



EXPRESIÓN DE ADAM17 Y NIVELES DE PTH SÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN DIABETES EN DIÁLISIS: POSIBLES IMPLICACIONES EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

Beatriz Martín-Carro Sara Panizo Raúl García-Castro Sara
Fernández-Villabrille Nerea González-García Minerva
Rodríguez-García Natalia Menéndez García Jesús M.
Fernández-Gómez Miguel A. Hévia-Suárez Elías Delgado Emilio
Sánchez-Alvarez Juan F. Navarro-González Manuel Naves-Díaz
Natalia Carrillo-López José L. Fernández-Martín Cristina
Alonso-Montes

PII: S0211-6995(25)00045-1

DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.nefro.2025.501335>

Reference: NEFRO 501335

To appear in: *NEFROLOGÍA*

Received Date: 19 December 2024

Accepted Date: 1 March 2025

Please cite this article as: Martín-Carro B, Panizo S, García-Castro R, Fernández-Villabrille S, González-García N, Rodríguez-García M, García NM, Fernández-Gómez JM, Hévia-Suárez MA, Delgado E, Sánchez-Alvarez E, Navarro-González JF, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Fernández-Martín JL, Alonso-Montes C, EXPRESIÓN DE ADAM17 Y NIVELES DE PTH SÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN DIABETES EN DIÁLISIS: POSIBLES IMPLICACIONES EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR (2025), doi: <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2025.501335>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2025 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U.

EXPRESIÓN DE ADAM17 Y NIVELES DE PTH SÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN DIABETES EN DIÁLISIS: POSIBLES IMPLICACIONES EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

Autores

Beatriz Martín-Carro^{a,b,*}, Sara Panizo^{a,b,c,*}, Raúl García-Castro^d, Sara Fernández-Villabril^{a,b,c}, Nerea González-García^{a,b,c}, Minerva Rodríguez-García^{a,c,e}, Natalia Menéndez García^e, Jesús M. Fernández-Gómez^{c,f}, Miguel A. Hévia-Suárez^{c,f}, Elías Delgado^{c,g}, Emilio Sánchez-Alvarez^{a,c,e}, Juan F. Navarro-González^h, Manuel Naves-Díaz^{a,b,c#}, Natalia Carrillo-López^{a,b,c#}, José L. Fernández-Martín^{a,b,c#}, Cristina Alonso-Montes^{a,b,c#}

*Misma contribución como primeros autores

#Autores para correspondencia

^fMisma contribución como últimos autores

Afiliaciones

^a Metabolismo Óseo, Vascular y Enfermedades Inflamatorias Crónicas, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Asturias, España. RICORS2040-RENAL (RD24/0004/006), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. bea_m15@hotmail.com (B. M.-C.); sarapanizogarcia@gmail.com (S. P.); sarafv0012@gmail.com (S. F.-V.); nereagonzalezgarcia04@gmail.com (N. G.-G.); mnaves.huca@gmail.com (M. N.-D.); ncarrillolopez.huca@gmail.com (N. C.-L.); jlfernandez.huca@gmail.com (J.L. F.-M.); cristinaam.huca@gmail.com (C. A.-M.)

^b Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, España.

^c Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^d Subdirección de Transformación, Innovación y Salud Digital, Servicio de Salud de las Islas Baleares (Ib-Salut), Ponent, Palma de Mallorca, España. rgccandanedo@gmail.com (R. G.-C.)

^e Unidad de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, España. minrodgar@hotmail.com (M. R.-G.); megarnatalia@gmail.com (N. M. G.); jesastur@hotmail.com (E. S.-A.)

^f Unidad de Gestión Clínica de Urología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, España. jmfernandezgomez23@gmail.com (J.M. F.-G.); hevia.urologo@gmail.com (M.A. H.-S.)

^g Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, España. Endocrinología, nutrición, diabetes y obesidad, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Asturias, España. Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. delgadoelias@uniovi.es (E. D.)

^h Servicio de Nefrología y Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife. RICORS2040-RENAL (RD24/0004/0022), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. Instituto de Tecnologías Biomédicas, Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Fernando Pessoa Canarias, Las Palmas de Gran Canaria. jnavgon@gobiernodecanarias.org (J.F. N.-G.)

Autores para correspondencia (dirección postal completa y correo electrónico)

Manuel Naves-Díaz: Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Av. de Roma s/n, 33011 Oviedo, Asturias, España. Correo electrónico: mnaves.huca@gmail.com

Natalia Carrillo-López: Metabolismo Óseo, Vascular y Enfermedades Inflamatorias Crónicas, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Av. Hospital Universitario s/n, 33011 Oviedo, Asturias, España. Correo electrónico: ncarrillolopez.huca@gmail.com

EXPRESIÓN DE ADAM17 Y NIVELES DE PTH SÉRICA EN PACIENTES CON Y SIN DIABETES EN DIÁLISIS: POSIBLES IMPLICACIONES EN LA CALCIFICACIÓN VASCULAR

RESUMEN

Antecedentes y objetivo

El estudio europeo COSMOS, que incluye 6797 pacientes en hemodiálisis procedentes de 20 países, mostró que los niveles elevados de PTH se asociaban con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes diabéticos comparados con no diabéticos. Los niveles de PTH elevados se han asociado a procesos inflamatorios. El objetivo de este estudio fue analizar en arterias epigástricas de pacientes en diálisis, si la diabetes y los niveles elevados de PTH podrían actuar sinérgicamente modulando la expresión de marcadores inflamatorios y de calcificación vascular (CV) a través de ADAM17 y/o su inhibidor, TIMP3.

Material y métodos

Se examinaron muestras de arterias epigástricas de 62 pacientes con enfermedad renal crónica, 31 no diabéticos y 31 diabéticos con características similares, obtenidas durante el trasplante renal. Se evaluó la expresión génica de ADAM17, TIMP3, marcadores inflamatorios (TNF α , VCAM e ICAM), α -actina, DKK1 y RUNX2, la expresión proteica de RUNX2 y la calcificación vascular. Los análisis se realizaron en función de la presencia/ausencia de diabetes y de los niveles de PTH sérica (utilizando el valor de la mediana como punto de corte). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante las pruebas estadísticas Chi-cuadrado en el caso de variables cualitativas o Wilcoxon en variables cuantitativas.

Resultados

En las arterias epigástricas de pacientes diabéticos se observó menor expresión génica de TIMP3 (1,0 (0,8) U.R. vs 0,6 (0,5) U.R.; $p=0,028$) y α -actina (1,0 (0,6) U.R. vs 0,7 (0,5) U.R.; $p=0,006$), mayor expresión génica de VCAM (1,0 (0,9) U.R. vs 2,1 (2,8) U.R.; $p=0,011$), TNF α (1,0 (1,1) U.R. vs 2,0 (1,9) U.R.; $p=0,008$) y RUNX2 (1,0 (0,8) U.R. vs 2,4 (2,8) U.R.; $p=0,009$) y mayor porcentaje de núcleos positivos para RUNX2 (14.9 (15.8) vs 31.1 (27.1); $p=0,038$) en comparación con los no diabéticos. Las arterias de pacientes con PTH por encima de la mediana mostraron mayor

expresión génica de ADAM17 (1,0 (0,6) U.R. vs 1,8 (1,6) U.R.; $p=0,026$). El aumento en la expresión de ADAM17 se mantuvo cuando se analizaron solo los pacientes diabéticos (1,0 (0,5) U.R. vs 2,9 (2,9) U.R.; $p=0,038$), pero no en los pacientes no diabéticos. La combinación de ambas circunstancias, PTH elevada y diabetes, se asoció con mayor expresión génica de RUNX2 (1,0 (0,8) U.R. vs 2,7 (3,3) U.R.; $p=0,019$), mayor porcentaje de núcleos positivos para RUNX2 (13.3 (17.0) vs 32.9 (27.2); $p=0,039$) y mayor índice de Kauppila (3,9 (5,0) vs 9,7 (7,3); $p=0,045$).

Conclusiones

Aunque se observaron cambios en la expresión génica de ADAM17 y TIMP3 en pacientes diabéticos que podrían relacionarse con un aumento en la síntesis y/o liberación de factores proinflamatorios, estos no parecen explicar la diferencia en la mortalidad asociada a niveles elevados de PTH entre pacientes diabéticos y no diabéticos que se observó en el estudio COSMOS. Sin embargo, el aumento de la mortalidad en pacientes diabéticos con PTH elevada podría estar relacionado con una mayor progresión de la CV mediado por RUNX2.

EXPRESSION OF ADAM17 AND SERUM PTH LEVELS IN DIALYSIS PATIENTS WITH AND WITHOUT DIABETES: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR VASCULAR CALCIFICATION

ABSTRACT

Background and Objective

The European COSMOS study, which included 6,797 haemodialysis patients from 20 countries, demonstrated that elevated PTH levels were associated with a higher risk of mortality in diabetic patients compared to non-diabetic ones. Elevated PTH levels have been linked to inflammatory processes. This study aimed to analyse, in epigastric arteries of dialysis patients, whether diabetes and elevated PTH levels might synergistically modulate the expression of inflammatory and vascular calcification (VC) markers through ADAM17 and/or its inhibitor, TIMP3.

Materials and Methods

Epigastric artery samples were examined from 62 chronic kidney disease patients, 31 non-diabetic and 31 diabetic with similar characteristics, obtained during kidney transplantation. The gene expression of ADAM17, TIMP3, inflammatory markers (TNF α , VCAM, and ICAM), α -actin, DKK1, and RUNX2, as well as protein expression of RUNX2 and vascular calcification, were evaluated. Analyses were performed based on the presence/absence of diabetes and serum PTH levels (using the median value as the cut-off). Differences between groups were assessed using Chi-squared tests for qualitative variables or Wilcoxon tests for quantitative variables.

Results

In the epigastric arteries of diabetic patients, there was lower gene expression of TIMP3 (1.0 (0.8) U.R. vs 0.6 (0.5) U.R.; $p=0.028$) and α -actin (1.0 (0.6) U.R. vs 0.7 (0.5) U.R.; $p=0.006$), higher gene expression of VCAM (1.0 (0.9) U.R. vs 2.1 (2.8) U.R.; $p=0.011$), TNF α (1.0 (1.1) U.R. vs 2.0 (1.9) U.R.; $p=0.008$), and RUNX2 (1.0 (0.8) U.R. vs 2.4 (2.8) U.R.; $p=0.009$), and a higher percentage of RUNX2-positive nuclei (14.9 (15.8) vs 31.1 (27.1); $p=0.038$) compared to non-diabetic patients. Arteries from patients with PTH levels above the median exhibited higher gene expression of ADAM17 (1.0 (0.6) U.R. vs 1.8 (1.6) U.R.; $p=0.026$). The increase in ADAM17 expression persisted when only diabetic patients were analysed (1.0 (0.5) U.R. vs 2.9 (2.9) U.R.; $p=0.038$), but not in non-diabetic patients. The combination of elevated PTH and diabetes was

associated with higher gene expression of RUNX2 (1.0 (0.8) U.R. vs 2.7 (3.3) U.R.; $p=0.019$), a higher percentage of RUNX2-positive nuclei (13.3 (17.0) vs 32.9 (27.2); $p=0.039$), and a higher Kauppila index (3.9 (5.0) vs 9.7 (7.3); $p=0.045$).

Conclusions

Although changes in ADAM17 and TIMP3 gene expression were observed in diabetic patients, potentially related to increased synthesis and/or release of pro-inflammatory factors, these do not appear to explain the difference in mortality associated with elevated PTH levels between diabetic and non-diabetic patients observed in the COSMOS study. However, the increased mortality in diabetic patients with elevated PTH may be linked to greater VC progression mediated by RUNX2.

Palabras clave: (6) ADAM17, PTH, Chronic kidney Disease, vascular calcification, epigastric arteries, inflammation.

Keywords: ADAM17; PTH; chronic kidney disease; vascular calcification; epigastric arteries; inflammation

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de calcificación vascular (CV) en pacientes de diálisis es superior al de la población general y se sitúa entre el 47-83% en aquellos con enfermedad renal crónica (ERC) y una tasa de filtración glomerular inferior a 60 mL/min/1,73 m² ¹⁻⁵. Esta prevalencia se ve aumentada en pacientes diabéticos con ERC donde la CV tiende a ser más severa y presentarse en etapas más tempranas de la enfermedad ^{1,6-8}, si bien no se suelen observar diferencias en los niveles de los factores pro-calcificantes clásicos como fósforo y factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) ⁹. Estos datos sugieren que en pacientes diabéticos podrían existir otros factores de riesgo asociados con la CV, como un mayor grado de inflamación ⁹ y un control inadecuado de la glucemia ¹⁰.

Resultados previos del estudio COSMOS (6797 pacientes de hemodiálisis de 20 países de Europa), mostraron que los pacientes diabéticos con niveles elevados de hormona paratiroidea (PTH) sérica tuvieron un mayor riesgo relativo de mortalidad que los no diabéticos¹¹, sugiriendo que los pacientes diabéticos podrían ser más sensibles a incrementos de PTH. En diversos estudios se ha observado una correlación entre PTH e inflamación, tanto en población general como en pacientes con hiperparatiroidismo primario¹²⁻¹⁴. En el mismo sentido, un estudio en pacientes en hemodiálisis con hiperparatiroidismo secundario mostró un descenso del cociente neutrófilos/linfocitos (marcador de inflamación) tras la paratiroidectomía¹⁵.

Estos resultados sugieren que una PTH elevada podría favorecer un mayor estado inflamatorio. Desde esa misma perspectiva, un estudio reciente basado en la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES) del Centro Nacional de Estadísticas de Salud (NCHS, USA) mostró que la inflamación podría afectar a los niveles de PTH, dado que el consumo de una

dieta proinflamatoria se asoció con un mayor riesgo de hiperparatiroidismo¹⁶. Uno de los posibles mecanismos implicados en este proceso inflamatorio podría ser la activación de ADAM17 (desintegrina y metaloproteinasa 17) o TACE (enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa -TNF α), un importante mediador de eventos de señalización asociados a procesos inflamatorios que participa en la adhesión celular y escisión proteolítica de varias moléculas de la superficie celular¹⁷. Esta posibilidad estaría respaldada por la observación de un aumento en la expresión/actividad de ADAM17 en la ERC¹⁸ y en condiciones de hiperglucemia¹⁹. De hecho, los ratones nulos para TIMP3, inhibidor de ADAM17¹⁷, presentan mayor inflamación y resistencia a insulina²⁰. Esta enzima también participa en la liberación de moléculas de adhesión celular, como VCAM e ICAM, que están involucradas en el reclutamiento de leucocitos y disfunción del endotelio vascular^{17, 21}.

La hipótesis del presente estudio fue que los pacientes diabéticos tendrían una mayor expresión de factores proinflamatorios, que podrían verse aumentados con niveles elevados de PTH, contribuyendo a un mayor riesgo y a un incremento de la CV. Por tanto, los objetivos de este estudio fueron analizar en arterias epigástricas la posible asociación entre la presencia de diabetes y/o los niveles de PTH con la expresión de ADAM17, su inhibidor (TIMP3), y otras moléculas procesadas por esta enzima como VCAM, ICAM y TNF α , además de marcadores de fenotipo muscular contráctil (α -actina) y osteogénico (RUNX2 y DKK1), y parámetros de calcificación como el contenido en calcio y el índice de Kauppila.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio retrospectivo en 62 pacientes en diálisis (31 no diabéticos y 31 diabéticos) sometidos a trasplante renal entre los años 2011 y 2023, de forma que por cada paciente diabético se seleccionó un paciente no diabético con características similares. Durante la cirugía de trasplante renal se recogió de cada paciente un fragmento de arteria epigástrica, sobrante del proceso, que fue dividido en dos o tres partes: una fue utilizada para la extracción de ARN, otra para la determinación del contenido en calcio y, cuando se dispuso de tejido suficiente, un tercer fragmento se incluyó en parafina para estudios de inmunohistoquímica.

De la historia clínica se recopilaron datos demográficos y antropométricos, como sexo, edad en el momento del trasplante, hábito tabáquico, índice de masa corporal (IMC); comorbilidades como hipertensión, hiperlipidemia y diabetes; tipo y tiempo en diálisis y

etiología de la enfermedad renal crónica; y datos bioquímicos promedio de los 6 meses previos al trasplante: PTH, fosfato, calcio, magnesio, albúmina y hemoglobina, que se midieron de forma centralizada en el laboratorio del Hospital Universitario Central de Asturias mediante un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (códigos 42/2011, 53/2014, 110/2017 y 2022.240). Todos los participantes firmaron el consentimiento informado para su inclusión en el estudio. El estudio fue realizado siguiendo los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la declaración de Helsinki.

Determinación de calcificación vascular

Para la determinación del contenido de calcio en la arteria epigástrica, se utilizó un fragmento que se congeló con nitrógeno líquido, se trituró en un mortero, se añadió HCl 0,6N y se mantuvo en agitación a 4°C durante 24 h. Después de una centrifugación, se midió el contenido en calcio en el sobrenadante mediante el método de O-cresolftaleína complexona ²². El pellet se resuspendió en tampón de lisis (125 mM de Tris y 2% SDS a pH 6,8) para extraer las proteínas y se cuantificaron utilizando el método de Lowry (Bio-rad, Hercules, CA, EE. UU.). El contenido de calcio se normalizó por el contenido total de proteína y se expresó como µg Ca/mg proteína.

También se evaluó la calcificación vascular de la aorta abdominal en cada paciente mediante una radiografía lateral de abdomen en la que se determinó el índice de Kauppila, que otorga una puntuación entre 0 y 24 ²³.

Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real en arterias epigástricas

Otro fragmento de arteria epigástrica se congeló en nitrógeno líquido y se trituró utilizando un mortero. Para la extracción del ARN se utilizó el reactivo Tri-Reagent® (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN copia se obtuvo utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem®, EE. UU.), seguido de una preamplificación de los genes objeto de estudio utilizando el kit TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystem®, EE. UU.). La expresión génica de ADAM17, TIMP3, VCAM, ICAM, TNFα, α-actina, RUNX2 y DKK1 se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un equipo

QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE. UU.) utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems, EE. UU.). Se utilizó gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como gen constitutivo. La cuantificación relativa de los genes se realizó utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ ²⁴. Los resultados se representaron como unidades relativas (U.R.).

Análisis inmunohistoquímico de la expresión y localización nuclear de RUNX2 en arterias epigástricas

En 38 muestras de arterias epigástricas (21 no diabéticos y 17 diabéticos) se analizó la expresión y localización nuclear de RUNX2 siguiendo el protocolo descrito previamente²⁵. En toda la sección de la muestra se analizó el número de núcleos positivos para RUNX2 y el total de núcleos. El resultado se expresó como porcentaje de la ratio número núcleos positivos para RUNX2/ total de núcleos de cada arteria epigástrica.

Análisis estadístico

Con los datos recogidos se analizaron la expresión génica, contenido en calcio y parámetros bioquímicos en pacientes diabéticos y no diabéticos. También se realizaron análisis en función de los niveles de PTH, para lo cual se dividió a la población a estudiar (todos los pacientes y por separado diabéticos y no diabéticos) en dos grupos: PTH baja (< mediana) o PTH elevada ($\geq$ mediana), en función de la mediana de los valores medios de PTH de los 6 meses previos al trasplante.

Los resultados se expresaron como medias y desviaciones estándar. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante las pruebas estadísticas Chi-cuadrado en el caso de variables cualitativas o Wilcoxon en variables cuantitativas. Las correlaciones se analizaron mediante el test de Spearman y se muestran como representaciones no paramétricas (rangos de valores paramétricos de las variables). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron utilizando el software R para Windows (versión 4.1.2; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

RESULTADOS

Características demográficas y valores bioquímicos de los pacientes estudiados

Se analizaron muestras de arterias epigástricas de 31 pacientes no diabéticos y 31 diabéticos sometidos a trasplante renal. La edad media de los pacientes fue de 60,8 (8,8) años,

el 67,7% fueron hombres y de media permanecieron 25 meses en diálisis, siendo la hemodiálisis el tipo de diálisis mayoritario. Las características de los pacientes se recogen en la Tabla 1. Los pacientes diabéticos presentaron un IMC significativamente mayor que los pacientes no diabéticos, mientras que los niveles de albúmina sérica fueron significativamente menores (Tabla 1). En los pacientes diabéticos la causa más frecuente de ERC fue la diabetes (67,7%) mientras que en los no diabéticos fueron la hipertensión arterial o nefroangioesclerosis hipertensiva (22,6%) y la Intersticial u obstructiva (22,6%).

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en sexo, edad, porcentaje de fumadores, hipertensión arterial, hiperlipidemia, tiempo en diálisis, tipo de diálisis, niveles medios de PTH, fósforo, calcio, magnesio y hemoglobina, en el índice de Kauppila o contenido en calcio de la arteria epigástrica.

Se observó una correlación positiva entre el contenido el calcio de la arteria epigástrica y la calcificación de la aorta abdominal determinado mediante el índice de Kauppila ($\rho = 0,392$, $p = 0,014$) (Figura Suplementaria 1).

Tabla 1. Características demográficas y valores bioquímicos en pacientes no diabéticos y diabéticos.

	Todos los pacientes	No Diabéticos	Diabéticos	p
N	62	31	31	
Sexo = Mujer (%)	20 (32,3)	11 (35,5)	9 (29,0)	0,786
Edad (años) (media (DS))	60,8 (8,8)	60,5 (9,8)	61,1 (7,9)	0,899
Fumador (%)	9 (18,0)	4 (15,4)	5 (20,8)	0,894
IMC (Kg/m ²) (media (DS))	26,9 (4,3)	25,5 (4,6)	28,4 (3,5)	0,011
Hipertensión arterial (%)	49 (96,1)	25 (92,6)	24 (100,0)	0,524
Hiperlipidemia (%)	24 (52,2)	13 (50,0)	11 (55,0)	0,969
Etiología Enfermedad renal crónica (%)				<0,001
Diabetes	21 (33,9)	0 (0,0)	21 (67,7)	
Glomerulonefritis	6 (9,7)	6 (19,4)	0 (0,0)	
HTA/nefroangioesclerosis hipertensiva	7 (11,3)	7 (22,6)	0 (0,0)	
Intersticial/obstructiva	10 (16,1)	7 (22,6)	3 (9,7)	
Poliquistosis renal	8 (12,9)	6 (19,4)	2 (6,5)	
Desconocida	7 (11,3)	4 (12,9)	3 (9,7)	
Otros	3 (4,8)	1 (3,2)	2 (6,5)	
Tipo Diabetes (%)				<0,001
Diabetes tipo I	4 (6,5)	0 (0,0)	4 (12,9)	
Diabetes tipo II	27 (43,5)	0 (0,0)	27 (87,1)	
No diabetes	31 (50,0)	31 (100,0)	0 (0,0)	
Tipo Diálisis (%)				0,336
Hemodiálisis	38 (61,3)	19 (61,3)	19 (61,3)	

	Todos los pacientes	No Diabéticos	Diabéticos	p
Peritoneal	22 (35,5)	12 (38,7)	10 (32,3)	
ERCA	2 (3,2)	0 (0,0)	2 (6,5)	
Tiempo en diálisis (meses) (media (DS))	25,0 (29,0)	21,3 (11,0)	28,6 (39,4)	0,647
PTH (pg/mL) (media (DS))	268,5 (183,4)	301,0 (222,5)	236,0 (129,2)	0,183
Fósforo (mmol/L) (media (DS))	1,4 (0,3)	1,4 (0,3)	1,3 (0,3)	0,621
Calcio (mmol/L) (media (DS))	2,3 (0,2)	2,3 (0,2)	2,3 (0,2)	0,784
Magnesio (mmol/L)	0,9 (0,1)	0,9 (0,1)	0,9 (0,1)	0,792
Albúmina (g/L) (media (DS))	38,3 (4,0)	39,5 (3,9)	36,5 (3,4)	0,006
Hemoglobina (g/dL) (media (DS))	11,5 (1,2)	11,5 (1,3)	11,5 (1,2)	0,539
Índice de Kauppila (media (DS))	6,4 (6,1)	5,2 (5,7)	7,9 (6,3)	0,112
Calcio arteria (µg Ca/mg prot) (media (DS))	287,6 (681,2)	286,2 (777,2)	289,3 (571,5)	0,071

DS: Desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; HTA: Hipertensión arterial; ERCA: Enfermedad renal Crónica Avanzada; PTH: hormona paratiroidea; prot.: proteína.

Análisis de expresión en pacientes no diabéticos y diabéticos

En los pacientes diabéticos, la expresión de TIMP3 y α -actina fue significativamente menor, mientras que la expresión de VCAM, TNF α y RUNX2 fue mayor en comparación con los pacientes no diabéticos (Tabla 2). En los pacientes diabéticos el porcentaje de núcleos positivos para RUNX2 fue significativamente mayor que en los pacientes no diabéticos (14.9 (15.8) vs 31.1 (27.1); $p = 0,038$) (Figura 1A y 1B).

Tabla 2. Niveles de expresión génica y marcadores de CV en pacientes no diabéticos y diabéticos.

	No Diabéticos	Diabéticos	p
N	31	31	
ADAM17 (U.R.)	1,0 (0,7)	1,1 (1,2)	0,356
TIMP3 (U.R.)	1,0 (0,8)	0,6 (0,5)	0,028
VCAM (U.R.)	1,0 (0,9)	2,1 (2,8)	0,011
ICAM (U.R.)	1,0 (1,5)	0,7 (1,0)	0,751
TNF α (U.R.)	1,0 (1,1)	2,0 (1,9)	0,008
α -Actina (U.R.)	1,0 (0,6)	0,7 (0,5)	0,006
RUNX2 (U.R.)	1,0 (0,8)	2,4 (2,8)	0,009
DKK1 (U.R.)	1,0 (0,9)	1,7 (2,4)	0,840

Los resultados se expresaron como medias y desviaciones estándar. U.R.: Unidades relativas.

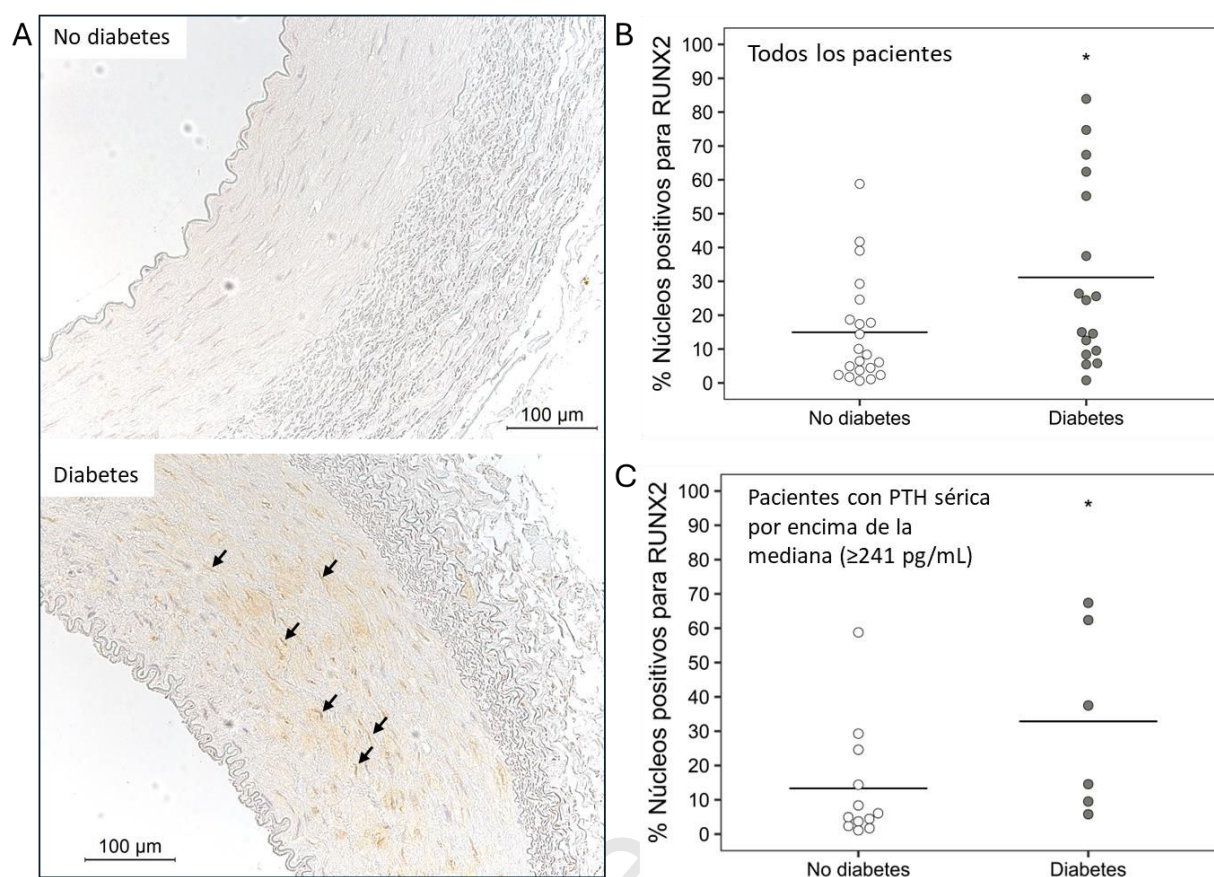


Figura 1. Inmunohistoquímica de RUNX2 en arterias epigástricas. A) Imágenes representativas de la expresión y localización de RUNX2 en arterias epigástricas de pacientes no diabéticos y diabéticos (flechas indican núcleos con tinción positiva para RUNX2). Cuantificación de núcleos positivos para RUNX2 respecto al total de núcleos en las arterias epigástricas de pacientes no diabéticos y diabéticos (* $p=0,038$) en B) y en pacientes no diabéticos y diabéticos con PTH sérica por encima de la media (≥ 241 pg/mL) (* $p=0,039$) en C), expresados en porcentaje.

Análisis de expresión en función de los niveles de PTH sérica

La mediana de los niveles de PTH sérico en los 62 pacientes incluidos en el estudio fue 241 pg/mL, valor que se utilizó para dividir a la población en dos grupos (PTH baja y PTH elevada) (Tabla 3).

En este caso, se observó que la expresión de ADAM17 en las arterias epigástricas fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con niveles séricos de PTH igual o por encima de la mediana. Por otro lado, los pacientes con niveles de PTH bajos presentaron mayor contenido de calcio en la arteria epigástrica.

No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados.

Tabla 3. Características demográficas, valores bioquímicos, niveles de expresión génica y marcadores de calcificación vascular en pacientes con PTH sérica baja (<241 pg/mL) y elevada (≥241 pg/mL).

	PTH Baja (<241 pg/mL)	PTH Elevada (≥241 pg/mL)	p
N	30	32	
Sexo = Mujer (%)	12 (40,0)	8 (25,0)	0,322
Edad (años) (media (DS))	61,9 (8,9)	59,8 (8,7)	0,544
IMC (Kg/m ²) (media (DS))	27,3 (4,2)	26,6 (4,4)	0,355
Tipo Diabetes (%)			0,584
Diabetes tipo I	2 (7,7)	2 (6,9)	
Diabetes tipo II	15 (50,0)	12 (37,5)	
No diabetes	13 (43,3)	18 (56,2)	
Tipo Diálisis (%)			0,329
Hemodiálisis	18 (60,0)	20 (62,5)	
Peritoneal	10 (33,3)	12 (37,5)	
ERCA	2 (8,7)	0 (0,0)	
Tiempo en diálisis (meses) (media (DS))	24,3 (28,6)	25,6 (29,7)	0,778
PTH (pg/mL) (media (DS))	154,6 (56,3)	375,4 (197,1)	<0,001
Fósforo (mmol/L) (media (DS))	1,3 (0,3)	1,4 (0,3)	0,071
Calcio (mmol/L) (media (DS))	2,3 (0,2)	2,3 (0,2)	0,698
Magnesio (mmol/L)	0,9 (0,1)	0,9 (0,1)	0,394
Albumina (g/L) (media (DS))	38,0 (4,6)	38,5 (3,4)	0,425
Hemoglobina (g/dL) (media (DS))	11,5 (1,0)	11,5 (1,4)	0,805
Índice de Kauppila (media (DS))	7,1 (6,0)	5,6 (6,2)	0,378
Calcio arteria (µg Ca/mg prot.) (media (DS))	348,3 (781,8)	216,9 (555,3)	0,005
ADAM17 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,6)	1,8 (1,6)	0,026
TIMP3 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,9)	1,1 (1,0)	0,822
VCAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,7)	0,9 (0,8)	0,508
ICAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,4)	1,4 (2,1)	0,499
TNFα (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,2)	1,8 (3,5)	0,272
α-Actina (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,8)	1,1 (0,8)	0,455
RUNX2 (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,2)	1,0 (1,4)	0,938
DKK1 (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,6)	1,3 (1,5)	0,078

U.R.: Unidades relativas; DS: Desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; ERCA: Enfermedad renal Crónica Avanzada; PTH: hormona paratiroidea; prot.: proteína.

Este mismo análisis se realizó teniendo en cuenta solo los pacientes con diabetes (Tabla 4). En este caso, la mediana de los valores de PTH en los pacientes diabéticos fue 223 pg/mL.

En pacientes diabéticos con niveles de PTH sérica igual y por encima de la mediana, la expresión de ADAM17 en las arterias epigástricas fue significativamente mayor comparado con aquellos con niveles de PTH por debajo de la mediana. No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados.

No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de PTH sérica y los marcadores de inflamación y calcificación analizados en este trabajo en los pacientes

diabéticos, aunque se puede observar una tendencia entre los niveles de PTH sérica y la expresión de ADAM17 en la arteria epigástrica ($\rho=0,359$, $p=0,051$) (Figuras suplementarias 2 y 4).

Tabla 4. Características demográficas, valores bioquímicos, niveles de expresión génica y marcadores de calcificación vascular en pacientes diabéticos con PTH sérica baja (<223 pg/mL) y elevada (≥ 223 pg/mL).

	PTH Baja (<223 pg/mL)	PTH Elevada (≥ 223 pg/mL)	p
N	15	16	
Sexo = Mujer (%)	6 (40,0)	3 (18,8)	0,365
Edad (años) (media (DS))	59,9 (8,9)	62,1 (6,9)	0,285
IMC (Kg/m ²) (media (DS))	29,3 (3,1)	27,4 (3,7)	0,356
Tipo Diabetes (%)			1,000
Diabetes tipo I	2 (13,3)	2 (12,5)	
Diabetes tipo II	13 (86,7)	14 (87,5)	
Tipo Diálisis (%)			0,298
Hemodiálisis	9 (60,0)	10 (62,5)	
Peritoneal	4 (26,7)	6 (37,5)	
ERCA	2 (13,3)	0 (0,0)	
Tiempo en diálisis (meses) (media (DS))	27,4 (39,4)	29,8 (40,7)	0,621
PTH (pg/mL) (media (DS))	135,9 (54,1)	329,9 (105,9)	<0,001
Fósforo (mmol/L) (media (DS))	1,2 (0,2)	1,5 (0,4)	0,091
Calcio (mmol/L) (media (DS))	2,3 (0,1)	2,2 (0,2)	0,214
Magnesio (mmol/L)	0,8 (0,1)	0,9 (0,1)	0,448
Albúmina (g/L) (media (DS))	36,8 (3,4)	36,1 (3,6)	0,640
Hemoglobina (g/dL) (media (DS))	11,1 (0,7)	11,8 (1,5)	0,340
Índice de Kauppila (media (DS))	7,1 (5,9)	9,7 (7,3)	0,423
Calcio arteria (μ g Ca/mg prot) (media (DS))	283,0 (534,8)	302,0 (693,6)	0,092
ADAM17 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,5)	2,9 (2,9)	0,038
TIMP3 (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,0)	1,2 (1,3)	0,477
VCAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,6)	0,8 (0,8)	0,553
ICAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,5)	0,8 (0,9)	0,843
TNF α (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,1)	1,1 (1,1)	0,647
α -Actina (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,9)	1,2 (1,1)	0,553
RUNX2 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,9)	1,5 (1,9)	0,600
DKK1 (U.R.) (media (DS))	1,0 (2,0)	1,7 (2,0)	0,206

U.R.: Unidades relativas; DS: Desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; ERCA: Enfermedad renal Crónica Avanzada; PTH: hormona paratiroidea; prot.: proteína.

El mismo análisis fue realizado en los pacientes no diabéticos, siendo el valor de la mediana para dividir la población en PTH baja y elevada de 245 mg/dL (Tabla 5).

En el grupo de pacientes no diabéticos se encontró que el contenido en calcio de la arteria epigástrica de los pacientes con PTH baja era significativamente mayor comparado con los pacientes no diabéticos con PTH elevadas. No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados (Tabla 5).

No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de PTH sérica y los marcadores de inflamación y calcificación analizados en este trabajo en los pacientes no diabéticos (Figuras suplementarias 3 y 5).

Tabla 5. Características demográficas, valores bioquímicos, niveles de expresión génica y marcadores de calcificación vascular en pacientes no diabéticos con niveles de PTH sérica baja (<245 pg/mL) y elevada (≥245 pg/mL).

	PTH Baja (<245 pg/mL)	PTH Elevada (≥245 pg/mL)	p
N	15	16	
Sexo = Mujer (%)	5 (33,3)	6 (37,5)	1,000
Edad (años) (media (DS))	61,1 (11,3)	60,0 (8,5)	0,526
IMC (Kg/m ²) (media (DS))	25,1 (4,3)	25,9 (4,9)	0,938
Tipo Diálisis (%)			1,000
Hemodiálisis	9 (60,0)	10 (62,5)	
Peritoneal	6 (40,0)	6 (37,5)	
ERCA	0 (0,0)	0 (0,0)	
Tiempo en diálisis (meses) (media (DS))	22,2 (12,0)	20,4 (10,3)	0,635
PTH (pg/mL) (media (DS))	175,7 (56,6)	418,6 (256,1)	<0,001
Fósforo (mmol/L) (media (DS))	1,3 (0,3)	1,5 (0,3)	0,253
Calcio (mmol/L) (media (DS))	2,2 (0,2)	2,3 (0,2)	0,361
Magnesio (mmol/L)	0,9 (0,1)	0,9 (0,2)	0,382
Albúmina (g/L) (media (DS))	39,0 (5,5)	40,0 (2,4)	0,481
Hemoglobina (g/dL) (media (DS))	11,7 (1,4)	11,4 (1,2)	0,444
Índice de Kauppila (media (DS))	7,2 (6,4)	3,9 (5,0)	0,189
Calcio arteria (µg Ca/mg prot) (media (DS))	435,4 (1058,3)	174,3 (501,9)	0,047
ADAM17 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,8)	1,0 (0,6)	0,553
TIMP3 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,8)	1,0 (0,9)	0,607
VCAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,1)	1,1 (0,9)	0,406
ICAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,0)	2,0 (3,0)	1,000
TNFα (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,1)	2,6 (5,9)	0,722
α-Actina (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,6)	1,0 (0,6)	0,874
RUNX2 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,8)	1,0 (0,9)	0,827
DKK1 (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,1)	0,8 (0,5)	0,937

U.R.: Unidades relativas; DS: Desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; ERCA: Enfermedad renal Crónica Avanzada; PTH: hormona paratiroidea; prot: proteína.

Análisis de expresión en pacientes diabéticos y no diabéticos con PTH elevada

En el grupo de pacientes con niveles de PTH sérica iguales o por encima de la mediana la expresión de RUNX2 y el índice de Kauppila fueron significativamente mayores en los pacientes diabéticos comparados con los no diabéticos (Tabla 6). También se observó un aumento significativo en el porcentaje de núcleos positivos para RUNX2 del total de núcleos en las arterias epigástricas de los pacientes diabéticos respecto a los no diabéticos con PTH elevadas (13.3 (17.0) vs 32.9 (27.2); p=0,039) (Figura 1C).

Tabla 6. Características demográficas, valores bioquímicos, niveles de expresión génica y marcadores de calcificación vascular en pacientes no diabéticos y diabéticos con PTH sérica por encima de la mediana (≥ 241 pg/mL).

	No Diabéticos	Diabéticos	p
N	18	14	
Sexo = Mujer (%)	6 (33,3)	2 (14,3)	0,411
Edad (años) (media (DS))	58,9 (10,3)	60,9 (6,4)	0,423
IMC (Kg/m ²) (media (DS))	26,3 (5,0)	27,0 (3,5)	0,505
Tipo Diabetes (%)			<0,001
Diabetes tipo I	0 (0,0)	2 (14,3)	
Diabetes tipo II	0 (0,0)	12 (85,7)	
No diabetes	18 (100)	0 (0,0)	
Tipo Diálisis (%)			1,000
Hemodiálisis	11 (61,1)	9 (64,3)	
Peritoneal	7 (38,9)	5 (35,7)	
Tiempo en diálisis (meses) (media (DS))	21,2 (10,7)	31,2 (43,5)	0,939
PTH (pg/mL) (media (DS))	398,9 (247,2)	345,1 (104,6)	0,662
Fósforo (mmol/L) (media (DS))	1,4 (0,3)	1,5 (0,4)	0,664
Calcio (mmol/L) (media (DS))	2,3 (0,2)	2,2 (0,2)	0,397
Magnesio (mmol/L)	0,9 (0,2)	0,9 (0,1)	0,960
Albúmina (g/L) (media (DS))	39,6 (2,8)	36,1 (3,6)	0,051
Hemoglobina (g/dL) (media (DS))	11,3 (1,3)	11,8 (1,6)	0,556
Índice de Kauppila (media (DS))	3,9 (5,0)	9,7 (7,3)	0,045
Calcio arteria (μ g Ca/mg prot) (media (DS))	174,3 (501,9)	302,0 (693,6)	0,160
ADAM17 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,5)	1,5 (1,5)	0,732
TIMP3 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,9)	0,8 (0,9)	0,543
VCAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,8)	1,8 (1,7)	0,063
ICAM (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,5)	0,6 (0,6)	0,790
TNF α (U.R.) (media (DS))	1,0 (2,3)	0,8 (0,8)	0,102
α -Actina (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,6)	0,9 (0,8)	0,271
RUNX2 (U.R.) (media (DS))	1,0 (0,8)	2,7 (3,3)	0,019
DKK1 (U.R.) (media (DS))	1,0 (1,0)	2,4 (2,6)	0,210

U.R.: Unidades relativas; DS: Desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; PTH: hormona paratiroidea; prot: proteína.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, las arterias epigástricas de pacientes diabéticos en diálisis mostraron una mayor inflamación (menos expresión de TIMP3 y más expresión de VCAM y TNF α) junto con una pérdida de fenotipo muscular contráctil (α -actina) y mayor expresión de marcadores de fenotipo óseo (RUNX2) comparados con los no diabéticos (Tabla 1). Además, la PTH elevada se asoció con mayor expresión de ADAM17, aunque menor contenido en calcio en la arteria epigástrica. En los pacientes diabéticos la PTH elevada también se asoció con mayor expresión de ADAM17, mientras que en los no diabéticos la PTH baja se asoció con más calcificación de la arteria epigástrica (Tablas 4 y 5 respectivamente). La combinación de ambas circunstancias, PTH elevada y diabetes, se asoció con mayor expresión de RUNX2 y mayor calcificación de la arteria abdominal (Tabla 6).

A pesar de los avances en las técnicas de diálisis, la tasa de mortalidad de los pacientes en tratamiento crónico con hemodiálisis sigue siendo elevada²⁶. La diabetes es uno de los factores que más impacto tiene en el aumento del riesgo de mortalidad en la ERC, especialmente en los pacientes en diálisis, cuyo riesgo duplica al de los pacientes no diabéticos^{11, 27}. Varios factores pueden contribuir a este aumento de la mortalidad, como el nivel de glucemia. Si bien una reducción en el nivel de glucosa disminuye el riesgo de complicaciones microvasculares, el control glucémico por sí solo no es suficiente para reducir el riesgo de complicaciones macrovasculares²⁸. Por otro lado, los niveles de PTH elevados se asocian con mayor incidencia de eventos cardiovasculares y rápida progresión de la ERC²⁹. Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay trabajos que evalúen a nivel molecular el efecto conjunto de niveles elevados de PTH y la diabetes en el sistema vascular de pacientes en diálisis.

En las arterias epigástricas de los pacientes diabéticos se observó una menor expresión de TIMP3 junto con el aumento en la expresión de factores proinflamatorios como TNF α y VCAM respecto a los no diabéticos (Tabla 3). La inhibición de la expresión de TIMP3 se ha relacionado con el inicio y progresión de la enfermedad renal diabética³⁰, aumento de la actividad de ADAM17 y de los niveles circulantes de TNF α y VCAM³¹. TIMP3 inhibe a ADAM17 al unirse a su dominio catalítico, bloqueando su función¹⁷. En el presente estudio no se analizó la actividad de ADAM17, pero la inhibición de TIMP3 y el aumento en la expresión de TNF α y VCAM podría traducirse en un aumento de los niveles circulantes de estas moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria. El descenso en la expresión de TIMP3 podría deberse al aumento en la expresión de RUNX2 ya que varios trabajos describen a RUNX2 como un inhibidor de la expresión de TIMP3^{32, 33}. Por otra parte, el aumento de RUNX2 y el descenso de α -actina indicarían un cambio de fenotipo de las células de músculo liso vascular a tipo osteoblasto asociado a la CV³⁴, aunque no se observaron cambios en el contenido en calcio de las arterias ni en el índice de Kauppila. Estos resultados podrían estar indicando una mayor inflamación y una progresión más rápida hacia la CV en los pacientes diabéticos comparado con los no diabéticos.

Los pacientes diabéticos con niveles de PTH por encima de la mediana mostraron una mayor expresión génica y proteica de RUNX2 y un índice de Kauppila más alto, lo que indicaría una mayor CV respecto a los pacientes no diabéticos con PTH elevada (Tabla 6). En la ERC, los niveles de PTH altos se han asociado con aumentos en los niveles séricos de fósforo y calcio que conllevan una mayor progresión de la ERC y aumentos de la CV y valvular^{29, 34-36}. Además, en pacientes diabéticos tipo 2 sin ERC severa, los niveles séricos de PTH elevados también se asocian con un aumento de la CV periférica³⁷. En el presente estudio, de manera opuesta, cuando se

analizaron los pacientes no diabéticos, los niveles bajos de PTH se asociaron con un mayor contenido en calcio en la arteria epigástrica, al igual que se describe en otros trabajos³⁸. Estos resultados, donde valores bajos y altos de PTH se asocian con calcificación han sido descritos previamente en cultivo *in vitro*³⁴ y ambos se han relacionado con aumento de la mortalidad cardiovascular³⁹. Estos hallazgos parecen indicar que la PTH podría ser un mediador de procesos diferentes en pacientes diabéticos y no diabéticos.

Varios estudios han demostrado que la glucosa activa la expresión y actividad de ADAM17^{19,40} que a su vez se ha correlacionado con resistencia a la insulina⁴¹. En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ADAM17 entre diabéticos y no diabéticos. Sin embargo, la expresión de ADAM17 parece relacionarse con la PTH, ya que niveles séricos de PTH por encima de la mediana se asociaron con una mayor expresión de ADAM17. Estos datos confirman resultados previos de nuestro grupo en los que se observó una menor expresión de ADAM17 en el corazón de animales con insuficiencia renal crónica y paratiroidectomizados comparados con los no paratiroidectomizados⁴².

La mayor expresión de ADAM17 también se observó, e incluso con cambios más marcados, en pacientes diabéticos con PTH elevada respecto a diabéticos con PTH baja. Estas diferencias en la expresión de ADAM17 no se constataron en los pacientes no diabéticos. Por tanto, la expresión de ADAM17 en las arterias epigástricas parece estar relacionada con los niveles de PTH únicamente en los pacientes diabéticos. Aunque en este estudio no se analizó la actividad de ADAM17, otros trabajos mostraron una correlación entre el aumento en la expresión de esta proteína y el incremento de su actividad¹⁹. Por tanto, la mayor expresión de ADAM17 observada en los pacientes diabéticos con PTH elevada podría asociarse con un mayor estado inflamatorio, debido a la liberación de factores proinflamatorios como TNF α , VCAM e ICAM respecto a los pacientes diabéticos con PTH baja.

Estudios previos han mostrado la existencia de una asociación entre los niveles séricos de magnesio y PTH⁴³. Además, la hipomagnesemia se ha relacionado con inflamación, mortalidad cardiovascular y calcificación vascular principalmente en pacientes con diabetes en los que la hipomagnesemia es mucho más frecuente⁴⁴. Estudios clínicos han mostrado que la suplementación con magnesio ejerce un efecto regulador de la respuesta inmunológica⁴⁵. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de magnesio entre los distintos grupos de pacientes analizados que puedan explicar las diferencias encontradas en parámetros inflamatorios.

Aunque este estudio profundiza en diversos aspectos de la interrelación entre diabetes, PTH e inflamación, es necesario reconocer diversas limitaciones, como los niveles de PTH no

excesivamente elevados. Mientras en el estudio COSMOS el incremento de la mortalidad en los pacientes diabéticos se observó principalmente con valores de PTH sérica > 400 pg/mL, en el presente estudio solo 11 (17,7%) presentaron niveles por encima de ese valor. La mayor disponibilidad actual de tratamientos como los calcimiméticos, a diferencia de la época en la que se realizó el estudio COMOS, ha podido contribuir a que los niveles de PTH no estén tan elevados en el presente estudio. Por otra parte, en el estudio COSMOS solo se incluyeron pacientes en hemodiálisis, mientras que en este estudio se incluyeron además pacientes en diálisis peritoneal y con Enfermedad renal Crónica Avanzada. Otra limitación del estudio incluye no disponer de los valores séricos de FGF23, regulador de la expresión de PTH, que aumenta en condiciones de inflamación⁴⁶ y se correlaciona positivamente con la de la calcificación vascular⁴⁷.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo no mostraron una relación entre los niveles elevados de PTH y la expresión de ADAM17, su inhibidor, TIMP3, y los factores proinflamatorios ICAM, VCAM y TNF α en los pacientes diabéticos respecto a los no diabéticos. Sin embargo, los niveles séricos elevados de PTH aumentaron la expresión de ADAM17 en los pacientes diabéticos. Por tanto, no debería descartarse completamente la relación entre la inflamación y los niveles séricos de PTH elevados en los pacientes diabéticos y serían necesarios más estudios para clarificar estos resultados.

Además, los pacientes diabéticos con concentraciones elevadas de PTH mostraron un incremento en la expresión de RUNX2 y del índice de Kauppila, lo que podría indicar una progresión más rápida de la calcificación vascular, que se asocia negativamente con la supervivencia²⁻⁴, y explicaría en parte el aumento de la mortalidad entre los pacientes diabéticos con PTH altas respecto a los no diabéticos encontrada en el estudio COSMOS.

Ética de la publicación

1. ¿Su trabajo ha comportado experimentación en animales?:

No

2. ¿En su trabajo intervienen pacientes o sujetos humanos?:

Sí

Si la respuesta es afirmativa, por favor, mencione el comité ético que aprobó la investigación y el número de registro.:

Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (códigos 42/2011, 53/2014, 110/2017 y 2022.240)

Si la respuesta es afirmativa, por favor, confirme que los autores han cumplido las normas éticas relevantes para la publicación. :

Sí

Si la respuesta es afirmativa, por favor, confirme que los autores cuentan con el consentimiento informado de los pacientes. :

Sí

3. ¿Su trabajo incluye un ensayo clínico?:

No

4. ¿Todos los datos mostrados en las figuras y tablas incluidas en el manuscrito se recogen en el apartado de resultados y las conclusiones?:

Sí

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Agradecimientos: Queremos manifestar nuestro agradecimiento a todos los pacientes que han participado en el estudio, a Francisco Otero García y Pilar Alonso Suarez de la Unidad de Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario Central de Asturias por su ayuda en la recogida y al BioBanco del Principado de Asturias por su ayuda en el procesamiento y custodia de las arterias epigástricas. También queremos agradecer a ALCER (Asociación para la lucha contra las enfermedades renales de Asturias) y ASDIPAS (Asociación de Diabéticos del Principado de Asturias) por su apoyo a la investigación básica.

Financiación: Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda a la Investigación en Nefrología del año 2021 de la Fundación Senefro y la Sociedad Española de Nefrología sobre «Asociación entre los niveles de PTH e inflamación en el riesgo de mortalidad en pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica. Estudio clínico experimental». Este estudio también ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, PI14/00707, PI17/00384, PI20/00633, PI22/00195, PI23/00833 y PI24/01785) y programa RICORS (RD21/0005/0019 y RD24/0004/006) financiado por la Unión Europea-Next Generation, Mecanismo para la Recuperación y la Resiliencia (MRR). Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2018–2022 del Principado de Asturias (IDI-2018-000152, IDI/2021/000080) y Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT). B.M.-C. y S. F.-V. han sido financiada por una beca del Gobierno del Principado de Asturias (Programa Severo Ochoa BP19-057 y BP20-081), N.G.-G. por el ISCIII (Programa PFIS, FI23/00007), S.P. y N.C.-L. por el ISCIII (Programa Miguel Servet CP23/00105 y CP23/00058, respectivamente) y co-financiado por la Unión Europea, C. A.-M. por la Fundación Biosanitaria del Principado de Asturias (ISPA).

REFERENCIAS

1. Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, Yang W, Rosas SE, Rahman M, *et al.* Coronary Artery Calcification and Risk of Cardiovascular Disease and Death Among Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA Cardiol* 2017; 2(6): 635-643. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.0363>
2. Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab* 2006; 24(2): 176-181. <https://doi.org/10.1007/s00774-005-0668-6>
3. Cannata-Andia JB, Roman-Garcia P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2011; 26(11): 3429-3436. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr591>
4. Dube P, DeRiso A, Patel M, Battepati D, Khatib-Shahidi B, Sharma H, *et al.* Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Diversity in the Vessel Wall. *Biomedicines* 2021; 9(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040404>
5. Ren SC, Mao N, Yi S, Ma X, Zou JQ, Tang X, *et al.* Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: An Update and Perspective. *Aging and disease* 2022; 13(3): 673-697. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.1024>
6. Cano-Megias M, Bouarich H, Guisado-Vasco P, Perez Fernandez M, de Arriba-de la Fuente G, Alvarez-Sanz C, *et al.* Coronary artery calcification in patients with diabetes mellitus and advanced chronic kidney disease. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)* 2019; 66(5): 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2018.09.003>
7. Taniwaki H, Ishimura E, Tabata T, Tsujimoto Y, Shioi A, Shoji T, *et al.* Aortic calcification in haemodialysis patients with diabetes mellitus. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2005; 20(11): 2472-2478. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi039>
8. Li Q, Li P, Xu Z, Lu Z, Yang C, Ning J. Association of diabetes with cardiovascular calcification and all-cause mortality in end-stage renal disease in the early stages of hemodialysis: a retrospective cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 2024; 23(1): 259. <https://doi.org/10.1186/s12933-024-02318-8>
9. Sutandar W. Vascular calcification of the aortic arch and peripheral artery in haemodialysis patients with and without diabetes mellitus. *Acta medica Indonesiana* 2008; 40(4): 181-186.
10. Ishimura E, Okuno S, Kitatani K, Kim M, Shoji T, Nakatani T, *et al.* Different risk factors for peripheral vascular calcification between diabetic and non-diabetic haemodialysis patients--importance of glycaemic control. *Diabetologia* 2002; 45(10): 1446-1448. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0920-8>
11. Martin-Carro B, Navarro-Gonzalez JF, Ortiz A, Zoccali C, Floege J, Ferreira MA, *et al.* Mineral and bone metabolism markers and mortality in diabetic patients on haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2023; 38(11): 2589-2597. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfad122>
12. Cheng SP, Liu CL, Liu TP, Hsu YC, Lee JJ. Association between parathyroid hormone levels and inflammatory markers among US adults. *Mediators of inflammation* 2014; 2014(709024). <https://doi.org/10.1155/2014/709024>
13. Lam HB, Yang PS, Chien MN, Lee JJ, Chao LF, Cheng SP. Association between neutrophil-to-lymphocyte ratio and parathyroid hormone in patients with primary hyperparathyroidism. *Archives of medical science : AMS* 2019; 15(4): 880-886. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.74758>
14. Alakus H, Göksu M. Does Parathyroidectomy Affect the Neutrophil/Lymphocyte Ratio, a Systemic Inflammatory Marker? *Cureus* 2021; 13(3): e13708. <https://doi.org/10.7759/cureus.13708>

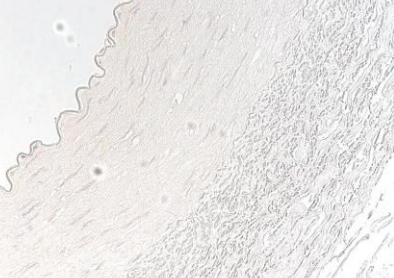
15. Yang PS, Liu CL, Liu TP, Chen HH, Wu CJ, Cheng SP. Parathyroidectomy decreases neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios. *The Journal of surgical research* 2018; 224(169-175). <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.016>
16. Qin Z, Yang Q, Liao R, Su B. The Association Between Dietary Inflammatory Index and Parathyroid Hormone in Adults With/Without Chronic Kidney Disease. *Frontiers in nutrition* 2021; 8(688369). <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.688369>
17. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2010; 45(2): 146-169. <https://doi.org/10.3109/10409231003628015>
18. Melenhorst WB, Visser L, Timmer A, van den Heuvel MC, Stegeman CA, van Goor H. ADAM17 upregulation in human renal disease: a role in modulating TGF- α availability? *American journal of physiology Renal physiology* 2009; 297(3): F781-790. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90610.2008>
19. Li R, Uttarwar L, Gao B, Charbonneau M, Shi Y, Chan JS, *et al.* High Glucose Up-regulates ADAM17 through HIF-1 α in Mesangial Cells. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290(35): 21603-21614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.651604>
20. Menghini R, Menini S, Amoruso R, Fiorentino L, Casagrande V, Marzano V, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. *Gastroenterology* 2009; 136(2): 663-672 e664. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.079>
21. Aljohmani A, Yildiz D. A Disintegrin and Metalloproteinase-Control Elements in Infectious Diseases. *Front Cardiovasc Med* 2020; 7(608281). <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.608281>
22. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(6): 1135-1142. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.6.1135>
23. Bover J, Gorriz JL, Urena-Torres P, Lloret MJ, Ruiz-Garcia C, daSilva I, *et al.* Detection of cardiovascular calcifications: Is it a useful tool for nephrologists? *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* 2016; 36(6): 587-596. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2016.05.021>
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
25. Carrillo-Lopez N, Panizo S, Martin-Carro B, Mayo Barrallo JC, Roman-Garcia P, Garcia-Castro R, *et al.* Redox Metabolism and Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Biomolecules* 2023; 13(9). <https://doi.org/10.3390/biom13091419>
26. Johansen KL, Gilbertson DT, Li S, Li S, Liu J, Roetker NS, *et al.* US Renal Data System 2023 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2024; 83(4 Suppl 1): A8-a13. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2024.01.001>
27. Ma L, Zhao S. Risk factors for mortality in patients undergoing hemodialysis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2017; 238(151-158). <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.02.095>
28. Group AC, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, *et al.* Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 2008; 358(24): 2560-2572. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802987>
29. Bozic M, Diaz-Tocados JM, Bermudez-Lopez M, Forne C, Martinez C, Fernandez E, *et al.* Independent effects of secondary hyperparathyroidism and hyperphosphataemia on chronic kidney disease progression and cardiovascular events: an analysis from the NEFRONA cohort. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the*

- European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2022; 37(4): 663-672. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab184>
30. Casagrande V, Federici M, Menghini R. TIMP3 involvement and potentiality in the diagnosis, prognosis and treatment of diabetic nephropathy. *Acta Diabetol* 2021; 58(12): 1587-1594. <https://doi.org/10.1007/s00592-021-01766-y>
 31. Federici M, Hribal ML, Menghini R, Kanno H, Marchetti V, Porzio O, *et al.* Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha. *J Clin Invest* 2005; 115(12): 3494-3505. <https://doi.org/10.1172/JCI26052>
 32. Sancisi V, Boretini G, Maramotti S, Ragazzi M, Tamagnini I, Nicoli D, *et al.* Runx2 isoform I controls a panel of proinvasive genes driving aggressiveness of papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(10): E2006-2015. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1903>
 33. Tomimatsu M, Matsumoto K, Ashizuka M, Kumagai S, Tanaka S, Nakae T, *et al.* Myeloid cell-specific ablation of Runx2 gene exacerbates post-infarct cardiac remodeling. *Scientific reports* 2022; 12(1): 16656. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21202-7>
 34. Carrillo-López N, Panizo S, Alonso-Montes C, Martínez-Arias L, Avello N, Sosa P, *et al.* High-serum phosphate and parathyroid hormone distinctly regulate bone loss and vascular calcification in experimental chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2019; 34(6): 934-941. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy287>
 35. Fernández-Villabrille S, Martín-Vírgala J, Martín-Carro B, Baena-Huerta F, González-García N, Gil-Peña H, *et al.* RANKL, but Not R-Spondins, Is Involved in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification through LGR4 Interaction. *International journal of molecular sciences* 2024; 25(11). <https://doi.org/10.3390/ijms25115735>
 36. D'Arrigo G, Mallamaci F, Pizzini P, Leonardis D, Tripepi G, Zoccali C. CKD-MBD biomarkers and CKD progression: an analysis by the joint model. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2023; 38(4): 932-938. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfac212>
 37. Mary A, Hartemann A, Brazier M, Aubert CE, Kemel S, Salem JE, *et al.* Higher parathyroid hormone levels are associated with increased below-the-knee arterial calcification in type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism* 2018; 44(3): 305-308. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2017.04.008>
 38. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul MC. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004; 15(7): 1943-1951. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000129337.50739.48>
 39. Naves-Díaz M, Passlick-Deetjen J, Guinsburg A, Marelli C, Fernández-Martín JL, Rodríguez-Puyol D, *et al.* Calcium, phosphorus, PTH and death rates in a large sample of dialysis patients from Latin America. The CORES Study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2011; 26(6): 1938-1947. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq304>
 40. Ghiarone T, Castorena-Gonzalez JA, Foote CA, Ramirez-Perez FI, Ferreira-Santos L, Cabral-Amador FJ, *et al.* ADAM17 cleaves the insulin receptor ectodomain on endothelial cells and causes vascular insulin resistance. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2022; 323(4): H688-h701. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00039.2022>

41. Menghini R, Fiorentino L, Casagrande V, Lauro R, Federici M. The role of ADAM17 in metabolic inflammation. *Atherosclerosis* 2013; 228(1): 12-17.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.024>
42. Martinez-Arias L, Panizo-Garcia S, Martin-Virgala J, Martin-Carro B, Fernandez-Villabrille S, Avello-Llano N, *et al.* Contribution of phosphorus and PTH to the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in an experimental model of chronic renal failure. *Nefrologia (Engl Ed)* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2021.02.001>
43. Tapia H., Mora C., J. N. Magnesio en la Enfermedad Renal Crónica. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* 2007; 27(6): 674-680.
44. Oost LJ, Tack CJ, de Baaij JHF. Hypomagnesemia and Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetes. *Endocrine reviews* 2023; 44(3): 357-378.
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnac028>
45. Rashvand S, Mobasser M, Tarighat-Esfanjan A. The Effects of Choline and Magnesium Co-Supplementation on Metabolic Parameters, Inflammation, and Endothelial Dysfunction in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Am Coll Nutr* 2019; 38(8): 714-721.
<https://doi.org/10.1080/07315724.2019.1599745>
46. Egli-Spichtig D, Imenez Silva PH, Glaudemans B, Gehring N, Bettoni C, Zhang MYH, *et al.* Tumor necrosis factor stimulates fibroblast growth factor 23 levels in chronic kidney disease and non-renal inflammation. *Kidney international* 2019; 96(4): 890-905.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.04.009>
47. Wungu CDK, Susilo H, Alsagaff MY, Witarto BS, Witarto AP, Pakpahan C, *et al.* Role of klotho and fibroblast growth factor 23 in arterial calcification, thickness, and stiffness: a meta-analysis of observational studies. *Scientific reports* 2024; 14(1): 5712.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-56377-8>

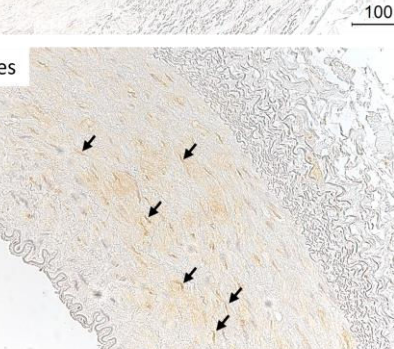
A

No diabetes



100 μm

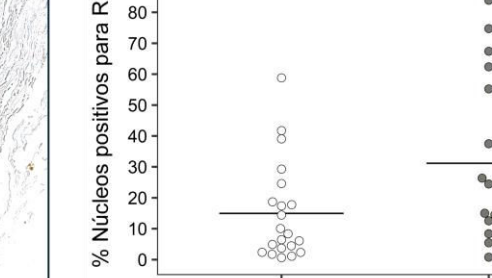
Diabetes



100 μm

B

Todos los pacientes



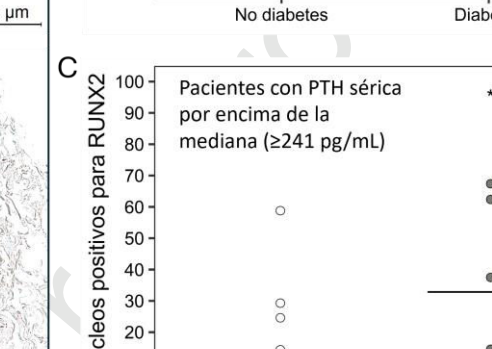
Group	% Nucleos positivos para RUNX2 (Individual Data Points)	Mean (%)
No diabetes	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 38, 40, 42, 58	~15
Diabetes	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 25, 26, 27, 28, 35, 37, 38, 55, 60, 62, 65, 68, 75, 80, 85, 95	~30

% Nucleos positivos para RUNX2

No diabetes Diabetes

C

Pacientes con PTH sérica por encima de la mediana (≥ 241 pg/mL)



Group	% Nucleos positivos para RUNX2 (Individual Data Points)	Mean (%)
No diabetes	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100	~15
Diabetes	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100	~30

% Nucleos positivos para RUNX2

No diabetes Diabetes

RESPUESTAS PARA LOS REVISORES:

Revisor nº1: La hipótesis del presente estudio fue que los pacientes diabéticos tendrían una mayor expresión de factores proinflamatorios, que podrían verse aumentados con niveles elevados de PTH, contribuyendo a un mayor riesgo y a un incremento de la CV. Obviamente Identificar variables que deban controlarse para prevenir-reducir mortalidad en diálisis es importante.

Los autores tienen que hacer un esfuerzo adicional y contestar a las siguientes preguntas:

1- SE midió el FGF23? en muestras que podrían haberse congelado.

No se recogieron muestras de sangre u orina en el momento del trasplante y los datos de los pacientes se recogieron de la historia clínica. En nuestro hospital el FGF23 no se incluye en los parámetros analizados de forma rutinaria, por lo que no disponemos de ese dato.

La falta de FGF23 se ha incluido como una limitación del estudio (página 15, tres últimas líneas del último párrafo de la discusión de la nueva versión del trabajo con control de cambios).

2- Existía correlación entre contenido de calcio Ca en Arteria Epigástrica y en la Aorta – índice de Kaupila ¿

Tal y como sugiere el revisor, se ha analizado la correlación existente entre el contenido de calcio en la arteria epigástrica y el índice de Kaupila en la aorta abdominal. Para ser congruente con la estadística realizada en el resto del trabajo, las correlaciones se analizaron de forma no paramétrica usando el test de correlación de Spearman. Usando dicho test, el contenido de calcio en la arteria epigástrica se correlacionó de manera significativa con el índice de Kaupila.

El uso del test de Spearman para estudiar las correlaciones bivariadas se ha incluido en el apartado de “Análisis estadístico” de la sección de “Material y métodos” en la versión revisada del artículo (página6, líneas 4-6 del segundo párrafo en el manuscrito revisado con control de cambios).

La correlación encontrada entre el contenido de calcio de la arteria epigástrica y el índice de Kaupila se ha incluido en los resultados del trabajo (página 7, Líneas 1-3 del manuscrito revisado con control de cambios).

3-a) Correlación de PTH con Runx en diabéticos y en no diabéticos (nube de puntos) y valor de r , y ojo puede no ser lineal.

Tal y como se ha indicado en el punto anterior, las correlaciones por las que pregunta el revisor se han analizado mediante el test no paramétrico de Spearman.

No se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de PTH y la expresión génica o proteica (número de núcleos teñidos) de RUNX2 en arterias epigástricas de pacientes diabéticos y no diabéticos.

Esta falta de correlaciones entre los niveles de PTH y calcificación (contenido de calcio, índice de Kaupila y RUNX2) se cita en los resultados de la versión revisada del trabajo con control de cambios (página 10, tercer párrafo y página 11, tercer párrafo). Además, la nueva versión del

trabajo incluye figuras suplementarias con todas las “nubes de puntos” solicitadas por el revisor (figuras suplementarias 4 y 5).

b) Correlación de PTH con Proteínas inflamatorias (RNA.....) en diabéticos y en no diabéticos. Por ejemplo sería importante determinar si existe correlación entre PTH y Adam 17 en diabéticos y en no diabéticos?

Al igual que en los dos puntos anteriores, las correlaciones sugeridas por el revisor se han analizado mediante el test no paramétrico de Spearman.

No se encontraron correlaciones significativas entre los valores séricos de PTH y los marcadores de inflamación analizados ADAM17, TIMP3, VCAM, ICAM y TNFa en pacientes diabéticos y no diabéticos.

Esta falta de correlación se ha mencionado en los resultados de la versión revisada del trabajo con control de cambios (página 10, tercer párrafo y página 11, tercer párrafo) y las nubes de puntos han sido incluidas como figuras suplementarias (figuras suplementarias 2 y 3).

c) Existe correlación entre PTH y contenido calcio o con expresión RUNX en arterias de diabéticos y de no diabéticos

No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre PTH y la expresión de RUNX2, contenido de calcio en las arterias o índice de Kauppila en pacientes diabéticos ni en no diabéticos.

Estos resultados han sido mencionados en la sección de resultados de la versión revisada del trabajo con control de cambios (página 10, tercer párrafo y página 11, tercer párrafo). Además, la nueva versión del trabajo incluye figuras suplementarias con todas las “nubes de puntos” solicitadas por el revisor (figuras suplementarias 4 y 5).

4- los niveles de Mg se han relacionado con inflamación, mortalidad cardiovascular y calcificación vascular. Se debe incluir la concentración de Mg.

Tal y como indica el revisor, existen trabajos que muestran una asociación entre los niveles bajos de magnesio y una mayor inflamación y mayor riesgo cardiovascular principalmente en pacientes con diabetes en los que la hipomagnesemia es mucho más frecuente (Oost L y cols. *Endocrine Reviews*, Volume 44, Issue 3, June 2023, Pages 357–378, <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac028>). Además, estudios clínicos muestran que la suplementación con magnesio tiene un efecto regulador de la respuesta inmunológica (Drenthen LCAJ y cols. *Clin Endocrinol Metab.* 2024 Nov 18;109(12):e2240-e2245. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38412117/>).

Tal y como solicita el revisor, se han revisado de nuevo las historias clínicas de los pacientes para rescatar los valores de magnesio sérico. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de magnesio en ninguna de las comparaciones realizadas (Tablas 1, 3, 4, 5 y 6).

Los valores de magnesio en suero se han incluido en las tablas 1, 3, 4, 5 y 6. La posible implicación del magnesio en la inflamación ha sido discutida en la versión revisada del trabajo con control de cambios (página 15, tercer párrafo).

Journal Pre-proof