

EL COMPLEJO ESCENARIO DE LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO Y MINERAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Autores y afiliaciones:

Natalia Mejía^{2*}, Pablo Román-García^{1*}, Ana Belén Miar⁴, Beatriz Tavira³ y Jorge B. Cannata-Andía¹

1. *Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral, Instituto Reina Sofía de Investigación. REDinREN del ISCIII.*
2. *Servicio de Nefrología Pediátrica*
3. *Laboratorio de Genética Molecular, Instituto Reina Sofía de Investigación. REDinREN del ISCIII.*
4. *Dpto. de Morfología y Biología Celular, Unidad de Nutraceuticos del IUOPA.*

Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo, Asturias, España.

**Los autores marcados con asterisco comparten autoría como primer firmante*

Dirección para correspondencia.

Jorge B Cannata Andía . Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Instituto Reina Sofía de Investigación. Hospital Universitario Central de Asturias. C/ Julián Clavería s/n. 33006 Oviedo, Asturias. Spain .Teléfono: +34985106137 . Fax: +34985106142
E-mail:metoseo@hca.es

Resumen:

Las alteraciones del metabolismo óseo en el escenario de la enfermedad renal crónica (CKD-MBD) constituyen un dinámico campo de estudio. Al conjunto de reguladores clásicos del metabolismo óseo tales como calcio, fósforo, PTH y calcitriol se ha añadido el FGF-23. La calcificación vascular, una de las complicaciones más importantes de la enfermedad renal crónica, está sujeta a una compleja regulación en la que intervienen factores promotores e inhibidores del proceso de mineralización. La asociación entre calcificación vascular, desmineralización ósea y mortalidad y la existencia de factores y vías de señalización comunes, están siendo objeto de interesantes investigaciones.

Abstract:

The chronic kidney disease-bone and mineral disorders (CKD-MBD) represents a dynamic area of research. Recently, new factors such as FGF-23 have been added to the classic list of regulators of bone metabolism, which include calcium, phosphorus, PTH and calcitriol. Vascular calcification, one of the most important complication of CKD-MBD is regulated by a complex variety of promoters and inhibitors. The relationship between vascular calcification, bone loss and mortality, together with the existence of likely common signaling pathways are subject of interesting investigations

Palabras clave:

CKD-MBD, calcificación vascular, FGF-23, desmineralización ósea, hiperparatiroidismo secundario.

Conceptos clave:

Debido a sus efectos sobre riñón, glándula paratiroides y metabolismo de la vitamina D, el FGF-23 se ha añadido a la lista de reguladores del metabolismo óseo en la enfermedad renal crónica .

La calcificación vascular, una complicación importante de la enfermedad renal crónica está sujeta a una compleja regulación en la que intervienen factores promotores e inhibidores. del proceso de mineralización.

Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han demostrado una asociación entre la progresión de calcificación vascular y desmineralización ósea, sugiriendo que entre ambos procesos existe una interrelación que involucra a mediadores comunes que va más allá del conocido efecto que tiene la edad sobre ambas alteraciones.

Introducción

En individuos sanos, los riñones regulan la homeostasis del calcio y del fósforo a través de mecanismos activos de reabsorción tubular. En los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) los mecanismos homeostáticos están seriamente comprometidos dando lugar a diversos cambios adaptativos en los niveles de calcio (Ca), fósforo (P), paratohormona (PTH), vitamina D y factor de crecimiento fibroblástico (FGF-23).

Entre todas las alteraciones observadas en la ERC, las relacionadas con el metabolismo óseo y mineral generan un impacto significativo en la morbilidad y mortalidad. Tradicionalmente, estas anormalidades se englobaban dentro del término “osteodistrofia renal”. Recientemente, al conjunto de anormalidades bioquímicas como trastornos en el calcio, fósforo, vitamina D y PTH, alteraciones morfológicas del hueso consistentes en variación del remodelado, volumen y mineralización ósea y calcificaciones vasculares o de otros tejidos blandos se han incluido dentro del término “alteraciones minerales y óseas – enfermedad renal crónica” ó CKD-MBD por sus siglas en inglés ¹⁻³. Las manifestaciones clínicas son variadas, aunque destacan el hiperparatiroidismo secundario (HPTs), fracturas, dolores óseos, calcificaciones vasculares y eventos cardiovasculares, causantes de una menor calidad de vida con una alta morbi-mortalidad ⁴.

En esta revisión, se analiza con especial atención el eje Ca-P-PTH-vitamina D-FGF-23, el hiperparatiroidismo secundario, las calcificaciones vasculares y su relación con la densidad mineral ósea (DMO) en el escenario la CKD-MBD.

Eje Ca-P-PTH-vitaminaD- FGF-23

Los factores más importantes que regulan el metabolismo óseo y mineral son PTH, Ca, P, FGF-23 y el complejo hormonal de la vitamina D. Estos factores, además, están totalmente interrelacionados entre sí y sus efectos son variados dependiendo del órgano diana que estudiamos. La progresión de la ERC se asocia con un incremento precoz de FGF-23 y a una reducción de la masa renal funcional, ambos favorecen la disminución de la 1- α -hidroxilasa, enzima encargada de la síntesis de calcitriol, forma fisiológica activa de la vitamina D. El resultado final es el descenso de los niveles de esta hormona ⁵. El descenso de calcitriol afecta significativamente la absorción intestinal de calcio, favorece el descenso del mismo y estimula la PTH ⁶. En el hueso, la PTH estimula la liberación de Ca y P, mientras que en el riñón estimula la reabsorción de Ca e inhibe la reabsorción de fosfato. Además, la PTH aumenta la expresión de 1- α -hidroxilasa, favoreciendo así la síntesis de calcitriol que incrementa la absorción intestinal de Ca y P ⁷. Como resultado de esos cambios, aumenta el Ca y disminuye el P séricos ⁸.

La reducción de la función renal, también afecta directamente a la reabsorción de P. El riñón no es capaz de filtrar suficiente P, su elevación en sangre estimula directamente a la glándula paratiroides estimulando a su vez la síntesis y secreción de FGF-23 por parte de los osteocitos ⁹⁻¹². En principio se describió que el FGF-23 inhibía la reabsorción renal de P y la producción renal de calcitriol, ejerciendo efectos sinérgicos y contrarios a la PTH, respectivamente ¹³. No obstante, en estudios posteriores, se ha visto que el FGF-23 ejerce sus efectos no sólo en tejido renal sino también en la glándula paratiroides, donde en condiciones normales, activa la ruta de las *mitogen activated protein kinases* (MAPK) disminuyendo la síntesis y secreción de PTH ¹⁴. Para ello necesita unirse a sus receptores FGFR-1 y -3 y a su correceptor Klotho. El gen Klotho codifica para una proteína de transmembrana cuyo déficit en ratones produce un fenotipo de envejecimiento prematuro, caracterizado por arterioesclerosis, osteoporosis, calcificaciones en la capa media vascular,

músculo cardíaco y otros tejidos así como hiperfosforemia ¹⁵. La expresión de Klotho determina la especificidad del tejido por el FGF-23 y se ve aumentada por él en un mecanismo de retroalimentación.

Hiperparatiroidismo secundario

La glándula paratiroides es el principal órgano responsable de la homeostasis de Ca en el organismo, sensa la concentración de Ca sérico a través del receptor de Ca (CaR), también posee receptores de vitamina D (VDR) y su principal acción es la producción de PTH ¹⁶. El Ca iónico extracelular es el principal regulador de la paratiroides, los niveles bajos estimulan la secreción de PTH en cuestión de minutos, mientras que niveles elevados inhiben la liberación de la hormona y, además favorecen su degradación dentro de las propias células paratifoideas ¹⁷⁻¹⁹. El resultado es una respuesta de la glándula paratiroides de tipo sigmoidal, en la que pequeños cambios en el Ca iónico extracelular provocan grandes variaciones en la PTH, consiguiéndose su máxima inhibición en hipercalcemia. Los efectos del Ca sobre la PTH están mediados por su receptor específico, el CaSR ²⁰, un receptor perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, que se encuentra en la membrana de las células de la glándula.

El calcitriol actúa sobre la glándula paratiroides a través de su receptor específico, el VDR, receptor de alta afinidad y especificidad que pertenece a la familia de los receptores esteroideos/tiroideos ²¹. Cuando el calcitriol se une a su receptor, se produce la translocación del complejo calcitriol-VDR al núcleo de la célula, formando un heterodímero con el receptor X retinoico (RXR). El complejo calcitriol-VDR-RXR se une a *Elementos de Respuesta a Vitamina D* (VDRE) presentes en la región promotora del gen de PTH, bloqueando su transcripción. Además, el calcitriol es capaz de inhibir indirectamente la secreción de PTH, aumentando la absorción intestinal de calcio y a su vez, estimulando la resorción de los depósitos óseos de Ca ²²⁻²⁴.

En la ERC el control anómalo de la secreción de PTH ha sido atribuido en parte a la disminución de expresión de VDR y CaR que ocurren de forma paralela al crecimiento de la glándula paratiroides. La hiperplasia de las glándulas paratiroides con el consecuente incremento en la secreción de PTH son los responsables del HPTs observado en la ERC.

En las formas leves y moderadas de HPTs, la glándula paratiroides es todavía capaz de responder a sus principales reguladores como Ca, P y FGF-23^{25, 26}. En cambio, en estadios más avanzados, especialmente en el hiperparatiroidismo terciario, una forma de hiperparatiroidismo irreversible, frecuente en pacientes que llevan mucho tiempo en diálisis y en pacientes con trasplante renal, la glándula paratiroides tiene una escasa o nula respuesta a los estímulos habituales y presenta un elevado grado de autonomía²⁷.

FGF-23/Klotho y Ca/CaR actúan a través de mecanismos similares de la ruta MAPK sobre la glándula paratiroides¹⁴, con el objetivo común de disminuir la síntesis y secreción de PTH. La paradoja consiste en que, si bien en condiciones normales, el FGF-23 disminuye los niveles de PTH, en la insuficiencia renal crónica severa existe un aumento de los niveles tanto de FGF-23 como de PTH. Esto se debe a una reducción en la expresión de Klotho/FGFR en paratiroides necesarios para que el FGF-23 pueda ser efectivo y a un descenso en la activación de la MAPK²⁸.

Calcificaciones vasculares

La calcificación de los tejidos blandos ocurre en una gran proporción de pacientes con ERC y su descripción data del siglo XIX. Los tejidos que comúnmente se ven afectados son vasos sanguíneos, pulmón, riñón, miocardio, arterias coronarias, sistema nervioso central y mucosa gástrica. Las calcificaciones se asocian con múltiples factores como dosis excesivas de calcitriol, hiperfosforemia, tabaquismo, hipertensión arterial, elevación del producto $Ca \times P$, sobrecarga de calcio, diabetes y sexo masculino²⁹. En la ERC, las lesiones se observan fundamentalmente en la capa media pero también en la íntima, pudiendo afectar el flujo así como la rigidez vascular con el consecuente aumento en la presión arterial y la velocidad de la onda de pulso.

Las calcificaciones vasculares en la íntima arterial suelen estar asociadas a la existencia de placas ateroscleróticas previas. Afectan la capa media de las arterias de mediano calibre, la aorta y las coronarias, con una disposición concéntrica del Ca en las células del músculo liso vascular, produciendo rigidez y arterioesclerosis. En estas calcificaciones, se da una diferenciación fenotípica similar a la de las células óseas, produciendo una marcada disminución en la capacidad contráctil de las células musculares.

Las complicaciones vasculares suelen preceder a las alteraciones propias del hueso que ocurren mas tardíamente y de forma insidiosa ³⁰. Aunque todas las formas histológicas de osteodistrofia renal se han asociado con una mayor prevalencia de calcificaciones vasculares, la de mayor impacto es la que se observa en la osteodistrofia renal de bajo recambio.

Existe un gran número de factores promotores e inhibidores de la calcificación vascular. Los factores promotores son aquellos que favorecen la calcificación de los vasos y en condiciones de normalidad estos se ven superados por los inhibidores de la calcificación vascular que habitualmente circulan por la sangre. Con la edad y la ERC este proceso se invierte y los inhibidores de la calcificación se encuentran regulados a la baja, mientras que los promotores están regulados al alza.

Dentro de los promotores de la calcificación vascular, probablemente el más estudiado y el de mayor transcendencia es el fósforo, que ve facilitada su acción a través del cotransportador de Na/P denominado Pit-1. El Ca así como la osteopontina, osteocalcina, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP-2 y BMP4), sialoproteína ósea, colágeno tipo I y fosfatasa alcalina (ALP) y múltiples factores de transcripción (CbfaI/RUNX2 y MSX-2) han sido aislados como promotores de calcificación vascular ³¹⁻³⁶. Dentro de los inhibidores de la calcificación vascular hay varios tipos de proteínas implicadas. La Fetuína A (AHSG) es una molécula inhibidora de la formación de cristales de hidroxapatita que se encuentra en la circulación y existe una correlación entre el descenso de los niveles de AHSG y una elevada mortalidad en enfermos en hemodiálisis y enfermedad coronaria ³⁷. La osteoprotegerina (OPG) también participa en el proceso de inhibición de calcificación vascular. Estudios en ratones KO (OPG^{-/-}) demostraron la existencia de calcificaciones en la aorta, arterias renales y de osteoporosis ³⁸. Estudios en ratones KO para proteína de la matriz Gla (MGP), comprobaron la existencia de una calcificación de la capa media y del cartílago ³⁹. Dentro de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), la BMP-7 se encuentra asociada a la inhibición de la calcificación vascular. En ratones KO para la lipoproteína de baja densidad (LDL) se demostró que existe una regulación a la baja de la expresión de osteocalcina vascular en los animales tratados con BMP-7 ⁴⁰.

Relación entre desmineralización y calcificación vascular

A pesar de que la existencia de esta asociación se conoce desde hace 20 años⁴¹, esta asociación entre osteoporosis y calcificación vascular ha sido subestimada, posiblemente debido a que la desmineralización, osteoporosis y calcificación vascular han sido siempre considerados trastornos secundarios al envejecimiento. La edad no puede ser excluida como factor favorecedor, pero la evidencia de una frecuente asociación entre fragilidad ósea y calcificación vascular sugiere, además, que pueda existir una relación causal entre ambas. Los factores patogenéticos implicados en ambos procesos son todavía en gran parte desconocidos.

En 2004 un estudio realizado en una cohorte, demostró que la progresión de calcificación vascular estaba íntimamente ligada con la pérdida de hueso⁴². En el mismo sentido, otro estudio reciente con seguimiento durante 4 años, demostró que la mayor progresión de calcificaciones vasculares se relacionaba no sólo con un mayor descenso de masa ósea, sino también, con una mayor incidencia de fracturas osteoporóticas⁴³. Resultados similares han sido publicados en pacientes en diálisis, mostrando una mayor prevalencia de calcificaciones vasculares en vasos de mediano y pequeño calibre en pacientes con un mayor número de fracturas vertebrales⁴⁴.

En consecuencia, la información sobre este tema sugiere que la pérdida de masa ósea, el aumento de fracturas y una mayor prevalencia de calcificaciones vasculares podrían ser fenómenos asociados y no solo dependientes de la edad^{43, 45-47}. Para ayudar a esclarecer la relación entre masa ósea, calcificaciones vasculares y los factores implicados, los modelos murinos KO han sido de vital importancia. Un buen ejemplo es el ratón KO para OPG, un receptor soluble señuelo de TNF- α , que desarrolla osteoporosis severa y calcificación medial y subíntima, hallazgos que sugieren que esta proteína tiene efectos paradójicos en la mineralización ósea y la calcificación vascular⁴⁸. OPG se une e inhibe al ligando del activador del receptor de factor nuclear kappa β (RANKL)⁴⁹, que activa a RANK y es esencial para la maduración de los osteoclastos progenitores. Los ratones deficientes en OPG presentan aumento de calcificación vascular en arterias y osteoporosis atribuida a la estimulación de la actividad osteoclástica. Los mecanismos por los cuales

OPG y RANKL influyen las calcificaciones vasculares son todavía desconocidos, aunque nuevos estudios han implicado como factor mediador a la BMP-4 ⁵⁰.

La proteína transmembrana Klotho, implicada en el envejecimiento y que desempeña un papel crítico en la regulación del Ca, P y síntesis de vitamina D, también ha sido implicada en esta asociación ^{51, 52}. Ratones KO para el gen Klotho, desarrollan hiperfosforemia, calcificaciones vasculares y alteraciones en los osteoblastos y osteoclastos que conducen a una osteopenia de bajo remodelado ^{15, 53, 54}.

En conclusión, al complejo escenario de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral en la ERC, se han añadido nuevos factores como el FGF-23-Klotho. La calcificación vascular, una de las alteraciones mas importantes del metabolismo mineral, se asocia de una manera muy estrecha con la mortalidad en pacientes con ERC y más allá de un simple proceso físico-químico, su aparición está regulada de una manera compleja, y actualmente se están dedicando muchos esfuerzos a entender su regulación. Además, aspectos tales como la relación inversa entre calcificación vascular y desmineralización ósea y la existencia de factores y vías de señalización comunes, constituye un nuevo campo de investigación .

Bibliografía

1. Torregrosa JV, Bover Sanjuan J, Cannata Andia J, *et al.* Recomendaciones de la Sociedad Española de Nefrología para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2011; 31: 3-32.
2. Moe S, Drueke T, Cunningham J, *et al.* Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006; 69: 1945-1953.
3. Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care* 2008; 35: 215-237, v-vi.
4. Groothoff JW, Lilien MR, van de Kar NC, *et al.* Cardiovascular disease as a late complication of end-stage renal disease in children. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 374-379.
5. KBS. Calcium and Phosphorus Homeostasis. In: Avner E NP (ed). *Pediatric Nephrology*, 5 edn. Williams & Wilkins: Philadelphia, 2005, pp 1347-1373.
6. Jüppner HB KH. *Parathyroid Hormone*. Lippincot: Williams & Wilkins: Philadelphia, 1999.
7. Koch Nogueira PC, David L, Cochat P. Evolution of secondary hyperparathyroidism after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 342-346.
8. Drueke TB. Cell biology of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1141-1152.
9. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, *et al.* Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004; 113: 561-568.
10. Fukagawa M, Kazama JJ. FGF23: its role in renal bone disease. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 1802-1806.
11. Liu S, Tang W, Zhou J, *et al.* Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1305-1315.
12. Stubbs JR, Liu S, Tang W, *et al.* Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2116-2124.

13. Komaba H, Fukagawa M. FGF23: a key player in mineral and bone disorder in CKD. *Nefrologia* 2009; 29: 392-396.
14. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, *et al.* The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007; 117: 4003-4008.
15. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51.
16. Naveh-Many T, Silver J. Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest* 1990; 86: 1313-1319.
17. Duran CE, Torregrosa JV, Almaden Y, *et al.* [Dynamics of calcium-regulated PTH secretion in secondary hyperparathyroidism: comparison between "in vivo" vs. "in vitro" responses]. *Nefrologia* 2010; 30: 73-77.
18. Silver J, Yalcindag C, Sela-Brown A, *et al.* Regulation of the parathyroid hormone gene by vitamin D, calcium and phosphate. *Kidney Int Suppl* 1999; 73: S2-7.
19. Silver J, Levi R. Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005: S8-12.
20. Brown EM, Pollak M, Seidman CE, *et al.* Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. *N Engl J Med* 1995; 333: 234-240.
21. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999; 277: F157-175.
22. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, *et al.* Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 3294-3298.
23. Garfia B, Canadillas S, Canalejo A, *et al.* Regulation of parathyroid vitamin D receptor expression by extracellular calcium. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2945-2952.
24. Naveh-Many T, Marx R, Keshet E, *et al.* Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid in vivo. *J Clin Invest* 1990; 86: 1968-1975.
25. Canadillas S, Canalejo A, Santamaria R, *et al.* Calcium-sensing receptor expression and parathyroid hormone secretion in hyperplastic parathyroid glands from humans. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2190-2197.
26. Rodriguez M, Canadillas S, Lopez I, *et al.* Regulation of parathyroid function in chronic renal failure. *J Bone Miner Metab* 2006; 24: 164-168.

27. Locatelli F, Cannata-Andia JB, Drueke TB, *et al.* Management of disturbances of calcium and phosphate metabolism in chronic renal insufficiency, with emphasis on the control of hyperphosphataemia. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 723-731.
28. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, *et al.* FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1125-1135.
29. Milliner DS, Zinsmeister AR, Lieberman E, *et al.* Soft tissue calcification in pediatric patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 1990; 38: 931-936.
30. Hruska KA, Choi ET, Memon I, *et al.* Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD). *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 769-778.
31. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, *et al.* Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1478-1483.
32. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 489-494.
33. Giachelli CM, Speer MY, Li X, *et al.* Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005; 96: 717-722.
34. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, *et al.* Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61: 638-647.
35. Bostrom K, Watson KE, Horn S, *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; 91: 1800-1809.
36. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 213-216.
37. 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.
38. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
39. 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.

40. Davies MR, Lund RJ, Hruska KA. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1559-1567.
41. Frye MA, Melton LJ, 3rd, Bryant SC, *et al.* Osteoporosis and calcification of the aorta. *Bone Miner* 1992; 19: 185-194.
42. Schulz E, Arfai K, Liu X, *et al.* Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4246-4253.
43. Naves M, Rodriguez-Garcia M, Diaz-Lopez JB, *et al.* Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int* 2008; 19: 1161-1166.
44. Rodriguez-Garcia M, Gomez-Alonso C, Naves-Diaz M, *et al.* Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 239-246.
45. London GM, Marty C, Marchais SJ, *et al.* Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1943-1951.
46. Matias PJ, Ferreira C, Jorge C, *et al.* 25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 611-618.
47. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, *et al.* Association of bone activity, calcium load, aortic stiffness, and calcifications in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1827-1835.
48. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-1268.
49. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004; 95: 1046-1057.
50. Panizo S, Cardus A, Encinas M, *et al.* RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* 2009; 104: 1041-1048.
51. Torres PU, Prie D, Molina-Blety V, *et al.* Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int* 2007; 71: 730-737.
52. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 43-51.
53. Wong YF, Xu Q. Ablation of klotho and premature aging: is 1,25-dihydroxyvitamin D the key middleman? *Kidney Int* 2009; 75: 1137-1139.

54. Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 437-441.