3	159	41982	5,24	7 (5)
16	ACTG_RAT	Actina, 2 citoplasmática	Citoesqueleto y motilidad celular	Citoplasma	0,032	-2,3	317	41766	5,31	7 (5)
	ACTA_RAT	Actina, músculo liso aorta					145	41982	5,24	7 (3)
17	MYH9_RAT	Miosina-9	Citoesqueleto	Citoplasma	0,017	-2,15	168	226197	5,49	5 (3)
18	ACTA_RAT	Actina, músculo liso aorta	Citoesqueleto y motilidad celular	Citoplasma	0,015	-1,93	127	41982	5,24	4 (3)
	ACTB_RAT	Actina 1 citoplasmática					354	47710	5,24	9 (8)
19	P3H1_RAT	Prolil 3-hidroxilasa 1	Estructural Componente de matriz extracelular	RE Secretado a matriz extracelular	0,05	-1,88	224	82338	5	6 (6)
20	ACTN4_RAT	Alfa-actinina-1	Citoesqueleto y motilidad celular interna	Citoplasma	0,049	-1,5	326	104849	5,27	6 (6)

RE: retículo endoplasmático.

Las proteínas, principales efectores de la mayor parte de los procesos biológicos, son las moléculas más adecuadas para usarse como marcadores o dianas para el tratamiento de las enfermedades debido a una relación estrecha entre las proteínas y los fenotipos. Por este motivo los resultados obtenidos en los estudios proteómicos podrían ser más reproducibles que los de genómica y la transcriptómica (14).

Tras el análisis por espectrometría de masas de los extractos proteicos obtenidos de las CMLV tras 6 días de cultivo en medio calcificante y no calcificante se identificaron 20 proteínas con una fiabilidad elevada.

De las cuatro proteínas identificadas que vieron aumentada su expresión en medio calcificante, la que presentó mayor cambio fue la cadena alfa del colágeno de tipo I. Hay varios trabajos que relacionan el aumento de los niveles del colágeno I y la CV. El colágeno I y III son los principales componentes de la matriz extracelular cuyos niveles se mantienen relativamente estables en condiciones fisiológicas. Sin embargo, niveles elevados de fosfato y de calcio aumentan la expresión de colágeno I, lo que favorece la diferenciación de las CMLV a células de tipo osteoblasto (15). Otra proteína implicada en la biosíntesis y en la maduración del colágeno es la prolil-3-hidroxilasa (P3H1), proteoglicano con actividad enzimática necesaria para la correcta formación de las hélices de colágeno, y cuya expresión se redujo en condiciones calcificantes, coincidiendo con otros trabajos en los que también se analiza el perfil de expresión proteico en CMLV en condiciones calcificantes (16). Además, ratones deficientes en esta proteína mostraron una hipermineralización de la matriz ósea (17). Cambios en las características de la matriz extracelular y en el comportamiento entre los constituyentes de la matriz influyen no solo en las propiedades mecánicas de los tejidos conectivos, sino que contribuyen a modular el fenotipo celular, alterando la expresión de proteínas, la organización del citoesqueleto y, en consecuencia, las rutas de señalización intracelulares.

Otras proteínas del RER cuya expresión se encuentra alterada son las proteínas disulfuro isomerasa A1 y A6 (PDIA1, PDIA 6) implicadas en la formación de enlaces disulfuro, la isomerización y la reducción, actuando junto con chaperonas en la regulación de proteínas mal plegadas. La expresión de estas proteínas se encontró inhibida en condiciones calcificantes, y aunque no hay evidencias del papel de la PDIA6 en la CV, cambios en la expresión de PDIA1 se han asociado con un aumento de la CV y aórtica (18,19).

Dentro de este grupo de proteínas involucradas en el plegamiento y cuya expresión se encontró modificada en este estudio se encuentra la proteína de choque térmico de 60 kDa mitocondrial (CH60) y la endoplasmína (ENPL). La expresión de la proteína HSP 60 en la enfermedad vascular se ha correlacionado con la seve-

ridad del proceso de aterosclerosis y la respuesta antiinflamatoria (20). Varios estudios han demostrado que la expresión de HSP está estrechamente relacionada con el proceso de CV (21-23). Por otra parte, aunque no se ha descrito asociación entre la ENPL y la CV, esta proteína participa en la diferenciación normal de las células musculares cardíacas, lisas y esqueléticas (24), por lo que cambios en su expresión podrían alterar su diferenciación normal.

En el presente estudio también se observó un aumento en dos proteínas de unión a  $\text{Ca}^{+2}$ , como la reticulocalbina-2 (Rcn-2) y la anexina A2. Las proteínas de unión a Ca (CaBP o *calcium binding protein*) a través de dominios específicos participan activamente en muchos procesos celulares, como la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  o rutas de señalización (25). La iniciación de la mineralización requiere la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en las vesículas de la matriz. En concreto, Rcn-2 se ha descrito como un mediador de la CV que aumenta la expresión de marcadores osteogénicos y reduce la de marcadores de fenotipo contráctil en CMLV (26). Por otro lado, las anexinas son una familia de proteínas de unión a membrana dependientes de Ca. Diferentes estudios han mostrado la importancia de las anexinas en la formación de vesículas de la matriz a través de la entrada de Ca y del inicio de la mineralización (27) y las semejanzas existentes entre el proceso de formación de vesículas de matriz a partir de las membranas celulares de las CMLV y los condrocitos, incluyendo el enriquecimiento de las anexinas A2, A5 y A6 como desencadenante del proceso de mineralización (28). Otra proteína de unión a calcio, pero que en este caso se encontró inhibida, es la nucleobindina 1 (NUCB1), localizada en el aparato de Golgi, donde desempeña un importante papel en la homeostasis del Ca (29), aunque hasta el momento no hay trabajos que la asocien con la CV.

Asimismo, en concordancia con trabajos previos llevados a cabo en modelos *in vivo* e *in vitro* de CV y proteómica, los resultados de este trabajo mostraron un descenso en la expresión de proteínas estructurales y en la desregulación de las proteínas del citoesqueleto en las CMLV (16,30,31). En este grupo de proteínas, las que experimentaron mayor descenso fueron las proteínas típicamente musculares (tropomiosina, actina, desmina, miosina, etc.). Este hecho puede interpretarse como una pérdida del fenotipo muscular de las CMLV como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de P y Ca, ya descrito en otros trabajos (32).

Uno de los problemas de la CV es que se diagnostica en etapas tardías, una vez que ya está establecida, y hasta la fecha no se han descrito terapias que se dirijan específicamente al tratamiento de la CV. Además, las técnicas de diagnóstico empleadas, principalmente basadas en técnicas de imagen, pueden estar limitadas debido a factores como el coste, la disponibilidad y la exposición a la radiación (33). Por tanto, la identificación de biomarcadores circulantes mínimamente inva-

sivos, sensibles y específicos que puedan identificar la presencia de CV en etapas tempranas podría presentarse como una alternativa de gran interés. Las proteínas identificadas en este trabajo podrían ayudar en la búsqueda de los biomarcadores que permitan identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar CV, o incluso podrían utilizarse como dianas terapéuticas una vez validados en otros estudios.

Este tipo de estudios presenta una serie de limitaciones, ya que la identificación de proteínas está limitada por la cantidad y la calidad (poca concentración de sales, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) del extracto proteínico obtenido, lo que depende directamente de la eficacia del método de extracción, y la preparación de las muestras, que son fundamentales para la calidad de los resultados (34). En este trabajo, además de las proteínas que se identificaron con alta fiabilidad, también se detectaron otras con una puntuación baja, lo que podría deberse a diferentes razones (35): en los *spots* cortados la concentración de algunas proteínas puede ser muy inferior respecto a otras mayoritarias y las modificaciones postranscripcionales o proteólisis de algunas proteínas podrían alterar la disponibilidad de los péptidos para su identificación. También hay que tener en cuenta que, al tratarse de un modelo de calcificación *in vitro*, no permite una comparación directa entre el estado de ERC y un control sano, ya que la ERC implica factores sistémicos y condiciones fisiológicas que no se capturan completamente en este modelo. Otra limitación a considerar es que la línea celular utilizada fue de rata, por lo que la traslación de los resultados a humanos es limitada. Por otra parte, la caracterización del perfil proteico de las células se ha llevado a cabo en un modelo de calcificación que se mantuvo durante seis días. Análisis en otros puntos del proceso contribuirían a profundizar en el conocimiento de la calcificación vascular. Es posible que en modelos en los que la calcificación pudiese mantenerse durante períodos más prolongados los niveles de algunas proteínas podrían haber sido mayores.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirmaron un cambio en la expresión fenotípica de las células musculares, con un descenso de las proteínas típicamente musculares y del citoesqueleto. Además, fue posible identificar cambios en la expresión de proteínas que previamente no se habían relacionado con la CV y que podrían participar en dicho proceso. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, sería de gran utilidad realizar experimentos complementarios que permitiesen esclarecer el papel de estas y de otras proteínas expresadas diferencialmente en el proceso de CV. Estas proteínas podrían utilizarse como marcadores del estadio precoz de la enfermedad o como moléculas diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan

reducir la morbimortalidad de pacientes con ERC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006;69(11):1945-53.
2. Peng AW, Dardari ZA, Blumenthal RS, Dzay O, Obisesan OH, Iftekhar Uddin SM, et al. Very High Coronary Artery Calcium ( $\geq 1000$ ) and Association With Cardiovascular Disease Events, Non-Cardiovascular Disease Outcomes, and Mortality: Results From MESA. *Circulation*. 2021;143(16):1571-83.
3. Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, Yang W, Rosas SE, Rahman M, et al. Coronary Artery Calcification and Risk of Cardiovascular Disease and Death Among Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA Cardiol* 2017;2(6):635-43.
4. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Díaz-López JB, Díaz-Corte C, Cannata-Andía JB. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol, Dial, Transplant* 2009;24(1):239-46. DOI: 10.1093/ndt/gfn466
5. Nelson AJ, Raggi P, Wolf M, Gold AM, Chertow GM, Roe MT. Targeting Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *JACC Basic Transl Sci* 2020;5(4):398-412. DOI: 10.1016/j.jacbts.2020.02.002
6. Dilsizian V, Gewirtz H, Marwick TH, Kwong RY, Raggi P, Al-Mallah MH, et al. Cardiac Imaging for Coronary Heart Disease Risk Stratification in Chronic Kidney Disease. *JACC Cardiovasc Imaging* 2021;14(3):669-82. DOI: 10.1016/j.jcmg.2020.05.035
7. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *CJASN* 2008;3(2):505-21.
8. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *JASN* 2009;20(2):381-7.
9. Román-García P, Carrillo-López N, Cannata-Andía JB. Pathogenesis of bone and mineral related disorders in chronic kidney disease: key role of hyperphosphatemia. *J Renal Care* 2009;35(Suppl.1):34-8.
10. Cannata-Andía JB, Román-García P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(11):3429-36.
11. Shanahan CM. Vascular calcification-a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(5):1166-9.
12. Zhu D, Mackenzie NC, Farquharson C, Macrae VE. Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:95.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
14. Qian Y, Li L, Sun Z, Liu J, Yuan W, Wang Z. A multi-omics view of the complex mechanism of vascular calcification. *Biomed Pharmacother* 2021;135:111192.
15. Zhao Y, Sun Z, Li L, Yuan W, Wang Z. Role of Collagen in Vascular Calcification. *J Cardiovasc Pharmacol* 2022;80(6):769-78.



16. Carrillo López N, Tuñón LePoultel D, Quirós Caso C, Rodríguez I, Cannata Andía J, Naves Díaz M. Efecto de dosis suprafisiológicas de calcitriol sobre la expresión proteica de células de músculo liso vascular *Rev Osteoporos Metab Miner* 2017;9:130-8.
17. Fratzl-Zelman N, Bächinger HP, Vranka JA, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Bone matrix hypermineralization in prolyl-3 hydroxylase 1 deficient mice. *Bone* 2016;85:15-22.
18. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., Pomerantzeff PM, et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(3):463-70.
19. Pescatore LA, Nolasco P, Farias-Silva E, Jensen L, Fernandes CG, Almeida YE, et al. Abstract 641: Protein Disulfide Isomerase-A1 Overexpression Enhances Vascular Calcification in Mice 2017;37(Suppl.1):A641-A.
20. Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, et al. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics* 2005;5(2):585-96.
21. Ding X, Qiu Y, Wu G, Li S, Cai M, Liang Y, et al. l-thyroxine attenuates extracellular Hsp90 $\alpha$ -induced vascular endothelial calcification in diabetes mellitus, as revealed by parallel metabolic profiles. *Atherosclerosis* 2024;392:117527.
22. Shen Q, Chen Q, Liu Y, Xue X, Shen X, He Q, et al. Aspirin relieves the calcification of aortic smooth muscle cells by enhancing the heat shock response. *Pharmaceutical Biol* 2022;60(1):17-24.
23. Boccardi C, Cecchetti A, Caselli A, Camici G, Evangelista M, Mercatanti A, et al. A proteomic approach to the investigation of early events involved in the activation of vascular smooth muscle cells. *Cell Tissue Res* 2007;329(1):119-28.
24. Wanderling S, Simen BB, Ostrovsky O, Ahmed NT, Vogen SM, Gidalevitz T, et al. GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Mol Biol Cell*. 2007;18(10):3764-75.
25. Zhou X, Cui Y, Luan J, Zhou X, Zhang G, Zhang X, et al. Label-free quantification proteomics reveals novel calcium binding proteins in matrix vesicles isolated from mineralizing Saos-2 cells. *Bioscience Trends* 2013;7(3):144-51.
26. Chang Z, Yan G, Yan H, Zheng J, Liu Z. Reticulocalbin 2 enhances osteogenic differentiation of human vascular smooth muscle cells in diabetic conditions. *Life Sci* 2019;233:116746.
27. Xiao Z, Blonder J, Zhou M, Veenstra TD. Proteomic analysis of extracellular matrix and vesicles. *J Proteomics* 2009;72(1):34-45.
28. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* 2011;109(1):e1-12.
29. Lin P, Le-Niculescu H, Hofmeister R, McCaffery JM, Jin M, Henemann H, et al. The mammalian calcium-binding protein, nucleobindin (CALNUC), is a Golgi resident protein. *J Cell Biol* 1998;141(7):1515-27.
30. Quirós-González I, Román-García P, Alonso-Montes C, Barrio-Vázquez S, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, et al. Lamin A is involved in the development of vascular calcification induced by chronic kidney failure and phosphorus load. *Bone* 2016;84:160-8.
31. Carrillo-López N, Panizo S, Martín-Carro B, Mayo Barrallo JC, Román-García P, García-Castro R, et al. Redox Metabolism and Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Biomolecules* 2023;13(9).
32. De la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, Posada M, Padial LR, Vivanco F, et al. Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer. *J Proteomics* 2013;82:155-65.
33. Smith ER, Hewitson TD, Holt SG. Diagnostic Tests for Vascular Calcification. *Adv Chronic Kidney Dis* 2019;26(6):445-63.
34. Gil-Dones F, Martín-Rojas T, López-Almodóvar LF, Juárez-Tosina R, De la Cuesta F, Álvarez-Llamas G, et al. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Revista Española de Cardiología* 2010;63(1):46-53.
35. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, et al. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2007;6(6):1088-102.

## Artículo Especial

# Diálogos entre investigadores básicos y clínicos: hiperfosfatemia

Minerva Rodríguez García<sup>1</sup>, Manuel Naves Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área Gestión Clínica de Nefrología. <sup>2</sup>Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias. Oviedo

### Resumen

La regulación fisiológica del metabolismo mineral viene determinada por los niveles séricos de fósforo, FGF23, Klotho, PTH, calcidiol y calcio. Aunque haya un exceso de fósforo, cuando la función renal es normal existe un adecuado funcionamiento del riñón, hueso, tejido paratiroideo e intestino, órganos todos ellos implicados en la regulación del metabolismo mineral.

El problema es cuando la función renal se encuentra comprometida ya que los reguladores del metabolismo mineral se ven alterados con un descenso de Klotho soluble, incrementos de PTH y FGF23 y posterior descenso del calcidiol y calcio. Todo ello va a conducir al desarrollo de alteraciones vasculares y óseas, con consecuencias muy importantes en la morbimortalidad de los pacientes renales.

Desde el punto de vista terapéutico, en los pacientes con enfermedad renal crónica, la medida inicial para el control de hiperfosfatemia es restringir la ingesta dietética de fósforo. En caso de no lograrlo, disponemos de los captadores de fósforo que actúan limitando la absorción intestinal de este ion.

Por tanto y a modo de resumen, es crucial subrayar la importancia de identificar y tratar adecuadamente la hiperfosfatemia para lograr una mejora integral en los resultados clínicos, incluyendo una reducción significativa de la mortalidad.

#### Palabras clave:

Fósforo.  
Enfermedad renal.  
Morbimortalidad.

### SIGNIFICADO FISIOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DE LA HIPERFOSFATEMIA

La regulación fisiológica del metabolismo mineral viene determinada por varios factores que van a contribuir en mayor o menor medida a su mantenimiento y regulación. En el caso de la hiperfosfatemia, el factor determinante serán los niveles séricos de fósforo, pero también tendrán un papel importante los niveles séri-

cos de FGF23, Klotho, PTH, calcidiol y calcio. Cuando la función renal es normal, el organismo es eficiente y existe un adecuado funcionamiento del riñón y del resto de órganos implicados en la regulación del metabolismo mineral, como son el hueso, el tejido paratiroideo y el intestino. El problema es cuando la función renal se encuentra comprometida, ya que la imposibilidad de eliminar eficientemente el fósforo hace que este se acumule. A medida que progresa la enfermedad renal, los niveles de los distintos reguladores del

Recibido: 16/09/2024 • Aceptado: 26/09/2024

Agradecimientos: este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Fondo de Investigación Sanitaria (PI16/00637, PI17/00715, PI19/00532, PI20/00753 y PI22/00195), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (IDI-2018-000152, IDI-2021-000080, IDE/2024/000706), Fundación Renal Ínigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Retic REDinREN del ISCIII (RD16/0009/0017 y RD16/0009/0018) y RICORS2040 (Kidney Disease; RD21/0005/0019).

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Rodríguez García M, Naves Díaz M. Diálogos entre investigadores básicos y clínicos: hiperfosfatemia. Rev Osteoporos Metab Miner 2024;16(4):149-153

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00062

#### Correspondencia:

Manuel Naves Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo. Hospital Universitario Central de Asturias. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Avenida de Roma, s/n. 33011 Oviedo  
e-mail: mnaves.huca@gmail.com

metabolismo mineral se van viendo alterados. Aunque aún existe controversia, parece que en primer lugar se produce el descenso de Klotho soluble. Además, el exceso de fósforo conduce a incrementos de PTH y FGF23, con el posterior descenso del calcidiol y calcio (1-3). Todo ello va a conducir al desarrollo de alteraciones vasculares y óseas, con consecuencias muy importantes en la morbimortalidad de los pacientes renales.

Aunque a nivel clínico y experimental resulta muy difícil separar el papel de cada factor, dadas las interconexiones tisulares, los modelos animales han permitido precisar con algo más de detalle la contribución de cada uno de ellos y su peso específico.

Uno de los principales reguladores del fósforo es FGF23, que se expresa mayoritariamente en el tejido óseo y es sintetizado por los osteocitos (4). Los osteocitos son capaces de detectar los excesos de fosfato estimulando la síntesis y secreción de FGF23 a través del receptor 1, FGFR1 (5), y el transportador de fosfato Pit2 (6). De esta forma, FGF23 llega a su receptor en los túbulos renales, donde junto con la acción de Klotho, da lugar a la internalización y degradación del transportador de fósforo NaPi2a, provocando una disminución en su reabsorción y, por lo tanto, aumentando su excreción. Además, FGF23 puede actuar a nivel cardiaco: en modelos experimentales se ha observado que FGF23 actúa de forma independiente del fósforo y sin necesidad de utilizar Klotho como cofactor, promoviendo daño cardiaco a través de su unión a su receptor FGFR4 por la vía de la calcineurina (7,8). Sin embargo, a nivel vascular, FGF23 no ha demostrado poseer este efecto deletéreo (9).

La deficiencia o ausencia de Klotho en modelos experimentales ha demostrado un aumento de la hipertrofia y fibrosis cardiaca, tanto a nivel molecular como histológico (10,11). De forma similar, la ausencia de Klotho produce un fenotipo de envejecimiento acelerado a nivel vascular y óseo (12). La deficiencia de Klotho también ha mostrado alteraciones vasculares y óseas (3,13). Por el contrario, la adición de klotho soluble en modelos experimentales es capaz de prevenir o revertir el daño cardiaco (10).

Modelos experimentales de paratiroidectomía con hiperfosfatemia, manteniendo los niveles de PTH en rangos normales mediante su administración exógena, han demostrado que el fósforo por sí solo es capaz de ejercer un daño vascular y óseo. Sin embargo, este efecto es muy superior cuando la PTH está muy elevada (14), lo que se traduce en un deterioro óseo a nivel de hueso trabecular, pero sobre todo cortical (15). Además, tiene lugar un incremento del contenido de calcio en las arterias con un aumento exacerbado en la expresión de genes osteogénicos, como Runx2 u osterix, junto con bruscos descensos en la expresión de genes de fenotipo vascular, como alfa actina (15). Los aumentos de PTH también se han asociado con

alteraciones a nivel cardiaco, donde se ha observado incremento de la hipertrofia y particularmente de la fibrosis cardiaca a nivel histológico y molecular (elevaciones en la expresión génica de colágeno I, TGB beta o fibronectina) (16).

Estudios experimentales y clínicos han mostrado que el déficit de vitamina D o calcidiol se asocia a un incremento de las alteraciones cardiovasculares (17,18). Sin embargo, hasta la fecha, es el hueso el único órgano donde la vitamina D ha demostrado causalidad siendo un tratamiento efectivo para disminuir el riesgo de fractura de cadera y fracturas no vertebrales (19).

Menos claro es el papel del calcio. Probablemente el manejo más fino del organismo para mantener la homeostasis de calcio hace mucho más sutiles los efectos a nivel sistémico. En presencia de enfermedad renal crónica e hiperfosfatemia, los descensos de calcio podrían tener un efecto más potente que sus incrementos, principalmente a nivel cardiovascular (20), probablemente en parte por el efecto directo que la hipocalcemia ejerce sobre la glándula paratiroidea estimulando la síntesis y secreción de PTH (21).

Son los estudios *in vitro* los que han ido arrojando más luces sobre los efectos sistémicos de la hiperfosfatemia y los mecanismos fisiopatológicos involucrados. A nivel vascular se confirman los estudios experimentales: el efecto aditivo de los incrementos de fósforo y suficiente calcio disponible, pero sobre todo de la PTH, sobre el daño vascular, ya que promueven la calcificación vascular a través del aumento en la expresión de genes típicamente osteogénicos (Runx2, osterix, fosfatasa alcalina) y del descenso drástico de genes relacionados con el fenotipo vascular y contráctil, como la alfa actina (15). A este nivel, el papel de Klotho soluble es fundamental para el mantenimiento de la salud vascular, ya que su adición a modelos *in vitro* en células de músculo liso vascular sometidas a estímulos calcificantes previene el incremento en la expresión de genes típicamente osteogénicos, reduce el depósito extracelular de calcio y previene las pérdidas de alfa actina, principal proteína para el mantenimiento del fenotipo vascular (3). Todavía existen dudas sobre el mecanismo a través del cual podría ejercer este efecto protector, pero hay algunos datos que apuntan a que uno de estos mecanismos podría ser el aumento del flujo autofágico, que prevendría el proceso de calcificación vascular (3), aunque se necesitan más estudios que demuestren esta causalidad.

Recientemente, nuestro grupo ha mostrado que esta pérdida de fenotipo vascular con predisposición a la calcificación vascular se debe fundamentalmente a la pérdida del microRNA 145, microRNA mayoritario en la pared vascular y responsable de mantener su fenotipo contráctil (22). Estos resultados revelados inicialmente en animales nefrectomizados con hiperfosfatemia, pero también en animales con función renal nor-

mal e hiperfosfatemia, se han confirmado *in vitro* en células de músculo liso vascular sometidas a estímulos calcificantes por exceso de fósforo, calcio y/o PTH (23). Estos resultados podrían tener una implicación clínica importante, ya que, en población general la expresión de este microRNA presenta una curva ROC con un área bajo la curva de 0,83 (22), mostrando que el microRNA 145 presentó un alto poder predictivo de la calcificación vascular. Estos resultados novedosos sugieren que la combinación de biomarcadores no invasivos, poco costosos y sencillos constituiría un importante predictor del daño vascular en la población no solo renal sino también general.

La regulación de los niveles de microRNA 145 por parte de la vitamina D constituye otro aspecto revelador, ya que la vitamina D aumenta la expresión del microRNA 145 (24). Por tanto, el mantenimiento de los niveles de calcidiol podría repercutir positivamente sobre la salud vascular a través del mantenimiento de los niveles del microRNA 145 (25), como otros muchos estudios clínicos han confirmado tanto en población renal como general.

## DETECCIÓN, TRASCENDENCIA Y MANEJO TERAPÉUTICO

La hiperfosfatemia se origina cuando el fósforo que entra en el fluido extracelular excede la proporción en la que puede ser excretado. Una de las causas más comunes de la disminución de excreción de fósforo es la enfermedad renal aguda y crónica. Otras causas son: la movilización de fósforo intracelular al fluido extracelular (la acidosis láctica, la cetoacidosis diabética o la hiperglucemia grave), la sobrecarga aguda de fósforo, tanto endógena como exógena (síndrome de lisis tumoral, necrosis muscular o ingesta de gran cantidad de laxantes), o el incremento de la resorción tubular de fosfato (hipoparatiroidismo, acromegalia, inhibidores del receptor del factor de crecimiento fibroblástico, vitamina D o calcinosis tumoral).

La hiperfosfatemia se ha relacionado con disfunción endotelial, arteriosclerosis y calcificación de la túnica media arterial tanto generalizada, como coronaria o a nivel de válvulas cardiacas, así como con fibrosis miocitaria originando rigidez de la pared ventricular, disfunción diastólica, insuficiencia cardiaca y génesis de arritmias (26).

Existe amplia evidencia científica que relaciona el fósforo sérico elevado con el aumento de eventos y mortalidad cardiovascular tanto entre la población general (27), como en la población con enfermedad renal crónica (20,28) y, especialmente, entre la población en diálisis (población de máximo riesgo de desarrollo de hiperfosfatemia) (29,30). Actualmente se considera la hiperfosfatemia como un factor de riesgo cardiovascular no tradicional.

En pacientes en hemodiálisis, se ha descrito una relación en forma de U entre los niveles de fósforo sérico y la mortalidad; tanto valores por debajo como por encima del rango recomendado están asociados con un incremento en el riesgo de mortalidad. Además, la mejoría del control del fósforo sérico entre los pacientes con valores basales elevados se asocia de forma significativa con una mejor supervivencia durante un periodo seguimiento de 3 años (30).

Hay que considerar que los niveles de fósforo sérico pueden fluctuar a lo largo del día, con aumentos posprandiales. Por ello, el fósforo sérico en ayunas es el que se ha asociado más estrechamente con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular, tanto en la población general como en pacientes con enfermedad renal crónica (31).

Por otro lado, las dietas altas en fósforo se han relacionado con el aumento de presión arterial tanto por los mecanismos previamente mencionados (arteriosclerosis, rigidez pared arterial), como por su efecto en el aumento de reabsorción de sodio a nivel tubular renal y la activación de sistema nervioso simpático (26).

La hiperfosfatemia también se ha asociado con el desarrollo de enfermedad renal crónica en individuos sanos, así como con la progresión de la enfermedad en pacientes que ya la presentan (32).

Además, en un estudio reciente se han relacionado los valores de fósforo sérico en pacientes en hemodiálisis con un incremento del riesgo de fracturas por fragilidad, sugiriendo que el fósforo sérico podría ser un nuevo marcador de riesgo para fracturas óseas (33).

El enfoque terapéutico varía según se trate de una hiperfosfatemia aguda o crónica. En casos de hiperfosfatemia aguda, la resolución puede lograrse en 6 a 12 horas si la función renal permanece intacta. La excreción de fósforo puede incrementarse con infusión salina, aunque esto podría reducir la concentración de calcio sérico por dilución, lo cual requiere precaución, especialmente en presencia de hipocalcemia grave, debido al riesgo vital asociado. En casos de hipocalcemia grave sintomática y deterioro de la función renal, la hemodiálisis puede ser necesaria para un manejo efectivo.

En los pacientes con enfermedad renal crónica, la medida inicial para el control de hiperfosfatemia es restringir la ingesta dietética de fósforo (34) que se clasifica en dos tipos: orgánico, que se encuentra principalmente en alimentos ricos en proteínas, e inorgánico, presente en aditivos, bebidas carbonatadas y productos procesados. El fósforo inorgánico es menos relevante biológicamente, pero presenta una tasa de absorción considerablemente elevada.

Es muy importante el control de los niveles de fósforo y del hiperparatiroidismo secundario de estos pacientes por todas las implicaciones ya mencionadas.

Los captosres de fósforo actúan limitando la absorción intestinal de este ion (34). Se clasifican, en función de su contenido en calcio, en captosres que contienen calcio como carbonato o acetato cálcico y captosres libres de calcio como carbonato de sevelámero, carbonato de lantano y oxihidróxido sucroférico, teniendo que ser administrados con las comidas para ser efectivos.

Por lo tanto, es crucial subrayar la importancia de identificar y tratar adecuadamente la hiperfosfate-mia para lograr una mejora integral en los resultados clínicos, incluyendo una reducción significativa de la mortalidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, et al. Reduced renal  $\alpha$ -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *Plos One* 2014;9(1):e86301. DOI: 10.1371/journal.pone.0086301
- Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Review Annu Rev Physiol* 2013;75:503-33. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183727
- Martín Virgala J, Fernández-Villabrille S, Martín-Carro B, Tamar-gó-Gómez I, Navarro-González JF, Mora-Fernández C, et al. Serum and Urinary Soluble  $\alpha$ -Klotho as Markers of Kidney and Vascular Impairment. *Nutrients* 2023;15(6):1470. DOI: 10.3390/nu15061470
- Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1637-47. DOI: 10.1681/ASN.2007010068
- Takashi Y, Kosako H, Sawatsubashi S, Kinoshita Y, Ito N, Tsoumpra MK, et al. Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(23):11418-27. DOI: 10.1073/pnas.1815166116
- Bon N, Frangi G, Sourice S, Guicheux J, Beck-Cormier S, Beck L. Phosphate-dependent FGF23 secretion is modulated by PiT2/Slc20a2. *Mol Metab* 2018;11:197-204. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.02.007
- Faul C, Amaral AP, Oskoueï B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy *J Clin Invest* 2011;121:4393-408. DOI: 10.1172/JCI46122
- Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, et al. Activation of cardiac fibroblast growth factor Receptor 4 causes left ventricular hypertrophy. *Cell Metabolism* 2015;22:1020-32. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.09.002
- Lindberg K, Olauson H, Amin R, Ponnusamy A, Goetz R, Taylor RF, et al. Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *Plos One* 2013;8:e60658. DOI: 10.1371/journal.pone.0060658
- Chen K, Wang S, Sun QW, Zhang B, Ullah M, Sun Z. Klotho deficiency causes heart aging via impairing the Nrf2-GR pathway. *Circ Res* 2021;128(4):492-507. DOI: 10.1161/CIRCRES-AHA.120.317348
- Xie J, Yoon J, An SW, Kuro-o M, Huang CL. Soluble Klotho protects against uremic cardiomyopathy independently of fibroblast growth factor 23 and phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(5):1150-60. DOI: 10.1681/ASN.2014040325
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51. DOI: 10.1038/36285
- Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(1):124-36. DOI: 10.1681/ASN.2009121311
- Neves KR, Gracioli FG, dos Reis LM, Gracioli RG, Neves CL, Magalhães AO, et al. Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int* 2007;71(12):1262-70. DOI: 10.1038/sj.ki.5002241
- Carrillo-López N, Panizo S, Alonso-Montes C, Martínez-Arias L, Avello N, Sosa P, Dusso AS, et al. High-serum phosphate and parathyroid hormone distinctly regulate bone loss and vascular calcification in experimental chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2019;34(6):934-41. DOI: 10.1093/ndt/gfy287
- Martínez-Arias L, Panizo-García S, Martín-Virgala J, Martín-Carro B, Fernández-Villabrille S, Avello-Llano N, et al. Contribución de fósforo y PTH al desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardiaca en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica. *Nefrología* 2021;1(6):640-51. DOI: 10.1016/j.nefro.2021.02.001
- 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(3):1177-82. DOI: 10.1007/s00198-011-1550-0
- Schmidt N, Brandsch C, Kühne H, Thiele A, Hirche F, Stangl GI. Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice. *PLoS One* 2012;7(4):e35316. DOI: 10.1371/journal.pone.0035316
- Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005;293(18):2257-64. DOI: 10.1001/jama.293.18.2257
- Naves-Díaz M, Passlick-Deetjen J, Guinsburg A, Marelli C, Fernández-Martín JL, Rodríguez-Puyol D, et al. Calcium, phosphorus, PTH and death rates in a large sample of dialysis patients from Latin America. The CORES Study. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1938-47.
- Berdud I, Martín-Malo A, Almaden Y, Aljama P, Rodríguez M, Felsenfeld AJ. The PTH-calcium relationship during a range of infused PTH doses in the parathyroidectomized rat. *Calcif Tissue Int* 1998;62(5):457-61. DOI: 10.1007/s002239900460
- Fernández Villabrille S, Martín Carro B, Martín Virgala J, Alonso Montes C, Palomo Antequera C, García Castro R, et al. MicroRNA-145 and microRNA-486 are potential serum biomarkers for vascular smooth muscle cells osteogenic differentiation. *Nephrol Dial Transplant* 2023;38(7):1729-40. DOI: 10.1093/ndt/gfad027
- Fernández-Villabrille S, Martín-Carro B, Martín-Virgala J, Alonso-Montes C, Fernández-Fernández A, Martínez-Salgado C, et al. Phosphorus May Induce Phenotypic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells through the Reduction of microRNA-145. *Nutrients* 2023;15(13):2918. DOI: 10.3390/nu15132918
- Carrillo-López N, Panizo S, Arcidiacono MV, de la Fuente S, Martínez-Arias L, Ottaviano E, et al. Vitamin D treatment prevents uremia-induced reductions in aortic microRNA-145 attenuating osteogenic differentiation despite hyperphosphatemia. *Nutrients* 2022;14(13):2589. DOI: 10.3390/nu14132589

25. Caus M, Alonso-Montes C, Fernandez-Martin JL, Marti-Antonio M, Bozic M, Valdivielso JM. Vitamin D receptor from VSMCs regulates vascular calcification during CKD: A potential role for miR-145a. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2023;43(8):1533-48. DOI: 10.1161/ATVBAHA.122.318834
26. Rroji M, Figurek A, Spasovski G. Should we consider the cardiovascular system while evaluating CKD-MBD? *Toxins* 2020;12:36. DOI: 10.3390/toxins12030140
27. Torrijo Belanche C, Moreno Franco B, Muñoz Cabrejas A, Calvo Galiano N, Casasnovas JA, Sayón-Orea C, et al. High serum phosphate is associated with cardiovascular mortality and subclinical coronary atherosclerosis: systematic review and meta-Analysis. *Nutrients* 2024;16(11):1599. DOI: 10.3390/nu16111599
28. Palmer SC, Hayen A, Macaskill P, Pellegrini F, Craig JC, Elder GJ, et al. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease a systematic review and meta-analysis. Vol. 305. *JAMA* 2011;305(11):1119-27. DOI: 10.1001/jama.2011.308
29. Fernández-Martín JL, Dusso A, Martínez Cambor P, Dionisi MP, Floege J, Ketteler M, et al. Serum phosphate, optimal timing, and range associated with patient survival in haemodialysis: the COSMOS study. *Nephrol Dial Transplant* 2019;34:673-81. DOI: 10.1093/ndt/gfy093
30. Fernandez-Martin JL, Martinez-Cambor P, Dionisi MP, Floege J, Ketteler M, London G, et al. Improvement of mineral and bone metabolism markers is associated with better survival in haemodialysis patients: The COSMOS study. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30(9):1542-51. DOI: 10.1093/ndt/gfv099
31. Vervloet MG, Sezer S, Massy ZA, Johansson L, Cozzolino M, Fouque D. The role of phosphate in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2017;13(1):27-38. DOI: 10.1038/nrneph.2016.164
32. Chang WX, Xu N, Kumagai T, Shiraishi T, Kikuyama T, Omizo H, et al. The impact of normal range of serum phosphorus on the incidence of end-stage renal disease by a propensity score analysis. *PLoS One* 2016;11(4):e0154469. DOI: 10.1371/journal.pone.0154469
33. Barrera-Baena P, Rodríguez-García M, Rodríguez-Rubio E, González-Llorente L, Ortiz A, Zoccali C, et al. Serum phosphate is associated with increased risk of bone fragility fractures in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2023;39(4):618-26. DOI: 10.1093/ndt/gfad190
34. Torregrosa JV, Bover J, Rodríguez Portillo M, González Parra E, Arenas MD, Caravaca F, et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Nefrología para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con enfermedad renal crónica: 2021 (SEN-MM). *Nefrología* 2022;42:1-37. DOI: 10.1016/j.nefro.2022.03.007