

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia

dell'Insufficienza Renale

Ciclo XXIII

***EFFETTI DELLA VITAMINA D SUI LIVELLI DI  
FETUINA A IN PAZIENTI EMODIALIZZATI E SU  
LINEE CELLULARI DI EPATOCITI STIMOLATI***

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Carlo Buzio

Tutor:

Chiar.mo Prof. Carlo Buzio

Dottorando: Dott. Danio Somenzi



## Indice

Introduzione	Pag. 1
Scopo del progetto	Pag. 36
Fase Clinica	Pag. 37
Fase Preclinica	Pag. 39
Elaborazione Dati	Pag. 52
Discussione Dati	Pag. 66
Conclusioni	Pag. 70
Bibliografia	Pag. 75

# Introduzione

## **Rene e fattori di rischio cardiovascolare**

Le patologie cardiovascolari rappresentano la più comune causa di morte nei soggetti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) (1). Analogamente, il rischio di patologie cardiovascolari è significativamente maggiore nei pazienti in terapia dialitica rispetto ai non nefropatici (2). Il 20% dei pazienti sottoposti a terapia sostitutiva della funzione renale muore nel primo anno e di questi il 25% va incontro ad una morte improvvisa (3). Quella cardiovascolare è sicuramente la prima causa di morte nei pazienti in terapia sostitutiva della funzione renale (4), (5), che possono presentare sindromi coronariche acute vista la grave aterosclerosi coronarica cui sono soggetti (6), (7), (8). D'altra parte la persistenza nel periodo post-trapianto renale di specifiche cause cardiovascolari di morte, come l'infarto miocardico, nella stessa incidenza pre-trapianto, evidenzia l'importanza di fattori di rischio preesistenti (9).

Oltre ai classici fattori di rischio cardiovascolare quali l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, l'obesità, il diabete e l'abitudine tabagica, negli ultimi anni hanno acquisito importanza anche altri fattori non tradizionali. Tra i più significativi vanno ricordati alcuni marcatori di infiammazione

(interleuchine, molecole di adesione vascolare, il fibrinogeno, la proteina C reattiva) ed alcuni polimorfismi genici dell'angiotensin converting enzyme (ACE) come il polimorfismo I/D (10), (11). Un ulteriore fattore di rischio cardiovascolare che non può essere annoverato tra quelli classici ma che nella popolazione nefropatica è estremamente importante è rappresentato dalle alterazioni del metabolismo calcio-fosforico (12).

L'insufficienza renale cronica si associa quindi nello specifico ad alterazioni del metabolismo calcio-fosforo che possono esitare in un quadro patologico noto come iperparatiroidismo secondario (IPS). Esso costituisce una precoce complicanza dell'insufficienza renale cronica che avanza in funzione della diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare e di conseguenza degli stadi della malattia renale (13).

Il primum movens di una complessa concatenazione di alterazioni ormonali ed elettrolitiche è costituito dalla progressiva perdita da parte dei reni della capacità di idrossilare in posizione 1alfa il precursore della vitamina D, impedendone quindi la successiva conversione in calcitriolo, l'attivatore endogeno del recettore per la vitamina D. I bassi livelli di vitamina D diidrossilata sono infine responsabili del progressivo ma precoce sviluppo dell'iperparatiroidismo secondario attraverso la diminuzione di assorbimento intestinale di calcio e la conseguente ipocalcemia, l'aumentata

sintesi ed esocitosi di paratormone (PTH) ed infine l'ipertrofia e la proliferazione delle cellule paratiroidee. I bassi livelli di calcitriolo e quelli più elevati di PTH possono riscontrarsi già negli stadi 2 e 3 dell'insufficienza renale cronica, sebbene i livelli sierici di calcio e fosforo rientrino ancora nei normali range (14).

L'iperparatiroidismo secondario è associato a molte complicazioni tra cui la malattia renale ossea, le calcificazioni vascolari e dei tessuti molli, la patologia cardiovascolare e l'aumento di mortalità. Anche livelli moderatamente elevati di PTH possono aumentare il rimodellamento osseo portando alla malattia ossea ad alto turnover (osteite fibrosa) nonché alla perdita di densità ossea e della conseguente integrità strutturale. L'alto turnover osseo indotto da PTH insieme col riassorbimento si riflette nella perdita di osso minerale a causa di rilascio di calcio e fosforo dall'osso stesso, aumentando così il rischio di calcificazioni vascolari e dei tessuti molli. L'obiettivo terapeutico consiste nel prevenire o per lo meno ritardare lo sviluppo potenzialmente irreversibile dell'iperplasia delle ghiandole paratiroidee e della malattia minerale ossea, preservando pertanto il normale equilibrio osseo e diminuendo la morbilità e mortalità a lungo termine.

Il trattamento dell'IPS in pazienti con insufficienza renale moderato-severa e nei pazienti sottoposti a trattamento dialitico include il controllo del

fosfato sierico attraverso restrizioni dietetiche e l'uso dei chelanti del fosfato alimentare, l'assunzione di vitamina D attiva e più recentemente di terapia calciomimetica (12).

Considerando che nella maggior parte dei casi l'insufficienza renale cronica progredisce nel corso di anni, è verosimile che quanto più precocemente si inizi con la prevenzione e/o il trattamento dell'iperparatiroidismo secondario tanto minori saranno le alterazioni calcio-fosforiche e del PTH e di conseguenza tanto minore sarà il rischio cardiovascolare.

### **Omeostasi Calciofosforica**

Il calcio ed il fosforo sono i costituenti principali dell'osso, in esso presenti sotto forma di cristalli di idrossiapatite. Il calcio è il catione principale dell'organismo le cui riserve raggiungono circa un chilogrammo. Per il 98% si ritrova nelle ossa, per l'1% all'interno delle cellule e per un restante 1% nel plasma: di quest'ultimo il 50% è legato alle proteine plasmatiche, il 45% è presente sotto forma di calcio libero ionizzato e per la parte restante (5%) è legata ai citrati. Del calcio introdotto con la dieta (all'incirca 800-1000 mg), il 50% viene assorbito nell'intestino mentre l'altro 50% si ritrova nelle feci insieme alla quota secreta. L'assorbimento

del calcio a livello intestinale avviene sia attivamente, grazie all'intervento della vitamina D, che passivamente: nel duodeno operano entrambi questi meccanismi, nel digiuno e nell'ileo soprattutto il meccanismo passivo, mentre nell'intestino cieco si ritrova quello attivo. L'estrusione del calcio, anch'essa regolata dalla vitamina D, avviene nella parte basolaterale della membrana dell'epatocita grazie all'intervento di una adenosintrifosfatasi che opera un trasporto attivo in parte in scambio con il sodio. Solo il calcio ionizzato può filtrare a livello renale e per il 99% viene riassorbito attivamente nel tubulo contorto prossimale, nell'ansa di Henle e nel tubulo contorto distale. In quest'ultima sede il processo è però limitato da un meccanismo massimale di trasporto regolato dal PTH.

Il secondo elettrolita coinvolto nell'omeostasi dell'osso è il fosforo, la cui quantità nell'organismo è di circa 600g. Per l'85% si trova nelle ossa sotto forma di fosfato inorganico; in forma inorganica è presente anche nel plasma come  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ed  $\text{HPO}_4^{2-}$ . In forma organica si ritrova nelle cellule ove è esterificato, legato ai lipidi di membrana e contenuto nelle molecole di adenosintrifosfato (ATP). Del fosforo introdotto con la dieta (all'incirca 1000-1200 mg), i 2/3 vengono assorbiti nell'intestino grazie all'azione di vitamina D e PTH. A livello renale il fosforo filtra liberamente e viene assorbito per il 90% nel tubulo contorto prossimale grazie a meccanismi

limitati da un trasporto massimale con un effetto del PTH inibente il suo riassorbimento.

Le alterazioni della calcemia e della fosforemia sono frequenti nel paziente nefropatico in quanto la funzione renale, il metabolismo osseo e l'omeostasi minerale calcio-fosforica sono strettamente correlati grazie all'intervento di ormoni, citochine e farmaci che vengono integralmente coinvolti durante la progressione dell'insufficienza renale cronica.

### **Vitamina D e recettore VDR**

La vitamina D3 è un ormone steroideo, presente nell'organismo grazie all'assorbimento intestinale da fonti alimentari animali o vegetali ma anche originato nella cute per effetto della luce ultravioletta sul 7-deidrocolesterolo (o Provitamina D3). La Vitamina D promuove l'assorbimento intestinale e renale del calcio ed è indispensabile per lo sviluppo ed il mantenimento della massa ossea. Essa è anche coinvolta nei processi di controllo della proliferazione e della differenziazione cellulare, nonché nella immunomodulazione. Nel sistema immunitario, ad esempio, la vitamina D promuove la differenziazione dei monociti ed inibisce la proliferazione dei linfociti attraverso l'increzione di citochine come IL-2 , l'IL12 e l'

interferone  $\gamma$  (15). In alcuni tipi di cellule di carcinoma, la vitamina D ha dimostrato un'attività antiproliferativa (16).

La vitamina D<sub>3</sub> viene trasportata al fegato dalla vitamin D binding protein ed in questa sede viene convertita a 25(OH)D<sub>3</sub> dall'enzima microsomiale e mitocondriale 25-idrossilasi. Il 25(OH)D<sub>3</sub> viene trasportato dalla vitamin D binding protein al tubulo prossimale del rene, dove viene convertito a 1,25(OH)D<sub>3</sub> o calcitriolo dall'enzima 1 alfa-idrossilasi Fig.1.

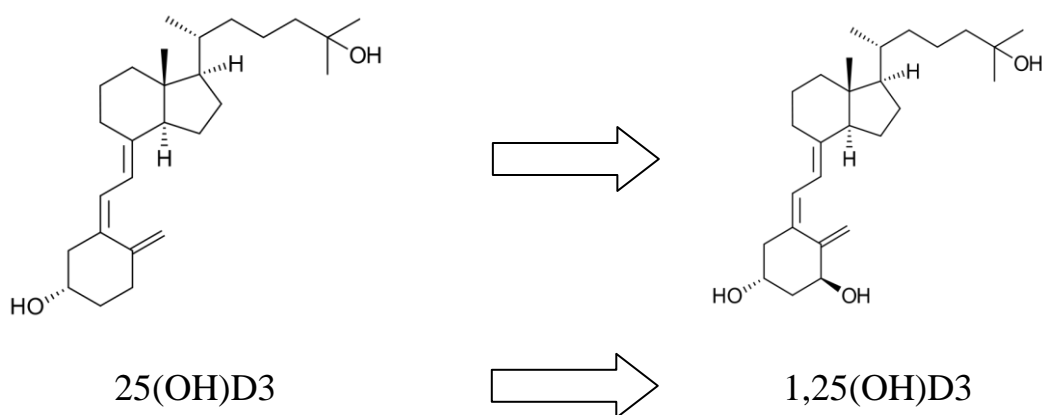


Fig.1

La sintesi di calcitriolo avviene però anche in altri tessuti (17), (18). In alternativa il 25(OH)D<sub>3</sub> può essere convertito a 24,25(OH)D<sub>3</sub>, un metabolita relativamente inattivo, grazie all'intervento dell'enzima 24-idrossilasi. L'enzima 1 alfa-idrossilasi viene stimolato od inibito da variazioni dei livelli di PTH, calcio, fosforo, calcitriolo e suoi metaboliti.

Anche l'1,25(OH)D<sub>3</sub> viene trasportato alle cellule target legato alla vitamin D binding protein, entra nella cellula in forma libera ed interagisce con il suo recettore nucleare Vitamin D receptor (VDR). Tale interazione comporta la formazione di un eterodimero con un fattore accessorio (RXR o retinoid X receptor) che interagisce con un Vitamin D responsive element (VDRE) promuovendo od inibendo la trascrizione di mRNA di proteine. Tra queste proteine vanno elencate la calcium binding protein, l'enzima 25(OH)D<sub>3</sub>-24 idrossilasi, il paratormone, l'osteocalcina, la fosfatasi alcalina e l'osteopontina. Le cellule target dell'1,25(OH)D<sub>3</sub> risultano essere quelle epiteliali dell'intestino, le paratiroidi, quelle ossee e le cellule tubulari distali del rene. Gli effetti biologici della 1,25(OH)D<sub>3</sub> sono quelli di aumentare l'assorbimento intestinale di calcio e fosforo, di aumentare il riassorbimento osseo ed infine di consentire una normale mineralizzazione ossea provvedendo al mantenimento di adeguati livelli di calcio e fosforo a livello del fronte di mineralizzazione.

E' da tener presente che i recettori per la vitamina D sono localizzati non solo negli organi che intervengono nel metabolismo minerale, ma anche in altri tessuti quali quello immunitario (19), (20), mieloide (21), (22), (23), cardiaco (24), muscolare scheletrico (25), cerebrale e del sistema nervoso (26), (27), (28).

Questa molteplice attività della vitamina D ne spiega gli effetti pleiotropici: ad esempio la up regulation del RANKL (ligando del recettore attivatore del fattore nucleare  $\kappa$ -B), la down regulation della OPG (osteoprotegerina), la modulazione della risposta immune mediante l'azione sui linfociti helper, l'interazione con il sistema renina-angiotensina, la regolazione dell'attività del sistema nervoso e dell'apparato muscolare così come della crescita e dell'apoptosi cellulare, fino alla differenziazione dei cheratinociti (25), (26), (27), (28). Esistono inoltre evidenze di un effetto non genomico del calcitriolo grazie alla interazione con un recettore di membrana distinto dal VDR nucleare (17).

Nei tessuti target le molecole di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vengono infine idrossilate e trasformate in acido calcitrioico, un metabolita inerte ed idrosolubile.

Il paracalcitolo (Fig.3) è un analogo sintetico, biologicamente attivo del calcitriolo con modificazioni della catena laterale ( $\text{D}_2$ ) e dell'anello A (19-nor) che consentono l'attivazione selettiva del recettore della vitamina D (VDR).

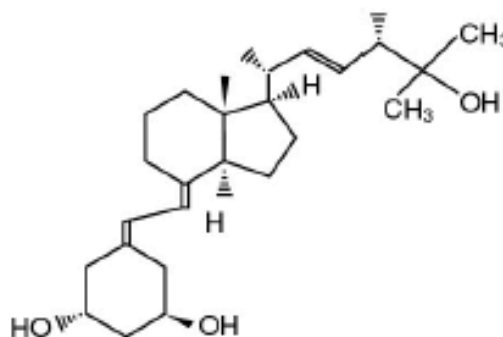


Fig.3

Il paracalcitolo, in quanto analogo della vitamina D di terza generazione, stimola selettivamente il recettore della vitamina D presente a livello delle ghiandole paratiroidi senza provocare un aumento del recettore della Vitamina D a livello intestinale e risulta meno attivo sul riassorbimento osseo. Il paracalcitolo, inoltre, stimola il recettore sensibile al calcio a livello delle ghiandole paratiroidi. Di conseguenza, il paracalcitolo riduce i livelli di paratormone (PTH) inibendo la proliferazione delle paratiroidi e diminuendo la sintesi e la secrezione di paratormone, con un impatto minimo sui livelli di calcio e fosforo. Il ripristino dei livelli alterati di paratormone, unitamente alla normalizzazione dell'omeostasi del calcio e del fosforo, può prevenire o curare la malattia ossea metabolica associata all'insufficienza renale cronica.

### **Recettore VDR e suoi polimorfismi**

Il gene VDR (12q12-14) codifica per una proteina di 427 aminoacidi (aa), che regola il trasporto e l'omeostasi del calcio. Negli studi di associazione il locus 12q12-14 è stato proposto come quello a maggior effetto genetico sulla BMD. Sono presenti diversi siti polimorfici nella regione 3' del gene umano VDR identificati dalle endonucleasi di restrizione *TaqI*, *BsmI* e *FokI*. Questi polimorfismi possono condizionare la

risposta a vari componenti dietetici con possibili rischi di sviluppo di patologia. E' ormai ampiamente dimostrato un coinvolgimento funzionale degli alleli del VDR nell'omeostasi del calcio e nella mineralizzazione dell'osso. Le variazioni alleliche del gene VDR spiegano per il 70% gli effetti genetici sulla densità ossea. I risultati ottenuti da studi di associazione mostrano come i polimorfismi di VDR da soli non siano marcatori genetici utili per assegnare il rischio di osteoporosi, sebbene risultino molto utili per spiegare la variabilità della BMD osservata nella popolazione.

### **Paratormone (PTH)**

Il paratormone viene prodotto nelle cellule paratiroidi dapprima tramite la formazione di una molecola proteica di 115 aminoacidi detta pre-paratormone che viene trasportata nel reticolo endoplasmatico rugoso e trasformata in una molecola di 90 aminoacidi detta pro-paratormone. Il paratormone finale, costituito da 84 aminoacidi, viene immagazzinato in granuli secretori citoplasmatici, dai quali al bisogno viene immesso in circolo. Il paratormone viene catabolizzato dalle cellule del Kupfer nel fegato e dalle cellule tubulari renali.

La regolazione dei livelli di PTH è regolata da un complesso sistema di feedback negativo controllato dal calcio ionizzato (29), dal calcitriolo (30) o

dai suoi derivati (31) (32), dall'ipofosforemia (33). Sono stati descritti anche altri fattori che possono regolare sintesi e/o secrezione dell'ormone: tra questi vanno citati l'alluminio (34), gli estrogeni (35), il magnesio (36), i corticoidi, alcune citochine ed il fattore di crescita fibroblastico-23 (FGF-23) (37).

L'ipocalcemia stimola la secrezione del paratormone entro pochi secondi, mentre la riduzione del calcitriolo e l'aumento del fosforo tardano alcune ore ed alcuni giorni per stimolare rispettivamente la trascrizione del gene del PTH e la replicazione delle cellule paratiroidi (38).

La trascrizione del gene che codifica per il paratormone viene stimolata soprattutto dall'ipocalcemia e presuppone la presenza di un Calcium Sensing Receptor (CaSR) (39). Altri stimoli per la trascrizione del gene del PTH sono l'iperfosforemia, la carenza di calcitriolo, i glucocorticoidi e gli estrogeni. L'azione inibitoria è invece svolta dal calcitriolo che agisce legandosi ad un Vitamin D Receptor (40), (41) nucleare che media l'inibizione della trascrizione genica del PTH nel momento in cui viene attivato da una quantità adeguata di calcitriolo, dalla calcitonina e dall'ipercalcemia. L'ipercalcemia può anche stimolare la degradazione intracellulare del paratormone.

Quando si hanno variazioni della calcemia, entra in azione il CaSR che si attiva in condizioni di ipercalcemia in seguito alla interazione degli ioni calcio con il dominio extracellulare del recettore mediante un cambiamento conformazionale (42), (43), (44).

Quando i livelli extracellulari di calcio sono bassi il CaSR non viene stimolato e quindi la sintesi e la secrezione del paratormone non vengono inibite: di conseguenza i livelli plasmatici di paratormone iniziano a salire (42). In condizioni di calcemia nella norma, il CaSR viene attivato solo parzialmente ed agisce da freno sulla sintesi del paratormone (45). La secrezione del paratormone, quindi, viene regolata principalmente dalla calcemia, con una relazione sigmoidale inversa molto ripida tra livelli di paratormone e calcio sia in vivo che in vitro. La pendenza della curva spiega come avvengano variazioni molto ampie del paratormone per piccole alterazioni della calcemia (46).

Le azioni del PTH si manifestano sul tessuto osseo, a livello renale ed intestinale. A livello osseo il PTH attiva gli osteoblasti che a loro volta stimolano gli osteoclasti tramite la secrezione di attivatori paracrini. Una costante iperparatormonemia determina un aumento del rimaneggiamento osseo con attivazione di tutte le componenti cellulari (osteoblasti, osteociti

ed osteoclasti). Il risultato netto è l'aumento del riassorbimento osseo in quanto prevale l'azione degli osteoclasti (47).

A livello renale il PTH aumenta il riassorbimento tubulare distale del calcio riducendo quindi l'escrezione del calcio, inibisce nel tubulo contorto prossimale il riassorbimento del fosforo avendo quindi un'azione fosfaturica, aumenta l'attività della 1 alfa idrossilasi renale e quindi la sintesi di 1,25(OH)D<sub>3</sub>, riduce il riassorbimento tubulare di bicarbonati e quindi contribuisce allo sviluppo dell'acidosi metabolica. A livello intestinale il PTH aumenta l'assorbimento del fosforo.

L'effetto netto del PTH è quello di aumentare la calcemia stimolando il riassorbimento osseo, aumentando il riassorbimento tubulare distale del calcio ed aumentando la sintesi dell'1,25(OH)D<sub>3</sub> e di ridurre la fosforemia inibendone il riassorbimento nel tubulo contorto prossimale ed in minor misura aumentandone il riassorbimento a livello intestinale (48).

### **Tessuto osseo e metabolismo calcio/fosforo**

Un ruolo fondamentale nel metabolismo calcio-fosforo lo svolge il tessuto osseo, costituito da idrossiapatite, da matrice collagenica, da osteocalcina, da osteoblasti, osteociti ed osteoclasti e da acqua.

Gli osteoblasti sono cellule di origine mesenchimale, sintetizzano la matrice, sono provvisti di fosfatasi alcalina, presentano recettori per il calcitriolo, il PTH, gli estrogeni ed attivano gli osteoclasti. Quando cessano di sintetizzare la matrice vi rimangono intrappolati e si trasformano in osteociti. Gli osteoclasti, di origine macrofagica, riassorbono tessuto osseo dopo essere state reclutati da interleuchina (IL) 1, IL6, IL11, TNF alfa e prostaglandine; sono inibiti da interferon gamma, TGF  $\beta$  ed IL4.

L'osso viene costantemente rimodellato grazie alle variazioni strutturali degli osteoblasti di superficie che scoprono aree per il riassorbimento da parte degli osteoclasti. Il successivo richiamo in loco anche di monociti permette la fagocitosi dei detriti ed il successivo riempimento delle cavità da parte degli osteoblasti. L'attività del tessuto osseo è regolata da meccanismi locali e sistemici. I primi sono rappresentati dalle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Insulin like growth factor (IGFs), TGF $\beta$ , IL1, IL6, TNF, sistema OPG/RANK. I meccanismi sistemici sono rappresentati da PTH, vitamina D, calcitonina, insulina, estrogeni, androgeni, glicocorticoidi, ormoni tiroidei, ormone della crescita, FGF-23. Le BMPs sono prodotte nell'osso e nel midollo osseo e consentono la formazione di Core binding Factor (Cbfa1), un fattore di trascrizione genica che stimola la formazione di osteoblasti nel midollo osseo e quindi la formazione di osso. Gli IGFs sono

prodotti dagli osteoblasti in risposta a PTH, estrogeni ed alla BMPs e stimolano la formazione di matrice ossea. Il TGF $\beta$  viene rilasciato durante il riassorbimento osteoclastico e stimola la funzione degli osteoblasti. L'IL1, la IL6 ed il TNF vengono prodotte dagli osteoblasti e reclutano gli osteoclasti. L'OPG (osteoprotegerina) ed il recettore attivatore del fattore nucleare K-b (RANK) regolano la funzione degli osteoclasti. Il RANK è localizzato sulle cellule proosteoclastiche e quando viene attivato dal ligando del recettore attivatore del fattore nucleare K-b (RANKL) stimola la trasformazione dei proosteoclasti in osteoclasti. Il RANKL è secreto da cellule della linea ossea sotto l'influenza di IL1, calcitriolo, PTH e dai precursori degli osteoblasti. L'OPG è prodotta dagli osteoblasti, lega il RANKL, e quindi riduce la formazione degli osteoclasti. Il sistema OPG/RANK/RANKL è strettamente regolato da PTH, vitamina D, estrogeni e glicorticoidi. Per quanto riguarda i regolatori sistemici, la calcitonina è prodotta dalle cellule C della tiroide in seguito all'aumento della calcemia e quindi inibisce gli osteoclasti e riduce l'assorbimento di calcio nell'intestino e nel rene. La vitamina D aumenta la formazione degli osteoclasti. L'insulina stimola la formazione della matrice. Gli androgeni e gli estrogeni regolano sia la formazione che il riassorbimento osseo. I glicocorticoidi riducono il riassorbimento di calcio intestinale, stimolano il riassorbimento

osseo e l'escrezione renale di calcio. Gli ormoni tiroidei stimolano il riassorbimento osseo. L'ormone della crescita agisce stimolando l'IGFs (47).

### **Ruolo di FGF 23 nel metabolismo calcio/fosforo**

Il fattore di crescita dei fibroblasti 23 (FGF23) è il più recente metabolita correlato con la morbilità e mortalità cardiovascolare. Analogamente al percorso già seguito da fosfato, PTH e vitamina D, livelli alterati di FGF23 sono stati prima associati alla mortalità nella popolazione dialitica (49) e poi alla malattia cardiovascolare ed alla morte nella popolazione generale (50). Sia esso considerato un potenziale biomarker precoce di alterato metabolismo minerale o direttamente un ormone tossico, l'FGF23 è al centro di numerosi studi sulla relazione tra alterato metabolismo minerale e malattia cardiovascolare nell'IRC.

L'FGF23 ha un'azione fosfaturizzante, inibisce l'alfa 1 idrossilasi renale e stimola la formazione del PTH. E' prodotto dagli osteociti ed ha come organi bersaglio il rene, ove si lega al suo recettore Klotho (con conseguente inibizione dell'uptake di fosforo sodio-dipendente) e l'alfa 1 idrossilasi. A livello paratiroideo, il legame con il recettore Klotho stimola la sintesi di paratormone (51). Il fattore Klotho (52) viene prodotto da un

gene che determina la formazione di due proteine, una legata alle membrane ed una circolante; mutazioni di Klotho determinano una sindrome che ricorda quella dei pazienti sottoposti a dialisi.

Riducono l'espressione del Klotho a livello renale l'età, una dieta ricca di fosfati, l'insufficienza renale cronica, una terapia con estrogeni, lo stress ossidativo, i fenomeni di ischemia-riperfusionese, la nefrectomia, il carcinoma renale, l'angiotensina II. A livello cardiaco, polmonare ed epatico è l'età a ridurre l'espressione del Klotho. Aumentano l'espressione del Klotho a livello renale una dieta povera di fosfati, la presenza di ipercalcemia o iperfosforemia, la vitamina D, le statine, mentre a livello del tessuto adiposo sono i PPAR gamma ad incrementare l'espressione del Klotho.

Le proteine Klotho interagiscono con il FGF 23 nel tubulo contorto distale in corrispondenza dei canali per il calcio (Transient Receptor Potential Vanilloid 5) sotto il controllo della vitamina D e nell'intestino (Transient Receptor Potential Vanilloid 6) (53).

Quando la fosforemia si riduce per una riduzione dell'intake alimentare, si riduce la secrezione di paratormone, si riduce la produzione di FGF 23 che provoca una riduzione degli scambiatori sodio-fosforo a livello renale (NPT 2a e 2c) e quindi si riduce la fosfaturia, aumenta la produzione di 1 alfa idrossilasi renale che aumenta l'attività dello scambiatore sodio-

fosforo (NPT2b) a livello intestinale. Quando la fosforemia aumenta, aumenta la sintesi di Klotho che si lega all'FGF 23 e quindi si ha una azione ipofosforemizzante. A livello osseo il Klotho stimola il riassorbimento osseo ed il rilascio di fosfati andando ad agire sul Transient Receptor Potential Vanilloid 5 che è un modulatore degli osteoclasti.

Una ridotta introduzione di calcio provoca ipocalcemia ed un conseguente aumento della secrezione del paratormone. Questo provoca un aumento del riassorbimento renale di calcio, un aumento della produzione di vitamina D ed una mobilitazione di calcio dalle ossa in seguito alla comparsa di fenomeni di rimodellamento. La produzione renale di Klotho aumenta in modo da stimolare il Transient Receptor Potential Vanilloid 5 che aumenta il riassorbimento di calcio a livello renale ed osseo. Inoltre a livello intestinale stimola il Transient Receptor Potential Vanilloid 6 che aumenta il riassorbimento del calcio (53).

### **CKD e metabolismo calcio/fosforo**

Quando la funzione renale comincia a declinare, si riducono l'attività della alfa 1 idrossilasi renale e la eliminazione renale dei fosfati (54). L'ipocalcemia si verifica a causa della carenza di vitamina D e del conseguente ridotto assorbimento di calcio a livello intestinale ma anche

perché l'iperfosforemia impedisce il rilascio di calcio da parte del tessuto osseo (55). La ipocalcemia determina un aumento della sintesi e della secrezione del PTH a cui contribuiscono anche la iperfosforemia che riduce la sintesi di calcitriolo (56), (57) il quale non riesce ad esercitare il suo effetto inibitorio sulle cellule paratiroidee a causa della insufficiente stimolazione dei recettori VDR. E' da ricordare, inoltre, che la sintesi e la secrezione di paratormone nonché la proliferazione delle cellule paratiroidee vengono anche stimulate direttamente dall'iperfosforemia (58), (59), (60), (61).

Nei primi stadi dell'insufficienza renale l'aumento del PTH (62) stimola la fosfaturia ed il riassorbimento renale del calcio, stimola la sintesi di calcitriolo che consente di aumentare l'assorbimento di calcio a livello intestinale e permette la mobilizzazione del calcio dai depositi ossei. Nonostante tali effetti, però, non si riescono a mantenere i livelli di calcemia, fosforemia e calcitriolo nella norma per cui lo stimolo alla secrezione di PTH continua e compare la resistenza scheletrica all'azione del PTH. In altri termini sono necessarie concentrazioni via via più elevate di PTH per mobilizzare calcio e fosforo dal tessuto osseo. In tale meccanismo entrano anche in gioco l'iperfosforemia, la presenza di bassi livelli di calcitriolo, la presenza di tossine uremiche, l'acidosi metabolica,

una riduzione della sensibilità del recettore per il PTH determinata dai suoi eccessivi livelli, decremento dell'espressione di mRNA per PTH/PTHrp recettore (63), (64), (65), (66), (67), (68), (69), (70), (71).

La perdita della funzionalità renale congiuntamente alla resistenza scheletrica alle azioni del PTH contribuisce a peggiorare l'ipocalcemia in modo tale che diventano necessari livelli estremamente elevati di PTH per mantenere la calcemia nella norma. Dapprima nelle paratiroidi aumenta la percentuale delle cellule secernenti PTH e poi il numero totale di cellule con la conseguente comparsa di una iperplasia diffusa. In tali condizioni, la crescita cellulare è di tipo policlonale e si accompagna ad una down regulation dell'espressione dei recettori per il calcio e la vitamina D (72). In condizioni di nefropatia terminale, l'iperplasia delle ghiandole paratiroidi evolve ulteriormente ed in queste condizioni la crescita cellulare diventa di tipo monoclonale con comparsa di una iperplasia nodulare (73), (74) associata a riduzione dell'espressione dei CaSR (75), (76), e dei recettori per la vitamina D (76), (77) con conseguente minore sensibilità delle ghiandole paratiroidi alle variazioni della calcemia (78), (79). In queste condizioni il calcio e la vitamina D non riescono a controllare la secrezione di PTH che viene sintetizzato in grande quantità con conseguente rilascio di ingenti quote di calcio e fosforo dalle riserve ossee, nonostante la resistenza

scheletrica all'azione del PTH. La conseguente comparsa di ipercalcemia ed iperfosforemia (79) causano una ulteriore stimolazione delle ghiandole paratiroidi. Si determina dunque un circolo vizioso che tende ad amplificare la secrezione del PTH a scapito di elevate concentrazioni sieriche calcio-fosforiche che espongono i pazienti ad osteodistrofia renale, calcificazioni vascolari e dei tessuti molli e quindi ad un aumento del rischio di morbilità e mortalità.

L'osteodistrofia renale si presenta tipicamente in tre forme: ad elevato turnover osseo (osteite fibroso cistica), a basso turnover (adinamic bone disease ed osteomalacia) e forme miste. L'osteite fibroso cistica è associata alle forme di iperparatiroidismo e quindi è legata a riduzione della massa nefronica, a ritenzione di fosfati, a riduzione della sintesi di calcitriolo, ad anomala crescita e/o funzione delle paratiroidi, a resistenza scheletrica all'azione del paratormone, ad ipocalcemia cronica. All'esame istologico si apprezza un aumento del riassorbimento e della formazione di osso: ampie aree della superficie trabecolare sono occupate da cavità contenenti osteoclasti in fase di riassorbimento attivo e lungo la superficie trabecolare si trovano numerosi osteoblasti in fase di attiva deposizione di matrice osteoide. L'osteoide può non venire mineralizzata alla stessa velocità con la quale viene deposta e quindi ne risulta un aumento del proprio volume. E'

tipica la presenza nell'osteoidi di fibre collagene disposte irregolarmente od intrecciate invece che in modo lamellare; tale deposizione si verifica anche in sede midollare. Le conseguenze sono quelle di una minore resistenza allo stress fisico, la comparsa di osteosclerosi e la riduzione del tessuto ematopoietico (80), (81), (82).

L'adinamic bone disease è invece dovuta ad una riduzione del numero degli osteoblasti determinata dalle tossine uremiche e da citochine che interferiscono con lo sviluppo osseo, associata a ridotti livelli di paratormone. Essa viene favorita da fattori quali l'età avanzata, il diabete, la terapia sostitutiva della funzione renale, la terapia con vitamina D e la somministrazione di sali di calcio. All'esame istologico si apprezza uno spessore osteoidi normale senza però osteoblasti attivi, con rari osteoclasti e senza fenomeni di rimodellamento (83), (84).

L'osteomalacia negli anni passati era dovuta alla deposizione di alluminio nel fronte di mineralizzazione, alluminio contenuto nei farmaci utilizzati per chelare il fosforo presente negli alimenti e nel bagno di dialisi. Oggi la causa più frequente è la carenza di vitamina D, l'acidosi metabolica, l'accumulo nell'osso di stronzio contenuto nel liquido di dialisi. All'esame istologico si apprezzano un aumento dello spessore e della superficie

dell'osteoidi ed un ridotto turnover osseo, con bordi osteoidi ampi e rari osteoblasti ed osteoclasti (85).

### **Le calcificazioni vascolari**

Le calcificazioni vascolari sono ormai considerate un importante concausa della morbilità e mortalità dei pazienti con aterosclerosi avanzata (86). Esse sono legate all'invecchiamento, al diabete mellito, ed all'insufficienza renale cronica. (87, 88). Sono caratterizzate da frammentazione e riduzione delle fibre elastiche della parete arteriosa, ad irrigidimento vascolare e quindi ad aumentato post-carico cardiaco. Da un punto di vista morfologico, si possono descrivere almeno due tipo di deposizione patologica di fosfato di calcio nelle pareti arteriose: le calcificazioni dell'intima e quelle della media (89). Indipendentemente dal tipo di interessamento della parete arteriosa o dalla localizzazione corporea, la patogenesi delle calcificazioni vascolari si può considerare un processo multifattoriale, conseguente all'aumento di numerosi fattori pro-aterogeni ed alla riduzione di numerosi inibitori della calcificazione (90, 91). E' interessantissimo notare come le calcificazioni vascolari sembrano essere indotte dagli stessi fattori che regolano il metabolismo osseo, compresi fattori di trascrizione (Msx2, Runx2, Osterix) (92), le Bone Morphogenetic

Proteins (93), il sistema RANKL-osteoprotegerin (OPG)-RANK (94), la fosfatasi alcalina e l'osteopontina (95). Le calcificazioni cardiovascolari sono la conseguenza finale di processi attivi e passivi controllati da fattori locali e sistemici. (96). I processi attivi sono inoltre regolati da fattori genetici (97). Lo sviluppo di numerosi modelli sia in vitro che in vivo, compresi modelli di delezione genica animale, ha permesso di scoprire numerose proteine inibitrici della calcificazione con attività locale nella parete dei vasi e/o con azione sistemica plasmatica.

### **Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7)**

Le BMP sono molecole con azione citochinica comprese nella superfamiglia delle TGF- $\beta$ . A differenza delle BMP-2 e -4 che hanno azione procalcificante, la BMP-7 si è dimostrata essere un inibitore della calcificazione extraossea. Essa è inoltre fondamentale per lo sviluppo embrionale di rene, occhio e tessuto osseo (98). Tipicamente i suoi livelli si riducono sin dalle prime fasi dell'insufficienza renale cronica (99). Tale proteina mantiene la differenziazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media dei vasi e previene la loro trasformazione in un fenotipo osteoblastico (100). La dimostrazione degli effetti benefici a livello vascolare si è aggiunta a quella dei suoi effetti inibitori sulla progressione

dell'insufficienza renale cronica in modelli animali (101), (102). Una sua carenza, come nell'insufficienza renale cronica, favorisce i processi di calcificazione vascolare specialmente nel contesto delle lesioni aterosclerotiche.

### **Fetaina A ( $\alpha$ 2-HS glycoprotein, AHSG)**

La fetaina A o Alpha 2 Heremans-Schmid glycoprotein è una glicoproteina con peso molecolare 59KD sintetizzata a livello epatico e presente in maniera ubiquitaria nello spazio extracellulare. Fa parte della superfamiglia delle cistatine ed è una proteina plasmatica estremamente conservata filogeneticamente: oltre che nell'uomo, è presente nel suino, nel bovino, nell'ovino e nei roditori. E' stata denominata fetaina A dopo la scoperta di una variante di tipo B da Heremans and Schmid.

La fetaina B, meno nota della variante A, è una glicoproteina sierica con espressione simile alla fetaina A in quanto a localizzazione, ma molto minore in quantità (103). Analogamente al proprio omologo A, da studi animali è emersa una down-regulation dell'mRNA della fetaina B negli epatociti in corso di infiammazione; nei topi sembra svolgere una funzione inibitoria verso la precipitazione di composti calcio fosforo basici.

Il gene umano della fetuina A, denominato AHSG, mappa sul cromosoma 3q27 ed è costituito da 7 esoni e 6 introni, è costituito da 3 domini proteici di cui due cistatina-like , e da un terzo C-terminale ricco in prolina e glicina, unico nella specie umana. La proteina è costituita da due catene polipeptidiche generate da un clivaggio proteolitico enzimatico post-traduzionale di un'unica catena polipeptidica iniziale. Le due catene sono unite da un ponte disolfuro.

I livelli di fetuina A decrescono durante la fase cellulare del processo di infiammazione (104). In vitro la fetuina A inibisce la formazione e la precipitazione del fosfato di calcio, ma non ha nessun effetto sull'idrossiapatite già formata (105). Antagonizza l'effetto antiproliferativo del TGF $\beta$ -1, blocca l'osteogenesi e la deposizione di calcio nella matrice ossea in cellule del midollo osseo murino trattate con desametasone (106). La fetuina forma complessi solubili con i cristalli di idrossiapatite: queste particelle di calciproteine rappresentano strutture transitorie sferiche che inglobano i cristalli di calcio e fosfato. Tali particelle consentirebbero il trasporto nel torrente circolatorio dei precipitati calciofosforici, e quindi anche dai siti extraossei alle ossa, agendo come ripulitore dei possibili foci di calcificazione de novo (107).

A dimostrazione del fondamentale ruolo della fetuina nella prevenzione delle calcificazioni cardiovascolari vi è l'evidenza costituita dai topi knockout per il gene della fetuina, che sviluppano gravi calcificazioni a livello di miocardio, rene, polmone, lingua e cute (108).

I pazienti in terapia sostitutiva della funzione renale con bassi livelli di fetuina presentano un incremento della mortalità per eventi cardiovascolari (109). Sebbene non tutti concordi, la maggioranza degli studi hanno mostrato una correlazione inversa tra i livelli sierici di fetuina A e la massa ed il volume delle placche calcifiche coronariche. Come precedentemente detto topi privi di fetuina sviluppano calcificazioni dei tessuti molli; poiché nell'uomo i suoi livelli sono ridotti nell'infiammazione e nell'uremia si può supporre che la sua carenza locale e sistemica possa essere una concausa del processo di calcificazione vascolare nel paziente uremico.

La riduzione dei livelli sierici di fetuina A nei pazienti con IRC può essere spiegata in due modi, potenzialmente convidenti. Nel paziente con IRC di lunga data, quando il carico calciofosforico superi un certo livello soglia, i sistemi compensatori, tra i quali anche la fetuina A, potrebbero andare incontro ad esaurimento. L'alternativa potrebbe essere un massivo consumo del sistema secondario al carico calcio fosforico. La successiva riduzione dei livelli inizierebbe un circolo vizioso di ulteriore accumulo di

prodotti calciofosforici con conseguenti massive calcificazioni extraossee ed ulteriore consumo della fetuina A.

Se questa ipotesi di una iniziale sovrapproduzione della fetuina A e del progressivo esaurimento del sistema dovesse essere corretta, risulterà oltremodo importante dirigere future studi verso la ricerca di fattori che influenzino positivamente la sintesi e/o la secrezione della fetuina A.

Un ruolo importante della fetuina A è quello di essere un reattante negativo di fase acuta infiammatoria (110): essa viene down regolata e i suoi livelli dopo stimolo infiammatorio calano drasticamente. Un esempio dell'attività antinfiammatoria della Fetuina A è dato dalla soppressione del rilascio di TNF macrofagico in seguito a stimolo con lipopolisaccaride batterico (111).

In un recente studio sull'uomo si è osservato come giovani pazienti in emodialisi, non diabetici e con anamnesi negativa per eventi cardiovascolari, non presentassero calcificazioni cardio-vascolari e soprattutto avessero livelli sierici di fetuina A maggiori rispetto ai pazienti in emodialisi con presenza di diffuse calcificazioni cardio-vascolari (112).

Manca ad oggi la dimostrazione che la correzione del deficit di fetuina A, almeno nei pazienti sottoposti a trattamento dialitico, possa associarsi ad una riduzione delle calcificazioni cardiovascolari o degli eventi

cardiovascolari. Uno dei possibili modi per aumentarne i livelli circolanti sembra essere quello di trattare i pazienti in emodialisi con sevelamer-HCl, un chelante del fosforo privo di calcio (113).

Oltre al principale ruolo inibitorio verso le calcificazioni, la fetuina è in grado di stimolare l'hepatocytes growth factor (114).

La fetuina A entra in gioco anche nella sindrome metabolica: è stato dimostrato in vitro, nel topo e nell'uomo come ad alti livelli ematici siano associati l'insulino resistenza (115) e l'accumulo di lipidi a livello epatico, (116) con la conseguente promozione di un profilo lipidico ematico aterogenico (117) e quindi negativo dal punto di vista cardiovascolare.

Tenuto conto delle dimostrazioni nell'uomo dell'aumento delle calcificazioni vascolari in caso di livelli bassi e dell'associazione con la sindrome metabolica in caso di livelli elevati, risulta ancora da definire complessivamente il ruolo della fetuina A nella patologia cardiovascolare.

La fetuina A ha trovato un ruolo anche in altre patologie quali il morbo di Alzheimer (118), la calcinosi associata alla sclerosi sistemica (119), la calcolosi urinaria da ossalato di calcio (120).

## **Matrix GLA Glicoprotein**

La Matrix GLA Glicoprotein fa parte delle proteine che si legano alla vitamina K. Sperimentalmente si è notato che topi privi di tale proteina sviluppano nei primi due mesi di vita una calcificazione arteriosa diffusa, osteoporosi e fratture patologiche (121). E' una proteina della matrice extracellulare con un'elevata affinità per il calcio ed il fosforo che gioca un ruolo fondamentale nel prevenire i processi di calcificazione vascolare e nella patogenesi della osteoporosi (122). Grazie al suo legame con la BMP-2 esercita un effetto inibitorio sui processi di mineralizzazione (123).

Da quanto sopra esposto non meraviglia che i pazienti in terapia sostitutiva della funzione renale presentino calcemie e fosforemie elevate che determinano un aumento del rischio di mortalità (124) anche attraverso l'aumento delle calcificazioni vascolari (125) che di per sé provocano un aumento del rischio di mortalità (126). L'omeostasi scheletrica nel soggetto sano necessita di un fine bilancio tra la formazione ossea, mediata dagli osteoblasti, e il riassorbimento osseo, mediato dagli osteoclasti.

## **Osteoprotegerina**

L'Osteoprotegerina (OPG) è una glicoproteina inibitrice del riassorbimento osseo. OPG si lega come recettore "esca" al ligando RANKL e ne diminuisce la disponibilità per il recettore RANK. OPG quindi controbilancia gli effetti biologici del RANKL. L'OPG è una proteina con un ruolo protettivo nella patologia osteoporotica: infatti il topo knock-out per l'OPG sviluppa severa osteoporosi e diffuse calcificazioni vascolari (127). L'OPG è prodotta non solo a livello osteoblastico, ma anche in molti altri tessuti, quali il polmone, il rene, l'intestino e le cellule endoteliali. Inoltre, gli effetti biologici dell'osteoprotegerina non sono ancora del tutto noti, anche se è ormai accertato che essa possa avere un ruolo centrale nell'inibizione dei processi di apoptosi cellulare (128). È interessante sottolineare come la presenza di mRNA di OPG sia aumentata in arterie umane calcificate, ma non in arterie normali (129): è ipotizzabile che l'OPG sia presente nel sito di calcificazione vascolare nel tentativo di inibire il processo stesso. I livelli circolanti di questa citochina sono stati associati con la presenza e la severità di calcificazioni coronariche (130) e con la progressione dei processi di aterosclerosi (131), in soggetti con funzione renale conservata. Inoltre, nei pazienti sottoposti a trattamento emodialitico con presenza di calcificazioni a livello dell'aorta addominale i

livelli di OPG sono aumentati (132), così come nei pazienti in dialisi e nei trapiantati renali con calcificazioni coronariche (133). Infine, un'associazione tra i livelli sierici di OPG con l'aumentata mortalità per tutte le cause e per cause cardiovascolari è stata recentemente documentata nei pazienti in dialisi (134) e nei trapiantati di rene (135).

L'aumento dei livelli sierici di OPG nelle sedi di calcificazione extraossea potrebbe indurre a concludere che questa proteina favorisca il processo di calcificazione vascolare, ma chiaramente gli studi in vitro e in vivo dimostrano come l'OPG inibisca tale processo. L'aumento sierico dell'OPG è più verosimilmente causato da un tentativo di difesa verso le calcificazioni vascolari. I livelli sierici di OPG possono essere influenzati da diversi fattori, tra i quali la riduzione del filtrato glomerulare (135) e l'alterato turnover osseo (136) (137). Un progressivo aumento dell'OPG con l'età è stato dimostrato sia nella popolazione con funzione renale normale (131) (138) (139) che nei pazienti affetti da insufficienza renale cronica (133) (139). Si può concludere che l'osteoprotegerina rappresenti un marker biologico per due patologie classicamente associate all'età senile: l'osteoporosi e le calcificazioni vascolari.

## **Pirofosfato inorganico**

Esso previene la formazione dei cristalli di idrossiapatite e viene considerato uno dei più potenti inibitori delle calcificazioni vascolari, sempre più riconosciuto come fattore paracrino vascolare (140). Il pirofosfato inorganico (PPi) è generato da diversi processi biochimici e metabolici e i livelli sono mantenuti da 3 componenti principali: la nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase-1 (NPP1), multiple-pass trans membrane protein codificata dal progressive ankylosis locus (ANK) e una non specific alkaline phosphatase (TNAP).

NPP1 media la sintesi di PPi intracellulare, ANK provvede ad un corretto trasporto nell'ambiente extracellulare, TNAP converte l'eccesso di PPi in fosfato. L'azione sinergica di NPP1 e ANK previene le calcificazioni ectopiche, mentre un'alta attività di TNAP favorirebbe l'accumulo di cristalli di idrossiapatite aumentando la concentrazione di fosfato. Il meccanismo di inibizione delle calcificazioni del pirofosfato inorganico sembra essere di tipo fisicochimico sulla formazione dei cristalli di idrossiapatite, prevenendo la deposizione di calcio nei tessuti (141).

Diversi studi sostengono che deficienze in livelli di PPi portino ad una espressione insufficiente di Osteopontina in colture primarie di osteoblasti di topo aumentando il rischio di calcificazioni ectopiche (142). Altri studi

suggeriscono che livelli alterati o strutture non corrette di NPP1 e ANK sono associate a calcificazioni vascolari (143), (144).

Si è visto come il PPI sia un diretto inibitore della formazione dei cristalli di idrossiapatite in vitro: bastano infatti basse concentrazioni di questa molecola per prevenire completamente la cristallizzazione di soluzioni sature di Ca e  $\text{PO}_4$  (145, 146).

## Scopo del Progetto

Lo scopo del progetto è quello di valutare l'effetto di due farmaci analoghi della vitamina D, calcitriolo e paracalcitolo, sulla sintesi della Fetuina A. Pensiamo siano responsabili di una induzione positiva dell'espressione della proteina con un'azione diretta sull'epatocita tramite legame ai recettori VDR.

Per dimostrarlo abbiamo allestito due modelli sperimentali , uno in vivo e l'altro in vitro: il primo consiste nella quantificazione diretta dei valori della Fetuina A in risposta al paracalcitolo a tempi successivi in 30 pazienti in terapia emodialitica cronica, affiancata da parametri laboratoristici necessari per escludere variazioni dei livelli della proteina secondari a quadri infiammatori, infettivi o squilibri elettrolitici.

Il secondo modello prevede una parte laboratoristica su colture cellulari epatocitiche primarie. Abbiamo preferito utilizzare una linea primaria per ridurre le possibili alterazioni metaboliche di una linea immortalizzata, ottenendo quindi una migliore confrontabilità con il normale metabolismo epatocitario in vivo. Su tali cellule abbiamo misurato la concentrazione di fetuina A nel citoplasma tramite Western Blot e del suo mRNA mediante PCR real-time, per evidenziarne un'attivazione della sintesi a livello genico

e a livello proteico. Gli esperimenti in vitro sono stati eseguiti in triplicato per dare forza ai risultati e successivamente sono stati riprodotti con una seconda linea cellulare primaria diversa dalla precedente come conferma della ripetibilità dei dati.

I valori delle due fasi precliniche sono stati incrociati e correlati per dare peso alle nostre ipotesi.

## **Fase Clinica**

Sono stati arruolati 10 pazienti affetti da iperparatiroidismo secondario in terapia emodialitica cronica con indicazione clinica all'inizio di terapia con vitamina D. Sono stati trattati con dosi standard di paracalcitolo 5 ug post dialisi.

Di tali dieci pazienti, cinque maschi e cinque femmine, due erano affetti anche da diabete mellito di tipo 2 e quattro da malattia cardiovascolare (arteriopatia arti inferiori di grado severo o cardiopatia ischemica post-infartuale).

In essi sono stati dosati a tempi diversi i livelli ematici di fetuina A ed alcuni parametri collaterali quali i principali indicatori laboratoristici di patologia ossea (paratormonemia, calcemia totale e fosforemia), un

marcatore nutrizionale (albuminemia) ed un indice di flogosi, la proteina C reattiva ad alta sensibilità (PCRhs). Quest'ultimo parametro è stato scelto per la correlazione inversa con la fetuina A già dimostrata in letteratura.

I dosaggi dei parametri sono stati effettuati ai tempi :

- T0 = pre trattamento farmacologico
- T1 = 7 giorni post trattamento
- T4 = 28 giorni post trattamento
- T8 = 56 giorni post trattamento

Questo protocollo ha lo scopo di consentire la valutazione dell'effetto entro le prime otto settimane dell'analogo della vitamina D sull'espressione della fetuina A in assenza di altri fattori condizionanti, monitorati dai parametri collaterali.

I risultati ottenuti sono stati valutati mediante appropriati test statistici.

# Fase Preclinica

## Colture Cellulari

Le colture cellulari dai noi utilizzate sono state acquistate dalla ditta Invitrogen e sono stati utilizzati i protocolli di congelamento e di semina forniti dalla ditta stessa. Ai protocolli standard sono state effettuate alcune modifiche per adattare la tipologia di coltura alle nostre esigenze.

### Thawing:

- Estrarre la vial di epatociti criopreservati e decongelarla in un waterbath a 37°C per un tempo non superiore a 2 minuti.
- Disinfettare la vial con alcool a 70% , trasferire per inversione il contenuto in 50 ml di CHRM medium (medium di recupero cellulare).
- Centrifugare immediatamente a 100 x g per 10 min a 4°C

### Plating:

- Rimuovere il sovrnatante e risospendere in 3 ml di CHPM medium (medium di semina) precedentemente mantenuto in ghiaccio.

### Conta cellulare e vitalità cellulare all'emocitometro col Trypan Blue:

- La conta all'emocitometro viene fatta processando una soluzione di cellule diluite in CHPM medium con una concentrazione appropriata di

circa  $1 \times 10^5$  fino ad un massimo di  $2 \times 10^5$  cellule per ml. Preferiamo una conta cellulare manuale in quanto garantisce una migliore accuratezza rispetto a quella ottenibile con strumenti automatici, dato che nelle linee primarie la giusta densità cellulare è un parametro critico per la riuscita delle colture.

- Aggiungere a tale sospensione cellulare 0.1 ml di soluzione di Trypan Blue al 0.4%. Il Trypan Blue è un colorante vitale che penetra nelle membrane cellulari non intatte consentendo per esclusione l'individuazione di quelle vitali.
- Lasciare riposare 5 minuti a temperatura ambiente e posizionare la soluzione nell'emocitometro, evitando le eventuali bolle d'aria. Porre l'emocitometro sotto il microscopio.
- Iniziando dalla prima camera, contare le cellule nel quadrato centrale da 1mm e nei 4 quadrati da 1 mm agli angoli. Contare le cellule in alto e a sinistra che toccano la linea centrale del perimetro di ciascun quadrato. Non contare le cellule che toccano la linea centrale in basso e a destra. Ripetere la procedura per la seconda camera. Se si contano meno di 200 o più di 500 cellule nei 10 quadrati (20-50 cellule per singolo quadrato) correggere la concentrazione della sospensione cellulare in modo opportuno.

- Risospendere le cellule nella corretta densità a seconda della piastra da utilizzare in CHPM (plating medium): in questo caso, per 48 pozzetti, alla concentrazione di  $0.6-0.8 \times 10^6$  cellule/mL
- Trasferire gli epatociti in piastre da 48 pozzetti coattate al collagene I, che favorisce l'adesione e promuove la vitalità epatocitica (250ul per pozzetto).
- Disperdere gli epatociti nei quattro punti cardinali , in modo da ottenere la stessa concentrazione cellulare per unità di spazio nei vari pozzetti.
- Incubare a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, senza muovere mai la piastra in modo che gli epatociti possano formare il monolayer.
- Dopo 4 / 6 ore rimuovere la piastra dall'incubatore ed agitarla dolcemente per rimuovere eventuali detriti e cellule non adese.
- Rimuovere il sopranatante e sostituire con medium di mantenimento William's.
- Incubare di nuovo a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Dopo 24 ore di riposo le cellule sono pronte per i test farmacologici (Fig. 3) e (Fig. 4).



Fig. 3 Epatociti dopo 24 ore di incubazione (10X)

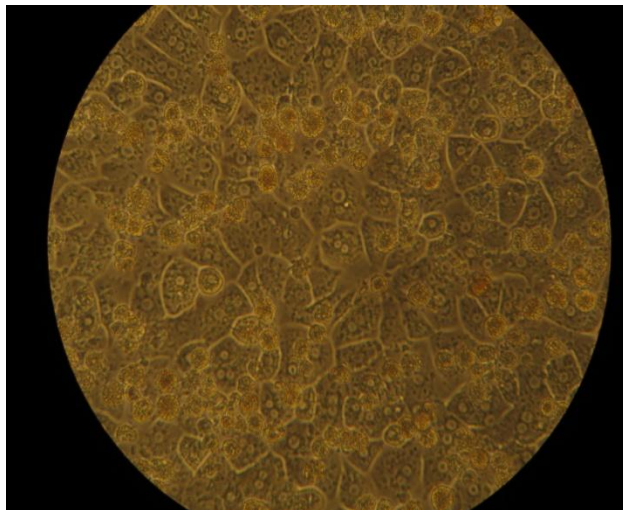


Fig. 4 Epatociti dopo 24 ore di incubazione (20X)

## Test farmacologici

Una volta allestita la coltura epatocitica , procedere con i test farmacologici con paracalcitolo e calcitriolo, mantenendo un gruppo di controllo negativo. I test saranno condotti tutti in triplicato per dare forza e ripetibilità ai risultati e verranno ripetuti su una seconda linea cellulare primaria. I farmaci saranno somministrati a concentrazioni diverse per verificare se c'è una correlazione dose dipendente sull'espressione di fetuina A. Le quantizzazioni proteiche e dell'mRNA delle cellule saranno effettuate a tempi diversi, per rilevare un aumento o una diminuzione tempo dipendente all'esposizione del farmaco. Il medium di mantenimento durante tutta la fase dell'esperimento con i farmaci non sarà cambiato per mantenere gli epatociti sotto costante esposizione al farmaco.

Le piastre da 48 pozzetti risultano così allestite:

P5A	P5B	P5C	P10A	P10B	P10C	a 24h
P20A	P20B	P20C	C25A	C25B	C25C	a 24h
C50A	C50B	C50C	C100A	C100B	C100C	a 24h
P5A	P5B	P5C	P10A	P10B	P10C	a 48h
P20A	P20B	P20C	C25A	C25B	C25C	a 48h
C50A	C50B	C50C	C100A	C100B	C100C	a 48h
CTR1	CTR2	CTR3				a 24h
CTR1	CTR2	CTR3				a 48h

Concentrazioni dei farmaci:

Paracalcitolo	5 Nm (triplicato a,b,c)
	10 Nm (triplicato a,b,c)
	20 Nm (triplicato a,b,c)
Calcitriolo	25 Nm (triplicato a,b,c)
	50 Nm (triplicato a,b,c)
	100 Nm (triplicato a,b,c)
Controllo senza farmaci	(triplicato a,b,c)

L' mRNA e le proteine citoplasmatiche sono state raccolte ai tempi T1 (24 ore) o T2 (48 ore) e sono stati immediatamente congelati a -80 °C in attesa delle rispettive misurazioni delle concentrazioni.

### **Estrazione delle proteine e Western Blot**

Prima di essere caricati su gel denaturante di poli-acrilamide , tutti gli estratti proteici sono stati diluiti 1:2 mediante l' aggiunta di un volume di SDS sample buffer 2X , e successivamente sono stati portati a 100°C per 5'.

La composizione dell' SDS sample buffer 5X è la seguente, per 10 ml di soluzione:

- 600 ul di TRIS 1M ph 6.8
- 2.5 ml di Glicerolo 100%
- 2 ml di SDS 10%
- 500 ul di beta-Mercaptoetanololo
- 10 mg di Blu di Bromofenolo

La corsa elettroforetica è stata realizzata nell'apparato elettroforetico verticale Mini-PROTEAN II (BioRad) , applicando un voltaggio costante di 70V , nello stacking gel , e di 200 V nel running gel.

#### Running Buffer (5X)

Tris Base 15 g/l

Glicina 72 g/l

SDS 5 g/l

Le proteine sono state trasferite dal gel ad un filtro di nitrocellulosa (OSMOMIC) , utilizzando l'apparato Mini Trans-Blot (BioRad).

#### Transfer Buffer (1X)

25 mM Tris Base

192 mM Glicina

20% metanolo

## Western Blot

Il protocollo utilizzato per il western blot è il seguente:

- Saturare il filtro , incubandolo in PBS 1X + 0,1% Tween 20 + 5% latte, per 1 h , in agitazione costante.
- Incubare il filtro con l'anticorpo primario diluito in PBS 1X + 0.1 % Tween 20 + 5 %latte , per 1 h , in agitazione costante.
- Lavare per tre volte il filtro in PBS 1X + 0.1 % Tween 20 , incubandolo per 5' , 5' , 15' , in agitazione costante.
- Incubare il filtro con l'anticorpo secondario diluito in PBS 1X + 0.1% Tween 20 + 5% latte , per 45' , in agitazione costante.
- Lavare per tre volte il filtro in PBS 1X + 0.1% Tween 20 , incubandolo per 5' , 5' , 15' , in agitazione costante.

La rivelazione del segnale è stata realizzata utilizzando ECL Western Blot Detection Reagent (Amersham Biosciences) secondo le indicazioni del fornitore.

I filtri sono stati esposti a lastre autoradiografiche X-OMAR AR (Kodak).

L'anticorpo dai noi utilizzato è stato il Fetuin –A (H-4) (mouse monoclonal) della ditta Santa Cruz, numero catalogo 133146 e la diluizione applicata 1:750.

## **Lisi delle Cellule per il recupero dell'mRNA**

I monolayer epatocitici sono stato lisati con l' utilizzo di un buffer di lisi RLT fornito dalla Qiagen , ne è stata aggiunta una quantità di 350 ul secondo protocollo per ogni pozzetto.

- Velocizzare la lisi delle cellule pipettando 3 volte la soluzione sempre all'interno della piastra.
- Trasferire in colonne QIAshredder che provvederanno, dopo una centrifugazione a 13000 rpm per 2 minuti a trattenere il detrito cellulare.
- Aggiungere al sottوناتante della colonna un volume di 350 ul di Etanolo 70% e trasferire i 700 ul totali in una colonna RNeasy che servirà a legare l' RNA dopo una centrifugazione di 15 secondi a 10000 rpm.
- Lavare la colonna con 700 ul di buffer RW1 centrifugare per 15 secondi a 10000 rpm , e scartare il sottوناتante.
- Lavare la colonna con un secondo Buffer RPE (500 ul) e centrifugare per 15 secondi a 10000 rpm e scartare il sottوناتante.
- Ripetere l'operazione appena svolta con 500 ul di buffer RPE e centrifugare per 2 minuti a 10000 rpm scartando il sottوناتante. I lavaggi servono per rimuovere tutto l'etanolo utilizzato nei precedenti passaggi.

- Centrifugare un ultima volta per 1 minuto 13000 rpm a secco per asciugare la colonna e scartare eventuali residui.
- Eluire la colonna con Acqua RNAsi free fornita dalla ditta (50 ul).

### **Quantificazione dell'RNA allo spettrofotometro**

<b>Pozzetti con relativo trattamento a 24h</b>	<b>RNA campione ng/ul</b>
Paracalcitolo 5 nM	24,2
Paracalcitolo 10 nM	30,9
Paracalcitolo 20 nM	35
Calcitriolo 25 nM	38,6
Calcitriolo 50 nM	32,6
Calcitriolo 100 nM	23,8
Controllo negativo	32,6

### **Retrotrascrizione RNA in CDNA:**

In base alla quantità di RNA recuperato dai vari pozzetti calcolare una mix di reazione in modo da avere 200 Ng di RNA in soluzione per singolo campione retrotrascritto:

- 4 ul di 5x iScript reaction mix (non variabile)
- 1 ul di iScript reverse transcriptase (non variabile)
- 15 ul di soluzione RNA+acqua in base alle letture spettrofotometriche

<b>Pozzetti con relativo trattamento a 24h</b>	<b>RNA campione ng/uL</b>	<b>Q° di campione nella mix per ottenere 200 ng di RNA nella mix</b>	<b>Acqua</b>	<b>Totale mix</b>
<b>Paracalcitolo 5 nM</b>	24,2	8,2	6,8	15
<b>Paracalcitolo 10 nM</b>	30,9	6,5	8,5	15
<b>Paracalcitolo 20 nM</b>	35	5,7	9,3	15
<b>Calcitriolo 25 nM</b>	38,6	5,2	9,8	15
<b>Calcitriolo 50 nM</b>	32,6	6,1	8,9	15
<b>Calcitriolo 100 nM</b>	23,8	8,4	6,6	15
<b>Controllo negativo</b>	32,6	6,1	8,9	15

<b>Pozzetti con relativo trattamento a 48h</b>	<b>RNA campione ng/uL</b>	<b>Q° di campione nella mix per ottenere 200 ng di RNA nella mix</b>	<b>Acqua</b>	<b>Totale mix</b>
<b>Paracalcitolo 5 nM</b>	29,1	6,9	8,1	15
<b>Paracalcitolo 10 nM</b>	28,6	7	8	15
<b>Paracalcitolo 20 nM</b>	30,3	6,6	8,4	15
<b>Calcitriolo 25 nM</b>	25,3	7,9	7,1	15
<b>Calcitriolo 50 nM</b>	26,7	7,5	7,5	15
<b>Calcitriolo 100 nM</b>	25,9	7,7	7,3	15
<b>Controllo negativo</b>	27,5	7,3	7,7	15

Il protocollo di reazioni di retrotrascrizione prevede un'incubazione della mix nel ciclatore per 5 minuti a 25°C, 30 minuti a 42°C, 5 minuti a 85°C e un tempo di holding a 4°C opzionale.

## QT PCR in real-time

- Costruzione dei primer per la fetuina A: NM\_001622.2: primer di apertura in posizione 601-620 e primer di chiusura in posizione 662-687.

tacctttcccagcagagcacctgggttgggtcccgaagcctccaaccacctgcacgcctgccagggcctctc  
tggggcagccatgaagtccctcgtcctcgtcctttgtcttgcctcagctctggggctgccactcagccccac  
atggcccagggctgatttatagacaaccgaactgcatgatccagaaactgaggaagcagctctgggtggct  
atagactacatcaatcaaaaccttcccttggggatacaaaacacaccttgaaccagattgatgaagtaaaggt  
gtggcctcagcagccctccggagagctgtttgagattgaaatagacacccctggaaaccacctgccatgtgc  
tggacccccaccctgtggcaagatgcagcgtgaggcagctgaaggagcatgctgtcgaaggagactgtgat  
ttccagctgttgaaactagatggcaagttttccgtggtatacgcaaaatgtgattccagctccagactcagc  
cgaggacgtgcgcaaggtgtgccaagactgccccctgctggccccgctgaacgacaccaggggtgggtgcacg  
ccgcgaaagctgccctggccgccttcaacgctcagaacaacggctccaattttcagctggaggaaatttcc  
cgggctcagcttgtgccccctcccaccttctacctatgtggagtttacagtgtctggcactgactgtgttgc  
taaagaggccacagaggcagccaagtgtaacctgctggcagaaaagcaatatggcttttgaaggcaacac  
tcagtgagaagcttgggtggggcagaggttgcaagtgcactgcatggtgttccaaacacagcccgtgagctca  
cagcccccaaccagaaggtgccaatgaagcagctccccacaccctggtggaccagatgcacctccgtcccc  
tccacttggcgcacctggactccctccagctggctcacccccagactcccatgtgttactggcagctcctc  
caggacaccagttgcaccggggcactacgacctgcccacaccttcatgggtgtgggtctcattgggggtca  
ccctcaggagaagtgtcgcccccgaaaacacgcacagtggtgcagcctagtgttgggtgctgctgctgg  
gccagtggttccctccatgtccggggaggatcagacacttcaaggtctaggctagacatggcagagatgagg  
aggttttggcacagaaaacatagccaccattttgtccaagcctgggcatgggtggggggccttgtctgctgg  
ccacgcaagtgctcacatgcatctacattaatatcaagtcttgactccctacttcccgtcattcctcagag  
gacagaagcagagtggttgggttattgtttgacagaaggcattaggttgacaacttgtcatgattttgac  
ggtaagccaccatgattgtgttctctgcctctgggtgaccttcaaaaaccattggaactgtgactttgaa  
aggtgctctcagaacaacggctccaattttcagctggaggaaatttcccgggctcagcttgtgccccctccc  
accttctacctatgtggagtttacctgctaagcttatatgtgctgttaatgaaagtgcctgaaagacctt  
ccttaataaagaaggttctaagctgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

- Sottoporre il cDNA ricavato grazie alla retrotrascrizione ad una reazione di amplificazione in real-time per quantificare le copie di trascritto.
- Preparare 2 mix di reazione per singolo campione: una per la quantificazione del nostro trascritto (fetuina A), l'altra per un gene di controllo molto espresso nelle cellule (noi abbiamo scelto la ciclofilina a) di cui utilizziamo i seguenti primers su sequenza NM\_021130.3:  
Forward        GACCCAACACAAATGGTTCC        e        Reverse  
TTTCACTTTGCCAAACACCA secondo il protocollo :

- 5 ul mix 2x (biorad)
- 0.3 ul primer
- 3.7 ul acqua
- 1 ul c-DNA

per un volume totale di 10 ul.

Abbiamo eseguito le analisi in triplicato su ogni trattamento: quindi le mix sono state preparate per 21 campioni di fetuina A e 21 di ciclofilina per due cicli di QT PCR: uno per le 24 ore e l'altro per le 48 ore di trattamento. La temperatura di annealing è stata settata a 59° C.

# Elaborazione Dati

## Fase Clinica

Patients N°	Ca (mg/dl)			
	t0	t1	t4	t8
<b>1</b>	9,2	9,1	8,5	9,8
<b>2</b>	9,5	9,7	9,9	10,8
<b>3</b>	8,8	9	9,4	9,3
<b>4</b>	9,4	9,3	9,4	9,6
<b>5</b>	8,7	9	9	8,4
<b>6</b>	10,9	11	10,9	9,5
<b>7</b>	8,9	9,3	9,4	9
<b>8</b>	9,7	9,8	9,3	9,9
<b>9</b>	10,4	9,5	9,8	9,9
<b>10</b>	8,3	8,7	9,4	9,8
<b>mean</b>	9,38	9,44	9,5	9,6

Calcemia misurata ai tempi: basale, 1 settimana, 4 settimane e 8 settimane.

Patients N°	PO <sub>4</sub> (mg/dl)			
	t0	t1	t4	t8
<b>1</b>	7,3	8,6	7	6,8
<b>2</b>	6,9	7,9	7	8,3
<b>3</b>	2,3	2,4	5,6	4,6
<b>4</b>	6	5,9	5,4	6,8
<b>5</b>	5,4	6,9	6,4	9,3
<b>6</b>	6,2	5,7	5,3	5,6
<b>7</b>	7	6,7	6,4	4,2
<b>8</b>	3,7	3,4	5,4	5,3
<b>9</b>	6,8	6,2	4,7	7,3
<b>10</b>	6,9	5,9	6,3	4,3
<b>mean</b>	5,85	5,96	5,95	6,25

Fosforemia misurata ai tempi: basale, 1 settimana, 4 settimane e 8 settimane.

Patients N°	PTH (pg/ml)			
	t0	t1	t4	t8
<b>1</b>	416	269	212	68
<b>2</b>	415	212	353	126
<b>3</b>	207	182	146	147
<b>4</b>	574	644	538	498
<b>5</b>	646	563	640	530
<b>6</b>	305	472	412	703
<b>7</b>	715	709	433	549
<b>8</b>	518	449	526	361
<b>9</b>	640	1197	332	408
<b>10</b>	725	794	575	372
<b>mean</b>	516,1	549,1	416,7	376,2

Paratormonemia misurata ai tempi: basale, 1 settimana, 4 e 8 settimane.

Patients N°	Fetuin-A (ng/ml)			
	t0	t1	t4	t8
<b>1</b>	30,3	16,9	28,4	42,3
<b>2</b>	40,2	21,6	21,3	122
<b>3</b>	30,8	32,1	37,5	71,8
<b>4</b>	52,8	44,7	66,7	79,1
<b>5</b>	39,7	39,5	47,2	198
<b>6</b>	56,6	41,7	45	30,7
<b>7</b>	40,7	52,4	32,2	44,7
<b>8</b>	36,3	43,5	31	77,9
<b>9</b>	27	40,8	31,8	162
<b>10</b>	34	37	173	165
<b>mean</b>	38,84	37,02	51,41	99,35

Livelli ematici di fetuina A misurati ai tempi: basale , 1 settimana , 4 settimane e 8 settimane.

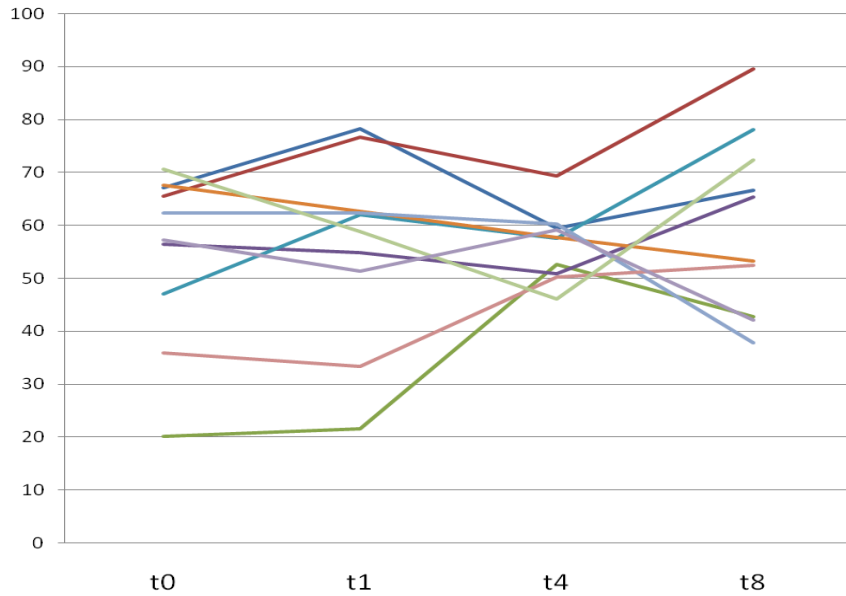
Patients N°	PCRhs (mg/dl)			
	t0	t1	t4	t8
<b>1</b>	2,2	2,1	2,3	2,1
<b>2</b>	0,7	1	0,8	0,6
<b>3</b>	10,82	6,47	0,49	0,2
<b>4</b>	0,33	0,2	0,21	0,3
<b>5</b>	2,12	2,09	1,78	2
<b>6</b>	0,08	0,05	0,04	2,84
<b>7</b>	0,18	0,07	0,1	0,11
<b>8</b>	0,44	0,32	0,38	0,41
<b>9</b>	2,57	5,21	1,13	2,01
<b>10</b>	0,25	0,21	0,48	0,24
<b>mean</b>	1,969	1,772	0,771	1,081

Livelli ematici di PCRhs misurati ai tempi: basale , 1 settimana , 4 settimane e 8 settimane.

Patients N°	Ca (mg/dl) * PO <sub>4</sub> (mg/dl)			
	t0	t1	t4	t8
<b>1</b>	67,2	78,3	59,5	66,6
<b>2</b>	65,6	76,6	69,3	89,6
<b>3</b>	20,2	21,6	52,6	42,8
<b>4</b>	56,4	54,9	50,8	65,3
<b>5</b>	47,0	62,1	57,6	78,1
<b>6</b>	67,6	62,7	57,8	53,2
<b>7</b>	62,3	62,3	60,2	37,8
<b>8</b>	35,9	33,3	50,2	52,5
<b>9</b>	70,7	58,9	46,1	72,3
<b>10</b>	57,3	51,3	59,2	42,1
<b>mean</b>	55,0	56,2	56,3	60,0

Valori del prodotto Calcio x Fosforo ematico calcolati ai tempi: basale , una settimana , 4 settimane e 8 settimane.

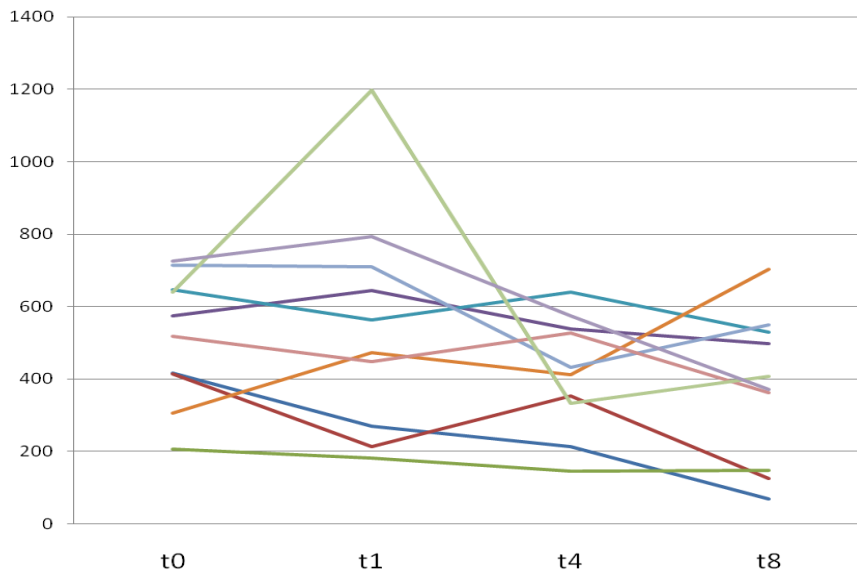
### Grafico Ca x P



Ca (mg/dl) \* PO4 (mg/dl)

p (t0 vs t8) 0,42

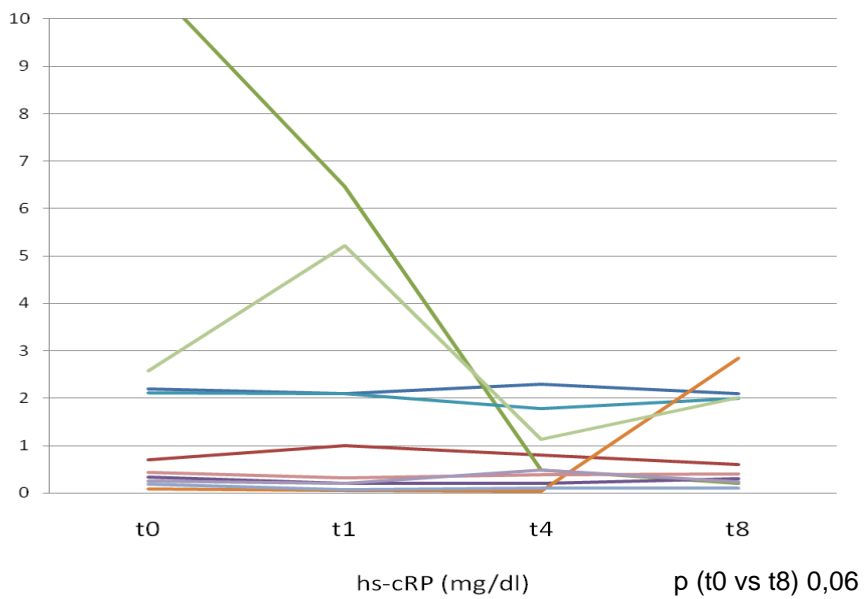
### Grafico PTH



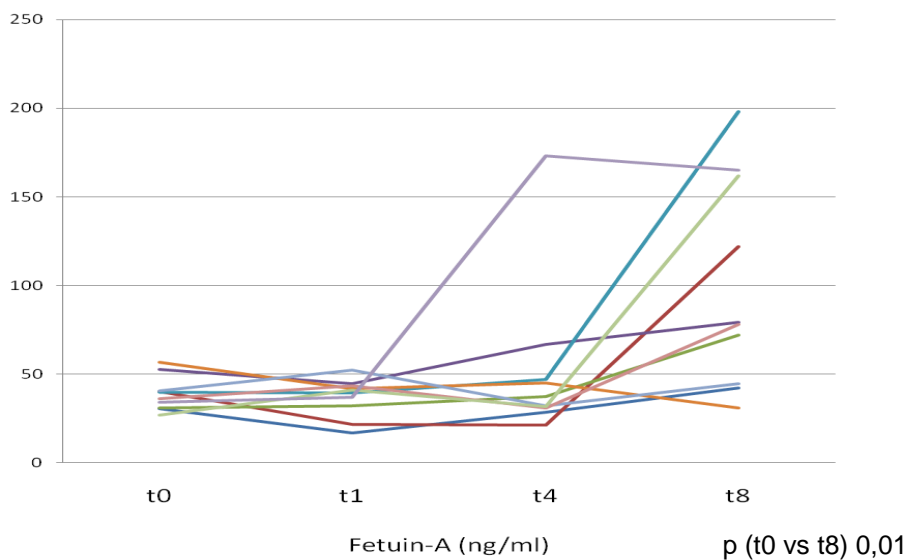
PTH (pg/ml)

p (t0 vs t8) 0,07

### Grafico PCR-hs



### Grafico Fetuina A

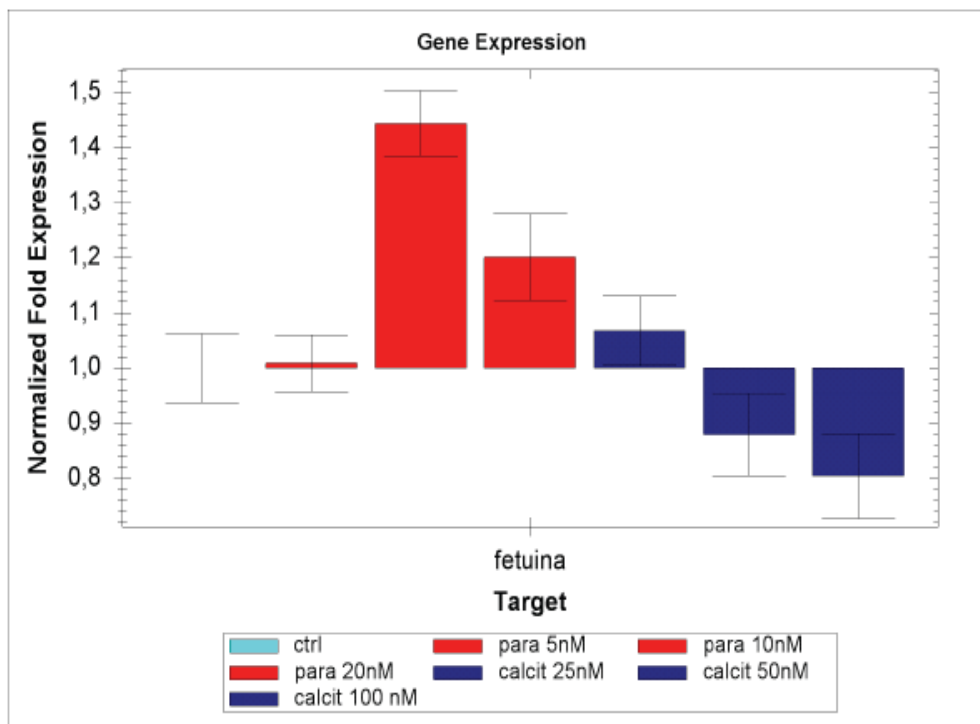


## Fase Preclinica -Quantificazione mRNA Fetuina A

Dati normalizzati dell'espressione genica post QRT PCR a **24 ore di trattamento** con concentrazioni diverse di paracalcitolo e calcitriolo rispetto al gruppo controllo

### Gene Expression Data

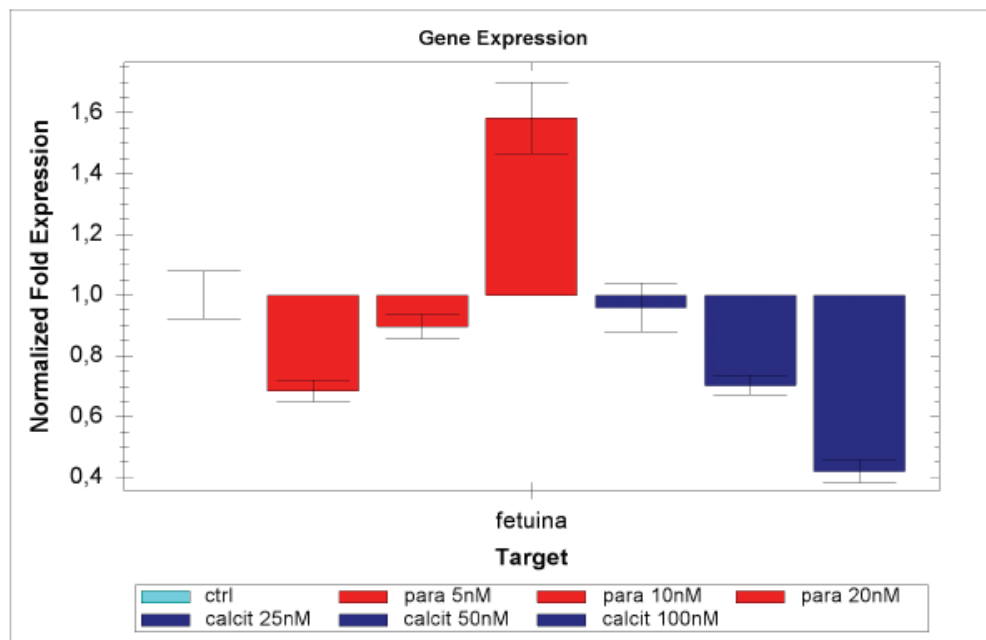
Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean C(t)	C(t) SEM
cyclofil	calcit 100 nM		N/A	N/A	N/A	25,00	0,12375
cyclofil	calcit 25nM		N/A	N/A	N/A	24,43	0,06527
cyclofil	calcit 50nM		N/A	N/A	N/A	24,76	0,08931
cyclofil	ctrl	*	N/A	N/A	N/A	24,65	0,07557
cyclofil	para 10nM		N/A	N/A	N/A	24,83	0,04630
cyclofil	para 20nM		N/A	N/A	N/A	24,75	0,06491
cyclofil	para 5nM		N/A	N/A	N/A	24,89	0,06534
fetuina	calcit 100 nM		0,80446	0,07666	0,07666	29,70	0,05988
fetuina	calcit 25nM		1,06800	0,06343	0,06343	28,72	0,05550
fetuina	calcit 50nM		0,88004	0,07468	0,07468	29,32	0,08374
fetuina	ctrl	*	1,00000	0,06281	0,06281	29,03	0,04999
fetuina	para 10nM		1,44369	0,05938	0,05938	28,68	0,04165
fetuina	para 20nM		1,20086	0,07872	0,07872	28,87	0,07371
fetuina	para 5nM		1,00892	0,05120	0,05120	29,26	0,03302



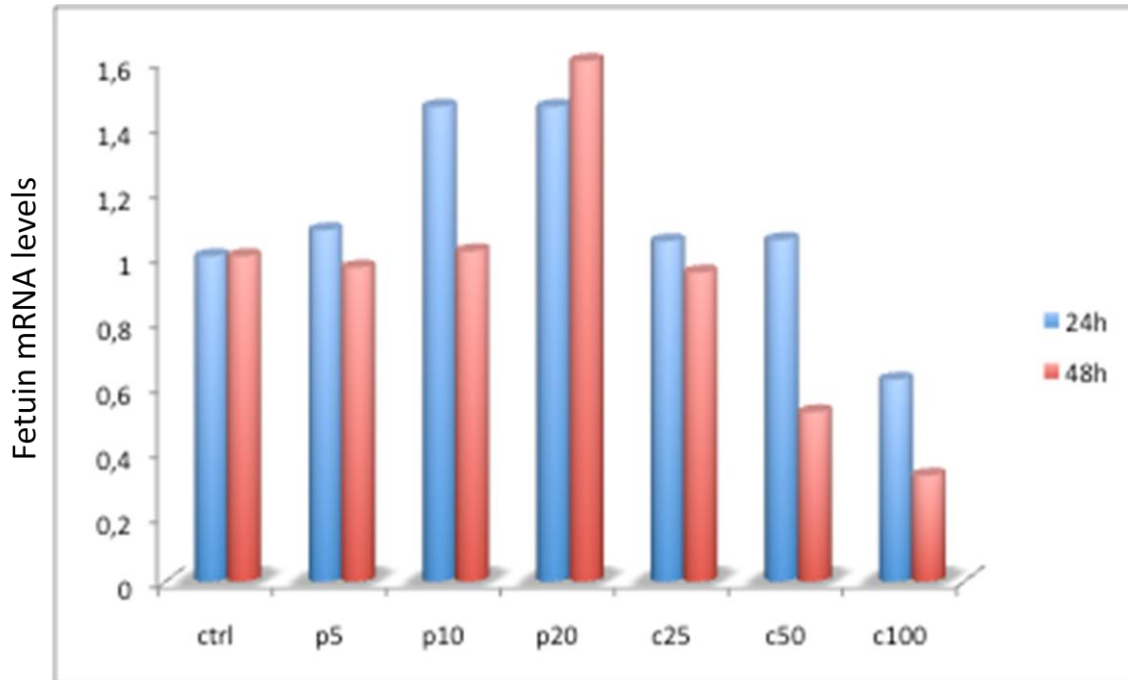
Dati normalizzati dell'espressione genica post QRT PCR a **48 ore di trattamento** con concentrazioni diverse di paracalcitolo e calcitriolo rispetto al gruppo controllo

### Gene Expression Data

Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean C(t)	C(t) SEM
cyclofil	calcit 100nM		N/A	N/A	N/A	23,71	0,12649
cyclofil	calcit 25nM		N/A	N/A	N/A	23,80	0,07778
cyclofil	calcit 50nM		N/A	N/A	N/A	24,02	0,02090
cyclofil	ctrl	*	N/A	N/A	N/A	24,11	0,10600
cyclofil	para 10nM		N/A	N/A	N/A	24,02	0,05039
cyclofil	para 20nM		N/A	N/A	N/A	24,29	0,07411
cyclofil	para 5nM		N/A	N/A	N/A	23,83	0,06873
fetuina	calcit 100nM		0,42089	0,03835	0,03835	27,99	0,03573
fetuina	calcit 25nM		0,95958	0,07953	0,07953	26,89	0,09081
fetuina	calcit 50nM		0,70379	0,03242	0,03242	27,56	0,06309
fetuina	ctrl	*	1,00000	0,07849	0,07849	27,15	0,03981
fetuina	para 10nM		0,89675	0,03961	0,03961	27,22	0,03901
fetuina	para 20nM		1,58327	0,11683	0,11683	26,66	0,07643
fetuina	para 5nM		0,68514	0,03614	0,03614	27,41	0,03269

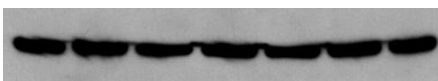


Dati normalizzati dell'espressione genica post QRT PCR a **24 e 48 ore di trattamento** con concentrazioni diverse di paracalcitolo e calcitriolo rispetto al gruppo controllo – integrazione tra i dati ricavati dalla prima e dalla seconda popolazione epatocitaria.

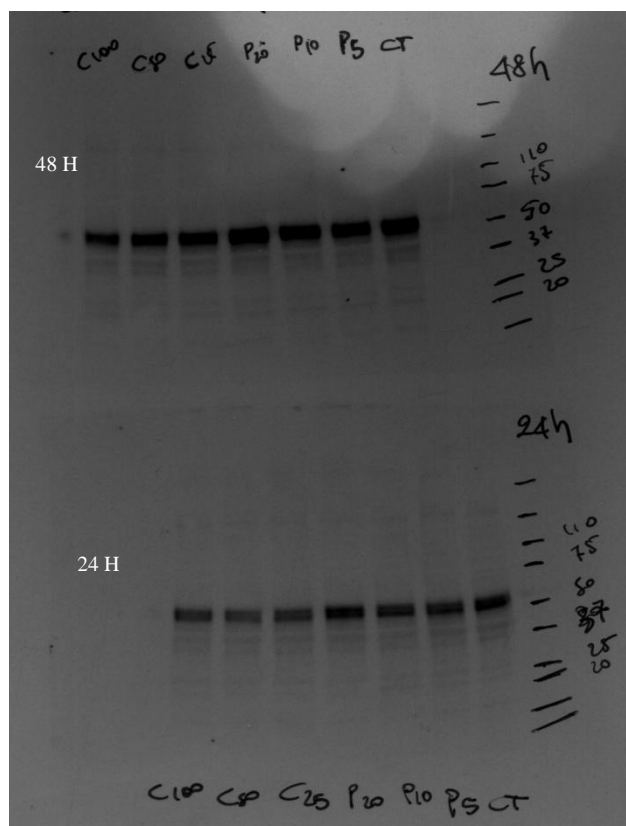


## Fase Preclinica - Analisi Western Blot Actina e Fetuina A

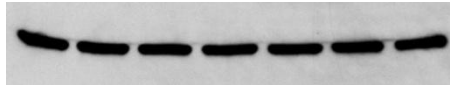
Actina 42 kDa esposizione 3 minuti



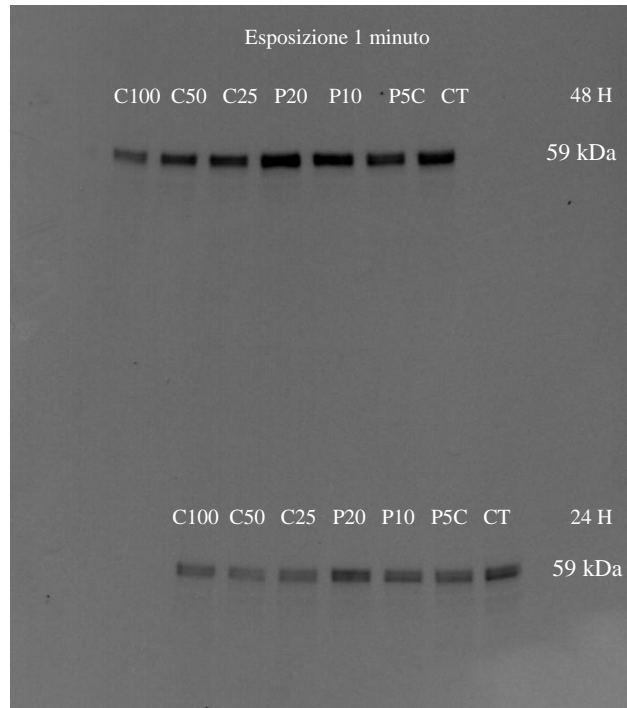
Fetuina A 59kDa esposizione a 3 minuti



**Actina 42 kDa esposizione 1 minuto**

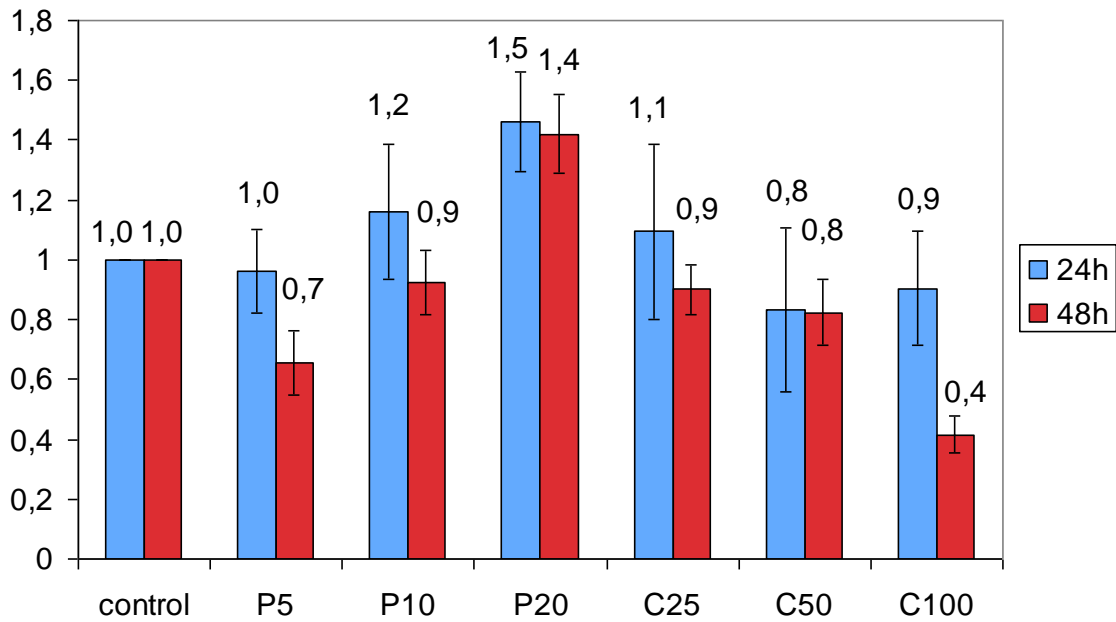


**Fetaina A 59 kDa esposizione a 1 minuto**



**Fase Preclinica - Analisi Western Blot Actina e Fetuina A – integrazione**

tra i dati ricavati dalla prima e dalla seconda popolazione epatocitaria



## Discussione Dati

La terapia con analoghi della vitamina D è considerata un approccio standard al trattamento dei pazienti con iperparatiroidismo secondario ad insufficienza renale cronica. Fra le diverse tipologie di analoghi, i pazienti con IRC in dialisi vengono anche trattati con paracalcitolo, un farmaco associato a un minor rischio di ipercalcemia e iperfosforemia.

Nella nostra casistica, una popolazione di pazienti con iperparatiroidismo secondario è stata trattata con paracalcitolo, ottenendo l'attesa significativa riduzione dei livelli di PTH rispetto al basale. In parallelo, è stato osservato un incremento non significativo dei valori di calcemia e fosforemia. Il prodotto CaxP è aumentato di conseguenza, ma senza raggiungere la significatività. Nessuna variazione di rilievo è stata riportata per i valori di albuminemia nel corso dello studio sicché, anche correggendo la calcemia per quest'ultimo dato, non sono emerse differenze di sorta. Nello stesso periodo è stata osservata un aumento dei livelli di fetuina A statisticamente significativa, il cui andamento è apparso del tutto disgiunto dalla condizione infiammatoria, essendo i valori degli indici aspecifici di flogosi sostanzialmente invariati a fine follow-up. Questa

osservazione è quindi da intendersi non correlabile alle proprietà immunomodulante ed antiflogistiche descritte altrove come attività pleiotropia degli analoghi della vitamina D.

Uno dei possibili effetti avversi del trattamento con vitamina D nei pazienti sottoposti ad emodialisi consiste nella possibilità di promuovere lo sviluppo di calcificazioni vascolari, notoriamente associate ad un aumento rilevante della mortalità cardiovascolare e globale. La preoccupazione che un trattamento con dosi farmacologiche di vitamina D o analogo possa determinare un aumento di intensità, frequenza e distribuzione delle calcificazioni vascolari appare giustificata in considerazione dell'aumento dei livelli di Ca e P conseguenti alla somministrazione di questo farmaco e mediata attraverso gli effetti sull'assorbimento intestinale e sull'osso.

Da un punto di vista fisiopatologico, le nostre osservazioni non solo dimostrano l'assenza di un aumento significativo del prodotto CaxP a seguito di un trattamento protratto con analogo non ipercalcemizzante della vitamina D, ma mostrano un aumento dei livelli di fetuina A che nella bilancia omeostatica del processo di calcificazione vascolare è considerato un fattore di protezione vascolare. Questi dati dimostrano come il trattamento con paracalcitolo costituisca un trattamento efficace dell'iperparatiroidismo secondario del paziente in emodialisi con possibili

effetti benefici sul processo di calcificazione vascolare mediati da un aumento indotto della fetuinemia.

I dati provenienti dalle colture epatocitiche , in risposta a diverse dosi e tempi di esposizione ai due analoghi della vitamina D, sembrano confermare il dato clinico , cioè una tendenza del paracalcitolo ad aumentare la sintesi di fetuina A. Notiamo un incremento di banda nel WB all'aumentare della dose , e un leggero aumento della quantità di mRNA rispetto al controllo; in controtendenza invece i dati del calcitriolo che inibiscono l' espressione della proteina in tutti e due i livelli di analisi (WB e mRNA). La letteratura ha mostrato finora sia su modelli murini che nell'uomo, come il trattamento con calcitriolo riduca i livelli ematici di fetuina A. Non sono disponibili in letteratura dati sull'effetto del paracalcitolo su tali livelli. Il nostro studio rappresenterebbe quindi la prima evidenza di un effetto opposto e protettivo del paracalcitolo rispetto al calcitriolo sulla sintesi di fetuina A e di conseguenza sulla protezione cardiovascolare.

I dati ancora non permettono un'analisi statistica adeguata, nonostante gli esperimenti siano già stati confermati con altre linee cellulari epatocitarie primarie che hanno confermato la ripetibilità e la significatività dei primi risultati.

Riteniamo utile proseguire con questo filone di ricerca dosando in vivo i livelli ematici di fetuina libera e di fetuin mineral complex per poter meglio valutare l'impatto clinico delle variazioni indotte dalle vitamine D: il dosaggio da noi effettuato, peraltro analogo a quello dei precedenti studi in letteratura, consiste nella valutazione della fetuina A totale. Quest'ultima non rappresenta però l'effettivo "potere tampone" del sistema, soprattutto in un ambiente saturato di Ca e P quale il torrente circolatorio di un paziente in emodialisi (147).

Un ulteriore progetto di sviluppo è rappresentato dal dosaggio con metodica ELISA della fetuina sul sovrantante delle colture epatocitarie a 24 e 48 ore. Alcuni dati preliminari non hanno mostrato alcun segnale, per possibile ritardo nella secrezione della fetuina A o per una sua sintesi inferiore alla sensibilità del metodo di rilevazione.

Alla luce della relazione lineare tra dose di paracalcitolo / calcitriolo e rispettivamente stimolazione / inibizione della trascrizione dell'mRNA (con analoga relazione con i livelli intracitoplasmatici di fetuina A) risulta interessante valutare l'effetto di dosi superiori di entrambe le vitamine D, ad esempio paracalcitolo 40 e calcitriolo 200 nM.

Il prolungamento della coltura epatocitaria primaria a 96 ore supera invece le possibilità del tipo di coltura: per valutare l'effetto dei farmaci a

tale distanza temporale sarà necessario utilizzare epatociti immortalizzati, con l'incognita delle possibili variazioni metaboliche insite nel modello differente.

## **Conclusioni**

L'uso della vitamina D e dei suoi analoghi è ampiamente diffuso nella pratica clinica del paziente con insufficienza renale cronica in trattamento dialitico. In particolare l'uso della vitamina D è riservato a quei pazienti che, a causa dell'inappropriata eliminazione del fosforo per via urinaria, o per la mancata idrossilazione in posizione 1alfa a livello renale della vitamina D circolante, vanno incontro progressivamente ad una disregolazione del metabolismo calcio-fosforico con conseguente ipocalcemia che determinerà nel tempo la comparsa di iperparatiroidismo secondario. L'iperparatiroidismo secondario produce una tossicità sistemica a carico dell'apparato cardiovascolare, che spiega l'aumentato rischio di morbilità e mortalità cardiovascolare nei pazienti con insufficienza renale.

Nonostante intensi studi, i meccanismi alla base dell'aumentata mortalità cardiovascolare dei pazienti uremici non sono ben noti, tuttavia si può assumere che l'imputato principale possa essere la deposizione di calcio

a livello vascolare, che è stato identificato come sicuro predittore di mortalità (148). Per questo l'iperparatiroidismo e il miglior controllo dei livelli sierici del calcio e del fosforo sono al centro degli sforzi dei nefrologi clinici da decenni.

Gli analoghi della vitamina D (aVitD) (calcitriolo, paracalcitolo) sono uno degli strumenti utilizzati per il miglior controllo dell'iperparatiroidismo. Gli aVitD presentano un rischio intrinseco di ipercalcemia ed iperfosforemia, determinando quindi un effetto possibilmente negativo nell'ambiente vascolare e possibilmente favorendo la deposizione di calcio-fosforo. Nonostante ciò, il controllo del PTH che si ottiene con questi farmaci, e l'azione pleiotropica ormai nota di tali sostanze, sembrano prevaricare l'eventuale effetto negativo sulle calcificazioni vascolari. Inoltre da alcuni anni studi non randomizzati di confronto fra calcitriolo e paracalcitolo avrebbero documentato una minore morbilità, mortalità nei pazienti in paracalcitolo (149). Tale differenza viene spiegata con la maggiore selettività recettoriale del paracalcitolo che sarebbe in grado di limitare l'assorbimento del calcio e del fosforo indotto dal calcitriolo (150)

La fetuina-A, insieme ad altri inibitori della calcificazione, è una proteina coinvolta nel mantenere un'adeguata omeostasi dell'equilibrio Ca-P. Infatti essa è in grado di costituire dei complessi con il Ca e il P

denominati fetuin-mineral complex (FMC) che ne impediscono la deposizione ectopica a livello dei tessuti. Qualsiasi stimolo, anche farmacologico, che favorisca un incremento del prodotto Ca-P determinerebbe quindi un aumento dei FMC circolanti, limitando quindi l'azione "tamponante" da parte della fetuina A. Recentemente è stato documentato che la somministrazione di Vitamina D causa la riduzione del 70% dei livelli circolanti di fetuina A nel topo, fenomeno dovuto probabilmente alla formazione del complesso circolante Ca-PO<sub>4</sub>-Fetuina, con conseguente consumo di fetuina A circolante.

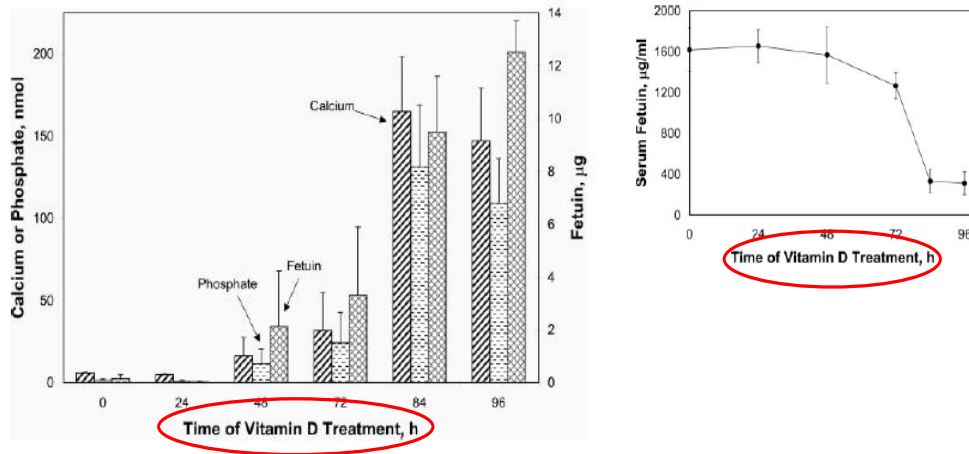
Il nostro gruppo ha però documentato che, diversamente da quanto atteso sulla base dei dati sul topo, la somministrazione di paracalcitolo, ai dosaggi utilizzati per controllare l'iperparatiroidismo, non induce riduzioni significative dei valori circolanti di fetuina A. Al contrario tali livelli incrementano nel tempo in modo significativo, lasciando intuire un meccanismo protettivo di difesa dalle calcificazioni vascolari innescato dallo stesso paracalcitolo mediante una stimolata sintesi di fetuina A. Tale dato qualora trovasse conferma potrebbe spiegare in parte il ruolo cardioprotettivo dell'attivazione dei recettori della Vitamina D.

Questo studio quindi, testando l'effetto degli aVitD sulla sintesi epatica di fetuina A, ha voluto verificare quello che era un riscontro clinico. Il

risultato confermerebbe l'esistenza di un meccanismo diretto del paracalcitolo sugli epatociti di incrementata sintesi di fetuina A, ma sorprendentemente riconosce un effetto invece inibitorio da parte del calcitriolo.

Possiamo supporre quindi, che come già osservato in altri tessuti, le due molecole svolgano azioni differenziate sul fegato. Il paracalcitolo più "steroido simile", rispettando le indicazioni provenienti da un precedente studio che documentava la capacità del desametasone di stimolare la sintesi di fetuina A a livello epatico; il calcitriolo invece, agendo ad un livello probabilmente diverso svolgerebbe un effetto inibitorio sulla sintesi di fetuina A. Il nostro dato sperimentale su epatociti umani conferma l'ipotesi che possa esistere un meccanismo protettivo di difesa dalle calcificazioni vascolari innescato dallo stesso paracalcitolo mediante una stimolata sintesi di fetuina A. Tale dato necessita di ulteriori riscontri, ma qualora trovasse conferma potrebbe spiegare in parte il ruolo cardioprotettivo dell'attivazione selettiva dei recettori della Vitamina D da parte del paracalcitolo. Diversamente il calcitriolo non sarebbe in grado di svolgere la stessa azione positiva, ma al contrario svolgerebbe un'azione inibente a livello epatico che potrebbe favorire, come già visto nello studio sperimentale su topo (Fig.5) un consumo di fetuina A.

## “Serum Levels of the Fetuin-Mineral Complex Correlate with Artery Calcification in the Rat”



“ ... There is a dramatic, 3 – fold reduction in circulating fetuin –A levels in Rats with ongoing artery calcification “ when vitamin-D is administered in rats

Price et al. , 2004 J Biol Chem  
279:1594-1600

**Fig. 5**

## Bibliografia

- 1) Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: S112–S119
- 2) Longenecker JC et al. Traditional cardiovascular disease risk factor in dialysis patient compared with general population: the CHOICE study. *JASN* 2002; 13: 1918-1927
- 3) Chazan JA, Pono LM. Sudden death in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *Dial Transplant* 1987; 16:447-448
- 4) Bradley JR, Evans DB, Vaine RY. Long term survival in hemodialysis patients. *Lancet* 1987; 1:295-296.
- 5) Maher ER, Curtis JR. Mortality and morbidity of long-term hemodialysis. *Lancet* 1987; 1:452.453.
- 6) Bryant JH, White WH. A case of calcification of the arteries and obliterative endoarteritis associated with hydronephrosis in a child aged six months. *Guy's Hospital Rep* 1898;55:17-19.
- 7) Brown CE, Richter LM. Medial coronarosclerosis in infancy. *Arch Pat* 1941;31:449-453.

- 8) Timio M. Cardiotoxicity of parathyroid hormone in chronic renal failure. *It J Min Electr Metabolism* 1995;9:119-124.
- 9) Raine AEG. Hypertension and ischemic heart disease in renal transplant recipient. *Nephrol Dial Tranplant* 1995;10 (Suppl 1):95-100.
- 10) Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ et al. A DNA variant in the angiotensin-converting enzyme gene locus associated with coronary heart disease in the Caerphilly Hearth Study. *Circulation* 1996;91:270-274.
- 11) Cambien F., Poirier O., Lecerf L., Evans A., Cambou JP., Arveiler D., Luc G., Bard JM., Bara L., Ricard S., Tiret L., Amouyel P., Alhenc-Gelas F., Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin – converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 35:641-644;1992.
- 12) Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW et al. Association of serum phosphorus and calcium  $\times$  phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 607–617
- 12) Goodman WG., Quarle D. Mineral homeostasis and bone physiology in *Clinical Guide to bone and mineral metabolism in CKD*, Klaus Olgaard editor, 2006, National kidney Foundation, Chapter 1, pp 3-17.

- 13) Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Apr;6(4):913-21.
- 14) Goldsmith DJ, Cunningham J. Mineral metabolism and vitamin D in chronic kidney disease - more questions than answers. *Nat Rev Nephrol*. 2011 Jun;7(6):341-6.
- 15) Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*. 2011 Oct;134(2):123-39.
- 16) Slominski AT, Kim TK, Janjetovic Z, Tuckey RC, Bieniek R, Yue J, Li W, Chen J, Nguyen MN, Tang EK, Miller D, Chen TC, Holick M. 20-Hydroxyvitamin D2 is a noncalcemic analog of vitamin D with potent antiproliferative and prodifferentiation activities in normal and malignant cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Mar;300(3):C526-41.
- 17) Dusso AS., Brown AJ., Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F8-F28.
- 18) Zehnder D., Bland R., Williams MC., et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:888-894.
- 19) Manolagas SC., Hustmyer FG., Yu XP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 191:238-245.

- 20) Yang S., Smith C., Prah J.M., et al. Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo. *Arch Biochem Biophys* 1993;303:98-106.
- 21) Yetgin S, Yalcin SS. Turk J The effect of vitamin D3 on CD 34 progenitor cells in vitamin D deficiency rickets. *Pediatr* 2004; 46:164-166.
- 22) Yetgin S, Ozsoylu S. Myeloid metaplasia in vitamin D deficiency rickets. *Scand J Haematol* 1982; 28:180-185.
- 23) Bastie JN., Balitrand N., Guidez F., et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D transrepresses retinoic acid transcriptional activity via vitamin D receptor in myeloid cells. *Mol Endocrinol* 2004;18:2685-2699.
- 24) Wu j., Garami M., Cheng T., et al. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1996; 97:1577-1588.
- 25) Boland R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 1986;7:434-448.
- 26) Cai Q., Tapper DN., Gilmour RF Jr., et al. Modulation of the excitability of avian peripheral nerves by vitamin D; relation to calbindin-D28k, calcium status and lipid composition. *Cell Calcium* 1994; 15:401-410.
- 27) Cantorna MT., Hayes CE., De Luca HF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7861-7864.

- 28) Garcion E., Wion-Barbot N., Montero-Menei CN., et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:100-105.
- 29) Naveh-Many T, Friedlaender MM, Mayer H, Silver J. Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 1989;125:275-80.
- 30) Karmali R, Farrow S, Hewison M, Barker S, O’Riordan JL. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cortisol on bovine and human parathyroid cells. *J Endocrinol* 1989;123:137-42.
- 31) Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Denda M, Morrissey J, Brown A, et al. A new analog of calcitriol, 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, suppresses parathyroid hormone secretion in uremic rats in the absence of hypercalcemia. *Am J Kidney Dis* 1995;26:852-60.
- 32) Shiizaki K, Negi S, Hatamura I, Sakaguchi T, Saji F, Kunimoto K, et al. Biochemical and cellular effects of direct maxacalcitol injection into parathyroid gland in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:97-108.
- 33) Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 1995;96:327-33.

- 34) González-Suárez I, Álvarez-Hernández D, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, Luis Fernández-Martín J, Cannata-Andia JB. Aluminum posttranscriptional regulation of parathyroid hormone synthesis: a role for the calcium-sensing receptor. *Kidney Int* 2005;68:2484-96.
- 35) Naveh-Many T, Almogi G, Livni N, Silver J. Estrogen receptors and biologic response in rat parathyroid tissue and C cells. *J Clin Invest* 1992;90:2434-8.
- 36) Angeletti RH, D'Amico T, Ashok S, Russell J. The chemokine interleukin-8 regulates parathyroid secretion. *J Bone Miner Res* 1998;13:1232-7.
- 37) Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro OM, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007;117:4003-8.
- 38) Silver J. Krronenberg HM in Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA Parathyroid hormone: molecular biology and regulation. (eds): Principles of bone biology, chapter 24, New York, 1996, pp 325-346.
- 39) Brown EM. Gamba G. Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger MA., Lytton J, and Hebert SC. Cloning and characterisation of an extracellular Ca<sup>++</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366;575-580, 1993.

- 40) Nishishita T., Okazaki T., Ishikawa T., et al. A negative vitamin D response DNA element in the human parathyroid hormone-related peptide genes binds to vitamin D receptor along with Ku antigen to mediate negative gene regulation by vitamin D. *J Biol Chem* 1998; 273: 10901-10907.
- 41) Demay MB., Kiernan MS., DeLuca HF., Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone genes that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8097-8101.
- 42) Brown EM. Calcium receptor and regulation of parathyroid hormone secretion. *Rev Endocr Metab Disord* 2000; 1:307-315.
- 43) Kifor O., Diaz R., Butters R., and Brown EM. The Ca<sup>++</sup>-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A<sub>2</sub> and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic Kidney (HEK293) cells. *J Bone Miner Res* 12;715-725, 1997.
- 44) Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R., Bai M., Yamaguchi T, Yao T. Kifor I, and Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK 293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280;F291-F302, 2001.

- 45) Silver J., Kilav R., Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F367-F376.
- 46) Brown EM. Four parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:572-581
- 47) Goodman WG., Quarles D. Mineral homeostasis and bone physiology in *Clinical Guide to bone and mineral metabolism in CKD*, Klaus Olgaard (ed), 2006, National Kidney Foundation, Chapter 1, pp3-25.
- 48) Mundy Gr., Reasner CA II. Fisiologia dell'osso ed omeostasi minerale. in Jay H. Stein: *Internal Medicine-Fourth Edition*, Mosby-Year Book Inc, St Louis, Missouri, chapter 114, pp868-874.
- 49) Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H, Wolf M: Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 359: 584–592, 2008
- 50) Ix JH, Shlipak MG, Wassel CL, Whooley MA: Fibroblast growth factor-23 and early decrements in kidney function: The Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant* 25: 993–997, 2010

- 51) Urena Torres P., Priè D., Molina-Bletry V., Beck L., Silve C., and Friedlander G. Klotho: An antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney International*,71;8:730-737, 2007.
- 52) Den Dekker E., Hoenderop JG., Nilius B., Bindels RJ. The epithelial calcium channels , TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* 33;497-507, 2003.
- 53) Lewin E, Olgaard K. Klotho, an important new factor for the activity of Ca<sup>++</sup> channels, connecting calcium homeostasis, ageing and uraemia. *NDT(2006)*,21; 7:1770-1772.
- 54) Block GA, Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *Am J Kidney Disease* 2000;35:1226-1237.
- 55) Rodriguez M., Martin-Malo A., Martinez ME., Torres A., Felsenfeld AJ., and Llach F. Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of phosphorus and its effects on calcitriol. *Kidney Int* 40;1055-1062, 1991.
- 56) Tallon S., Berdud I., Hernandez A., Concepcion MT., Almaden Y., Torres A., Martin-Malo A., Felsenfeld AJ., Aljama P., and Rodriguez M.

Relative effects of PTH and dietary phosphorus on calcitriol production in normal and azotemic rats. *Kidney Int* 49;1441-1446, 1996.

57) Almaden Y., Felsenfeld AJ., Rodriguez M., Canadillas S., Luque F., Bas A. Bravo J., Torregrossa V., Palma A., Ramos B., Sanchez C., Martin-Malo A., and Canalejo A. Proliferation in hyperplastic human and normal rat parathyroid glands: role of phosphate, calcitriol and gender. *Kidney Int* 64;2311-2317, 2003.

58) Almaden Y., Hernandez A., Torregrossa V., Canalejo A., Sabate L., Fernandez Cruz L., Campistol JM., Torres A., and Rodriguez M. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol* 9;1845-1853, 1998.

59) De Francisco AL., Cobo Ma., Setien MA., Rodrigo E., frenedo GF., Unzueta MT., Amado JA., Ruiz JC., Arias M., and Rodriguez M. Effect of serum phosphate on parathyroid hormone secretion during hemodialysis. *Kidney Int* 54;2140-2145, 1998.

60) Naveh-Many T., Rahaminov R., Livni N., Silver J. Parathyroid cell proliferation in normal and in chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate and vitamin D. *J Clin Invest* 1995;96:1786-1793.

- 61) Denda M., Finch J., and Slatoposky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure. *Am J Kidney Dis* 28;596-602, 1996.
- 62) Ritz E., seidel A., Ramish H., Sazbo A. and Bouillon R. Attenuated rise of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in response to parathyroid hormone in patients with incipient renal failure. *Nephron* 57;314-318, 1991.
- 63) Rodriguez M., Martin-Malo A. Martinez ME., Torres A., Felsenfeld AJ., and Llach F. Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of phosphorus and its effects on calcitriol. *Kidney Int* 40;1055-1062, 1991.
- 64) Somerville PJ and Kaye M. Action of phosphorus on calcium release in isolated perfused rat tails. *Kidney Int* 22; 348-354, 1982.
- 65) Bover J., Jara A., Trinidad P, Rodriguez M., and Felsenfeld AJ. Dynamics of skeletal resistance to parathyroid hormone in the rat: effect of renal failure and dietary phosphorus. *Bone* 25; 279-285, 1999.
- 66) Somerville PJ and Kaye M. Resistance to parathyroid hormone in renal failure: role of vitamin D metabolites. *Kidney Int* 14;245-254,1978.
- 67) Rodriguez M., Felsenfeld AJ and Llach F. Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of calcitriol and the effect of parathyroidectomy. *Kidney Int* 40; 1063-1068, 1991.

- 68) Somerville PJ and Kaye M. Evidence that resistance to the calcemic action of parathyroid hormone in rats with acute uremia is caused by phosphate retention. *Kidney Int* 16;552-560, 1979.
- 69) Josivofska T., Nonoguchi H., Machida K and Tomita K. Mechanisms of down-regulation of the renal parathyroid hormone receptor in rats with chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol* 93;e141-e149,2003.
- 70) Drueke TB. Abnormal skeletal response to parathyroid hormone and the expression of its receptor in uremia. *Pediatr Nephrol* 10;348-350, 1996.
- 71) Urena P., Kubrusly M., Mannstadt M., Hruby M., Trinh MM., Silve C., Lacour B., Abou-Samra AB., Sefre GV., and Druecke T. The renal PTH/PTHrP receptor is down regulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 45;605-611, 1994.
- 72) Tominaga Y., Tanaka Y., Sato K., Nagasaka T., and Tagagi H. Histopathology, pathophysiology and indications for surgical treatment of renal hyperparathyroidism. *Semin Surg Oncol* 13;78-86, 1997.
- 73) Tominaga Y., Kohara S., Namil Y., Nagasaka T., Haba T., Uchida K., Numano M., Tanaka Y., and Tagachi H. Clonal analysis of nodular parathyroid hyperplasia in renal hyperparathyroidism. *World J Surg* 20;744-750, 1996.

74) Tominaga Y., Sato K., Tanaka Y., Numano M., Uchida K., and Tagachi H. Histopathology and pathophysiology of secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure. *Clin Nephrol* 44, Suppl 1: S42-S47,1995.

75) Fukuda N., Tanaka H., Tominaga Y., Fukagawa M., Kurokawa K., and Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxivitamin D3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest* 92;1436-1443, 1993.

76) Gogusev J., Duchambon P., Hory B., Giovannini M., Goureau Y., Sarfati E., and Druecke TB. Decreased expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 51;328-336, 1997.

77) Wang X, Sun B., Zhou F., Hu J. Yu X., and Peng T. Vitamin D receptor and PCNA expression in severe parathyroid hyperplasia of uremic patients. *Chin Med J (Engl)*114;410-414, 2001.

78) Rodriguez M. Pathogenesis of refractory secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 61; S155-S160, 2002.

79) Almaden Y., Hernandez A., Torregrossa V., Canalejo A., Sabate L., Fernandez Cruz L., Campistol JM., Torres A., and Rodriguez M. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and

synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol* 9;1845-1852,1998.

80) Hruska K and Teitelbaum SL. Renal osteodistrophy. *N Eng J Med* 1995;333:166-174.

81) Sherrard DJ, Hercz G., Pei Y., et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure. An evolving disorder. *Kidney Int.* 1993;43:436-442.

82) Sutton RAL., and Camerol EC. Renal osteodystrophy: Pathophysiology. *Seminars in Nephrology* 1992;12:91-100.

83) Couttenye MM., D'Haese PC., Verschoren WJ, Schrooten J., De Broe ME. Low bone turnover in patients with renal failure. *Kidney Int Suppl* 73;S70-S76, 1999.

84) Salusky IB, Goodman WG. Adynamic renal osteodistrophy: is there a problem?. *J Am Soc Nephrol* 12;1978-1985, 2001

85) Huska KA. Growth factors and cytokines in renal osteodistrophy. in Bushinsky DA (ed): *Renal osteodistrophy*, Philadelphia, 1998, pp 221-225.

86) Alexopoulos N, Raggi P. Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:681-688.

87) Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006;99:1044-1059.

- 88) McCullough PA, Agrawal V, Danielewicz E, Abela GS. Accelerated atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1585-1598.
- 89) Wexler L, Brundage B, Crouse J, et al; Writing Group. Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications: a statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 1996;94:1175-1192.
- 90) Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1599-1605.
- 91) Prosdocimo DA, Wyler SC, Romani AM, O'Neill WC, Dubyak GR. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by extracellular pyrophosphate homeostasis: synergistic modulation by cyclic AMP and hyperphosphatemia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298:C702-C713.
- 92) Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension.* 2010;55:579-592.

- 93) Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1993;91:1800-1809.
- 94) Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:549-553.
- 95) Steitz SA, Speer MY, McKee MD, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* 2002;161:2035-2046.
- 96) Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:528-536.
- 97) Schinke T, Karsenty G. Vascular calcification—a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1272-1274
- 98) Luo G., Hofmann C., Bronckers AL., et al. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 1995;9:2808-2820
- 99) Wang S-N., Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2392-2399
- 100) Dorai H., Vukicevic S., Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and

stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol* 2000;184:37-45.

101) Nguyen TQ, Goldschmeding R. Bone morphogenetic protein-7 and connective tissue growth factor: novel targets for treatment of renal fibrosis? *Pharm Res.* 2008;25:2416-2426.

102) Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285:F1060-F1067

103) Olivier E, Soury E , Ruminy P , Husson A , Parmentier F , Daveau M et al. Fetuin B, a second member of the fetuin family in mammals. *Biochem J* 2000;350(Pt. 2):589-597.

104) Baskies AM., Chretien PB., Weiss JF., et al. Serum glycoproteins in cancer patients: first report of correlations with in vitro and in vivo parameters of cellular immunity. *Cancer* 1980;45:3050-3060.

105) Heiss A., DuChesne A., Denecke B., et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A. *J Biol Chem* 2003;278:13333-13341.

106) Demetriou M., Binker C., Sukhu B., et al. Fetuin/alpha 2-HS glycoprotein is a transforming growth factor beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J Biol Chem* 1996;271:12755-12761.

- 107) Heiss A , Duchesnc A , Denecke B , Grotzinger J , Yamamoto K , Renne T , et al . Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin A. formation of colloidal calciprotein particles. J Biol Chem 2003; 278(15):13333-13341.
- 108) Schafer C., Heiss A., Schwarz A., et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin alpha is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. J Clin Invest 2003;112:357-366.
- 109) Ketteler M., Bongartz P., Westenfeld R., et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross sectional Study. Lancet 2003;361:827-833.
- 110) Lebreton JP , et al. Serum concentration of human alpha 2HS glycoprotein during the inflammatory process: Evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. J Clin Invest 1979;64(4):1118-1129.
- 111) Wang H, Zhang M, Soda K, Sama A, et al. Fetuin protects the fetus from TNF. Lancet 1997; 350(9081):861-862.
- 112) Cozzolino M, Galassi A, Biondi ML, et al. Decreased serum fetuin-A levels after a single haemodialysis session. Nephrol Dial Transplant 2007; 22: 290-291.

113) Caglar K, Yilmaz MI, Saglam M, Cakir E, Acikel C, Eyileten T, Yenicesu M, Oguz Y, Vural A, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, and Stenvinkel P. Short-Term Treatment with Sevelamer Increases Serum Fetuin-A Concentration and Improves Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease Stage 4 Patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3(1): 61–68.

114) Ohnishi T, Nakamura O, Arakaki N, Daikuhara Y. Effect of phosphorylated rat fetuin on the growth of hepatocytes in primary culture in the presence of hepatocytes growth factor. Evidence that phosphorylated fetuin is a natural modulator of hepatocytes growth factor. *Eur. J. Biochem.* 1997; 243(3):753-761.

115) Srinivas PR , Wagner AS , Reddy LV , et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosin kinase level. *Mol. Endocrinol.* 1993;7(11):1445-1455.

116) Stefan N , Hennige AM , Staiger H , et al. Alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care* 2006; 29(4):853-857.

117) Ix JH, Shlipak MG , Branderburg VM , et al. Association between human fetuin –A and the metabolic syndrome: Data from the Heart and Soul Study. *Circulation* 2006; 376(14):1760-1767.

- 118) Smith ER, Nilforooshan R, Weaving G, Tabet N. Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;24(2):327-33.
- 119) Belloli L, Ughi N, Massarotti M, Marasini B, Biondi ML and Brambilla G. Role of Fetuin-A in Systemic Sclerosis-associated Calcinosis *J Rheumatol* 2010;37;2638-2639
- 120) Aksoy H, Aksoy Y, Ozturk N, Aydin HR, Yildirim AK, Akçay F. Fetuin-A gene polymorphism in patients with calcium oxalate stone disease. *Urology.* 2010 Apr;75(4):928-32.
- 121) Luo G., Ducy P., McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- 122) Shearer MJ. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:433-438.
- 123) Zebboudj AF., Shin V., Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* 2003;90:756-765.

124) Block Ga, Klassen PS, Lazarus JM., et al. Mineral metabolism, mortality and morbidity in maintenance haemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004,15(8): 2208-2218.

125) Braun J, Didendorff M et al. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients . *Am J Kidney Disease* 1996 March, 27(3):394-401.

126) Blacher J, Guerin AP et al. Arterial calcifications, arterial stiffness and cardiovascular risk in end stage renal disease. *Hypertension* 2001, Oct 38(4):938-942.

127) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12:1260-8.

128) Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273:14363-7.

129) Shoppet M, AL-Fakhri N, Franke FE, et al. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4104-12.

130) Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106: 1192-4.

131) Kiechl S, Schett G, Wenning G, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109: 2175-80.

132) Nitta K, Akiba T, Uccida K, et al. The progression of vascular calcification and serum osteoprotegerin levels in patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 303-9.

133) Mazzaferro S, Pasquali M, Pugliese F, et al. Serum Levels of Calcification Inhibition Proteins and Coronary Artery Calcium Score: Comparison Between Transplantation and Dialysis. *Am J Nephrol* 2007

134) Morena M, Terrier N, Jausset I, et al. Plasma osteoprotegerin is associated with mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 262-70.

135) Hjelemsaeth J, Ueland T, Flyvbjerg A, et al. Early posttransplant serum osteoprotegerin levels predict long-term (8 year) patient survival and cardiovascular death in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1746-54.

- 136) Haas M, Leko-Mohr Z, Roschger P, et al. Osteoprotegerin and parathyroid hormone as markers of high-turnover osteodystrophy and decreased bone mineralization in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 580-6.
- 137) Coen G, Ballanti P, Balducci A, et al. Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 233-8.
- 138) Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K, et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 525-32.
- 139) Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003;32: 681-6.
- 140) Towler Da. Inorganic pyrophosphate : a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25(4):651-654.
- 141) Fleish H, Russel RG , et al. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;212(5065):901-903.
- 142) Johnson K , Goding J , Van Etten D, et al. Linked Deficiencies in extracellular Ppi and osteopontin mediate pathologic calcification associated

with defective PC-1 and ANK expression. *J bone Miner Res* 2003 ; 18(6):994-1004.

143) Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S , et al. Mutations in ENPP1 are associated with “idiopathic” infantile arterial calcification. *Nat Genet* 2003 ; 34(4):379-381.

144) Johnson K, Polewsky M, et al. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP-1 <sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25(4):686-691.

145) Russell RG, Bisaz S , Fleish H. Pyrophosphate and Diphosphonates in calcium metabolism and their possible role in renal failure. *Arch Intern Med* 1969; 124(5):571-577.

146) Francis MD, Russel RG, Fleish H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystal in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 1969;165(899):1264-1266.

147) Smith ER, Holt SG. Important differences in measurement of fetuin-A. *Ann Intern Med.* 2010 Sep 21;153(6):419; author reply 419-920.

148) Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2001 Oct;38(4):938-942.

149) Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernán MA, Camargo CA Jr, Thadhani R. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Apr;16(4):1115-25.

150) Slatopolsky E, Cozzolino M, Finch JL. Differential effects of 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 1α-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on calcium and phosphorus in normal and uremic rats. *Kidney Int.* 2002 Oct;62(4):1277-84.