



**CENTRO INTERNACIONAL  
de POSTGRADO  
DOCTORADO en  
CIENCIAS de la  
SALUD**

**Biomarcadores  
sistémicos como  
predictores precoces  
de la calcificación  
vascular subclínica**

Tesis Doctoral  
*Catalina Beatriz Ulloa Clavijo*  
Oviedo, octubre 2022





**CENTRO INTERNACIONAL  
de POSTGRADO  
DOCTORADO en  
CIENCIAS de la  
SALUD**

**Biomarcadores  
sistémicos como  
predictores precoces  
de la calcificación  
vascular subclínica**

Tesis Doctoral

Directoras

*Dra. Adriana Dusso*

*Dra. Minerva Rodríguez*

Oviedo, octubre 2022





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Biomarcadores sistémicos como predictores precoces de la calcificación vascular subclínica.	Inglés: Optimal systemic biomarkers for the early prediction of subclínica vascular calcification.
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: Catalina Beatriz Ulloa Clavijo	
Programa de Doctorado: Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud (9CIENSAL).	
Organo responsable: Universidad de Oviedo	

### RESUMEN

La prevención de la enfermedad cardiovascular (ECV) es un desafío en nefrología por ser la principal causa de morbilidad en la enfermedad renal crónica (ERC). El fósforo es uno de los mayores inductores de inflamación sistémica y calcificación vascular (CV), y las medidas para el control de la hiperfosfatemia, resultan insuficientes para prevenir CV.

El objetivo principal del estudio fue evaluar la eficacia de una estrategia antiinflamatoria nutricional en atenuar la CV de la ERC hiperfosfatémica experimental sin alterar el metabolismo óseo-mineral, delinear los mecanismos moleculares involucrados y estimar la dosis efectiva y los biomarcadores más sensibles de su eficacia antiinflamatoria y anticalcificante, tanto clínicos como inmunológicos.

Para estudiar un nuevo mecanismo de inflamación y CV, se utilizó un modelo animal experimental de ERC hiperfosfatémica (26 ratas) y en humanos sin ERC (10 participantes), que ingirieron betagluanos ( $\beta$ glucanos) de cebada diarios durante un mes, 40 mg y 3 g respectivamente. Se midieron TNF $\alpha$ , ADAM17, esfingomielinasa neutra 2 (nSMase2) y la producción de radicales oxidantes, antes y después del consumo.

Para buscar nuevos marcadores no invasivos de daño vascular, participaron 33 pacientes con ERC en diálisis peritoneal (DP) sin ECV clínica, diabetes mellitus ni enfermedad autoinmune, y 15 controles sanos. Se evaluaron marcadores clínicos de daño vascular (índice de Kauppila, velocidad de onda de pulso, densidad del vasa vasorum adventicial carotídeo y femoral mediante ecografía ultrasensible sin contraste -SMI-, ángulo de fase -AF- provisto por la bioimpedancia eléctrica) y óseo (osteopenia/fracturas analizadas en series óseas) e inmunológicos (granulocitos de baja densidad -LDG-, linfocitos senescentes CD4<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> y células T angiogénicas -Tang-) no caracterizados previamente en la ERC. Se utilizó una cohorte de replicación de 16 pacientes en hemodiálisis y 6 controles.

En ratas, se vio que la CV de la aorta podría ser secundaria a aumentos vasculares de la citoquina inflamatoria TNF $\alpha$  que induce a ADAM17 y nSMase2. A su vez, ADAM17 libera TNF $\alpha$  y nSMase2 e induce la secreción de exosomas procalcificantes por parte de las células de músculo liso vascular, es decir, se genera un círculo vicioso proinflamatorio y procalcificante. En voluntarios sanos, se redujo la producción de radicales oxidantes en leucocitos circulantes y los niveles leucocitarios de ADAM17, TNF $\alpha$  y nSMase2.

En pacientes con ERC, se observó una expansión de LDG, altamente proinflamatorios, descrita previamente en el contexto de patología autoinmune. Se identificó que el incremento de un fenotipo inmaduro de LDG, permitiría estimar el riesgo de CV y de



deterioro óseo en pacientes con ERC. Una reducción de Tang, indicadores de alteraciones de la homeostasis vascular en afecciones inflamatorias, ocurre también en la ERC. Ese descenso de Tang se correlaciona con aumentos en la densidad del vasa vasorum adventicial, un proceso patológico que precede al engrosamiento íntima-media en el contexto de aterosclerosis subclínica. Este estudio orienta hacia la utilidad diagnóstica de riesgo cardiovascular (RCV) de SMI para evaluar neovascularización adventicial como riesgo subclínico de aterosclerosis en pacientes en diálisis. El AF, parece mostrar la CV independientemente de la edad del paciente y se asoció al grado de inflamación e inmunosenescencia.

En conclusión, este trabajo muestra que marcadores de enfermedades inmunomediadas se encuentran alterados en los enfermos renales dejando entrever la importante afectación del sistema innato y adquirido en estos pacientes, que contribuye a agravar el daño vascular y óseo y podrían ser sensibles para su evaluación. La ingesta de  $\beta$ glucanos podría constituir una terapia nutricional efectiva de prevención de CV en la enfermedad renal hiperfosfatemia experimental y podría reducir el grado de inflamación sistémica y el RCV en individuos normales.

#### ABSTRACT

The prevention of cardiovascular disease (CVD) is a challenge in nephrology due to it is the main cause of morbidity and mortality in chronic kidney disease (CKD). Phosphorus is one of the main inducers of systemic inflammation and vascular calcification (VC), and most of the times the measures to control hyperphosphatemia are insufficient to prevent CV.

The main purpose of the study was to estimate the efficiency of a nutritional anti-inflammatory strategy in attenuating VC in experimental hyperphosphatemic CKD without altering bone-mineral metabolism, establishing the involved molecular mechanisms, and estimate the appropriate dose and the most sensitive biomarkers of its anti-inflammatory efficacy and ant calcifying, both clinical and immunological.

To study a new inflammation mechanism and VC, an experimental animal model of hyperphosphatemic CKD (26 rats) and humans without CKD (10 participants) were used, who ingested barley beta-glucans ( $\beta$ -glucans) daily for one month, 40 mg and 3g respectively. TNF $\alpha$ , ADAM17, neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) and the production of oxidant radicals were measured before and after consumption.

To search for new non-invasive markers of vascular damage, 33 CKD patients on peritoneal dialysis (PD) without clinical CVD, diabetes mellitus, or autoimmune disease, and 15 healthy controls participated. Clinical markers of vascular damage (Kauppila index, pulse wave velocity, carotid and femoral adventitial vasa vasorum density by ultrasensitive ultrasound without contrast -SMI-, phase angle -PhA- provided by electrical bioimpedance) and bone damage (osteopenia/fractures analyzed in bone series) and immunological (low-density granulocytes -LDG-, senescent CD4+CD28null lymphocytes and angiogenic T cells -Tang-) not previously characterized in CKD. A replication cohort of 16 hemodialysis patients and 6 controls were used.

In rats, was noted that the CV of the aorta could be secondary to vascular increases in the inflammatory cytokine TNF $\alpha$  that induces ADAM17 and nSMase2. In turn, ADAM17 releases TNF $\alpha$  & nSMase2 and induces the secretion of procalcifying exosomes by vascular smooth muscle cells, that is, a proinflammatory and procalcifying vicious circle is generated. In healthy volunteers, the production of oxidant radicals in circulating leukocytes and leukocyte levels of ADAM17, TNF $\alpha$  and nSMase2 were reduced.

In patients with CKD, an expansion of LDG, highly proinflammatory, previously described in the context of autoimmune pathology, was observed. It was identified that the increase in an immature phenotype of LDG would allow estimating the risk of VC and bone deterioration in patients with CKD. The indicators of alterations in Tang reduction in vascular homeostasis in inflammatory conditions also occurs in CKD. This Tang decrease is correlated with the increase in the density of the adventitial vasa vasorum, a pathological process that precedes intima-media thickening in the context



of subclinical atherosclerosis. This study points to the diagnostic utility of cardiovascular risk (CVR) of SMI to assess adventitial neovascularization as a subclinical risk of atherosclerosis in dialysis patients. FA seems to show VC regardless of the patient's age and was associated with the degree of inflammation and immunosenescence.

In closing, this research shows which of the markers of immune-mediated diseases are altered in kidney patients, revealing the significant involvement of the innate and acquired system in these patients, which contributes to aggravating vascular and bone damage and could be sensitive for evaluation. The intake of  $\beta$ -glucans could turn into an effective nutritional therapy for CV prevention in experimental hyperphosphatemia kidney disease and could reduce the systemic inflammation degree and CVR in normal individuals.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO**  
EN \_\_\_\_\_





## Dedicatoria

*A Dios, mis papás, Samuel y Dalia, a mi Bero.*



# AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi creador y el creador de todo lo que sucede en mi vida, sin él, nada soy.

A mis papás, el tesoro invaluable que la Divinidad me concedió. De ellos nace la fuerza y la capacidad de soñar alto y conseguir metas. Si ellos no hubiesen creído, ninguno de los retos hubiese sido alcanzado.

A mi Bero, la luz de mis días y mi alimento en mis desiertos. Su amor paciente e inagotable ha trascendido y ahora ve finalizar este proyecto desde el sitio donde nos reencontraremos por la misericordia del Señor. Sin ella, el maravilloso regalo de la Fe, indispensable en este proyecto, probablemente no hubiera llegado.

A mi hermano Iván y su familia, a mi tío Oswaldo y a mis amigas Jacky, Samy, Lucía, Vilma y Ximena, por confiar en mí y apoyarme. A José Miguel, un ángel que Dios puso en mi camino para ayudarme a culminar este proyecto.

A la Dra. Adriana Dusso, la gran mentora de este trabajo. Confió en mí y me abrió las puertas permitiéndome adentrarme en el mundo apasionante de “investigar para a los pacientes mejor cuidar”, “aportando lo mejor”. Fue mi pilar en una etapa de mi vida donde necesité recobrar la esperanza. Hizo que desarrolle habilidades que nunca siquiera imaginé. Caminé conmigo enseñándome de ciencia, de humildad, bondad, entrega desinteresada y generosidad. Con ella aprendí lo que escribe Ignacio Larrañaga: “Formar es un acto de amor”.

A la Dra. Minerva Rodríguez, quien canalizó este sueño dirigiendo este estudio y me permitió conocer al gran equipo de Metabolismo Óseo-Mineral integrado por los doctores Natalia Carrillo, Manuel Naves, José Luis Fernández, Sara Panizo y Cristina Alonso, las doctorandas Beatriz Martín y Julia Martín, y, dirigido por el Dr. Jorge Cannata, y a través de ellos, al Dr. Javier Rodríguez Carrio, cuyo ímpetu investigador se desborda en cada trabajo; en todos ellos me he apoyado y de ellos he recibido oportunidades valiosas como lo es formar parte de tan prestigioso grupo y aprender de su trabajo.

A las doctoras Carmen Rodríguez y Belinda Fernández por su predisposición siempre servicial y permitir que este sueño, se haga realidad.

Al servicio de Nefrología del Hospital Universitario Central de Asturias, dirigido por la Dra. Carmen Díaz Corte, por formarme como especialista y abrir el camino para continuar mi crecimiento profesional. A mis compañeros del Hospital Universitario de Cabueñes y de la Fundación Hospital de Jove, por su motivación y ánimo brindado durante la realización del proyecto.

A los pacientes que, sin lugar a duda, son la razón por la que se realizó este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/01452, PI17/02181 y PI 19/00532), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080), Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Retic REDinREN de ISCIII (RD16/0009/0017) y RICORS2040 (Kidney Disease).

*"Por encima de la gracia y regalos que Cristo da a sus amados, está el superarse a uno mismo."*  
*Francisco de Asís.*



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	27
1.1 Definición de enfermedad renal crónica	27
1.2 Riesgo cardiovascular en la enfermedad renal crónica	29
1.3 Factores de riesgo cardiovascular: alteraciones del metabolismo óseo-mineral	29
1.3.1 Alteraciones de laboratorio	30
1.3.2 Calcificación vascular	31
1.3.3 Alteraciones óseas	51
<b>2. OBJETIVOS</b>	55
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	59
3.1 Un nuevo mecanismo de calcificación vascular y los $\beta$ glucanos de cebada como estrategia anticalcificante en un modelo animal experimental de ERC y en humanos sin ERC	59
3.2 Nuevos marcadores no invasivos de daño vascular en pacientes con enfermedad renal crónica.	63
<b>4. RESULTADOS</b>	73
4.1 Un nuevo mecanismo de calcificación vascular y los $\beta$ glucanos de cebada como estrategia anticalcificante en un modelo animal experimental de ERC y en humanos sin ERC	73
4.2 Nuevos marcadores no invasivos de daño vascular en pacientes con enfermedad renal crónica	85
<b>5. DISCUSIÓN</b>	113
<b>6. CONCLUSIONES</b>	129
<b>7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO. RETOS PARA EL FUTURO</b>	133
Limitaciones del estudio	133
Fortalezas del estudio	133
Retos para el futuro	134
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	137
<b>9. ANEXOS</b>	159
ANEXO I Participaciones en congresos	159
ANEXO II Artículos publicados	165
ANEXO III Informe de la Comisión de Ética	211





# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1,25OH vitD	1,25 hidroxivitamina D
25(OH)D	25 hidroxivitamina D
ACCI	Arteria carótida común izquierda
ADAM17 (TACE)	Desintegrina y metaloproteasa 17.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADPKD	Poliquistosis Renal Autosómica Dominante
ARPKD	Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva
AF	Ángulo de fase
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGEs	Productos de glicosilación avanzada
AHA	Asociación Americana del Corazón
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ARA2	Antagonista de los receptores de angiotensina 2
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATM	Masa de tejido adiposo
BIE	Bioimpedancia eléctrica
BMI	Índice de masa corporal
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
Ca	Calcio sérico
CAC	Score de calcio coronario
CEUS	Contrast-enhanced ultrasound
cGAS	GMP-AMP sintasa cíclico
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorders
CMLV	Células músculo liso vascular
Cr	Creatinina sérica
cLDL	Colesterol LDL
CV	Calcificación vascular
DE	Desviación estándar
DEFA3	Defensina alfa 3
DPE	Desgaste proteico energético
DM	Diabetes mellitus
DMO	Densidad mineral ósea
DP	Diálisis peritoneal
DPA	Diálisis peritoneal automatizada
DPCA	Diálisis peritoneal continua ambulatoria
dsADN	ADN de doble cadena
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedad cardiovascular
ECW	Agua extracelular
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EPO	Eritropoyetina
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCA	Enfermedad renal crónica avanzada
ESC	Sociedad Europea de Cardiología
ET-1	Endotelina-1
FA	Fosfatasa alcalina
Fat	Porcentaje de grasa corporal

FG	Filtrado glomerular
FGF-1	Factor de crecimiento fibroblástico 1
FGF23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
FRR	Función renal residual
FSC	Forward scatter
FTI	Índice de tejido graso
g	Gramo
GIMc	Grosor íntima-media carotídeo
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HD	Hemodiálisis
HIF	Factor inducible por hipoxia
HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
HPTS	Hiperparatiroidismo secundario
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC	Intervalo de confianza
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IMC	Índice de masa corporal
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IK	Índice de Kauppila
INF $\gamma$	Interferón gamma
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IL-17	Interleuquina 17
INF $\gamma$	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
ISGLT2	Inhibidores del cotransportador sodio glucosa tipo 2
K	Potasio sérico
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KDOQUI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
Kg	kilogramo
LDG	Granulocitos de baja densidad
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LPS	Lipopolisacáridos
LTI	Índice de tejido magro
LTM	Masa de tejido magro
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
mEq/L	Miliequivalentes/litro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MC	Medio calcificante
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MFI	Mediana de intensidad de fluorescencia
miR	Micro RNA
MMP	Metaloproteasas
n	Muestra
Na	Sodio
NaPi2	Cotransportador sodio-fósforo 2
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
nPCR	Tasa de catabolismo proteico normalizado
nSMase2	Esfingomielinasa neutra 2
ODR	Osteodistrofia renal

OH	Índice de agua libre
OL	Agua no incluida en el tejido magro ni el tejido graso
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
OR	Odds-ratio
P	Fósforo sérico
P25-P75	Rango intercuartílico
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Proteína c reactiva
PET	Test de equilibrio peritoneal
PNH3	Péptido neutrófilo humano 3
PTH	Paratohormona
RANKL	Receptor activador del ligando del factor nuclear kappa B
RCV	Riesgo cardiovascular
ROC	Receiver operating characteristic
ROS	Sustancias reactivas de oxígeno
RVD	Receptores de vitamina D
SCORE	Estimación sistemática del riesgo coronario
SD	Desviación estándar
SMI	Superb Microvascular Imaging
STING	Estimulador de genes de interferón
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SSC	Side scatter
TACE (ADAM17)	Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa
Tang	Linfocitos T angiogénicos
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TRS	Terapia renal sustitutiva
VCAM -1	Molécula de adhesión de células vasculares-1
VDR	Receptor de vitamina D
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VO	Vía oral
VOP	Velocidad de onda de pulso
VSC	Vía subcutánea
VVa	Vasa vasorum adventicial



# 1. INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Definición de enfermedad renal crónica

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) está definida por las guías KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) como la presencia de anomalías de la estructura o del funcionamiento renal durante más de tres meses que generan implicaciones para la salud (1). Son consideradas como anomalías:

- Albuminuria mayor a 30 mg/24 horas o un cociente albúmina/creatinina mayor a 30 mg/g.
- Alteraciones en el sedimento urinario.
- Alteraciones histológicas.
- Alteraciones electrolíticas o datos de desorden tubular.
- Alteraciones evidenciadas por pruebas de imagen.
- Historia de trasplante renal.
- Disminución de filtrado glomerular (FG)  $<60$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (FG categorías G3a-G5).

Así, se clasifica la ERC acorde al filtrado glomerular (por la fórmula EPI-CKD) y a la presencia de albuminuria como se muestra en la **tabla 1**.

Un FG  $<30$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> se conoce como ERC avanzada (ERCA) y aunque no hay consenso sobre cuándo empezar una terapia renal sustitutiva (TRS), el FG  $<15$  ml/min es un factor a tener en cuenta para dicha indicación. Existen tres tipos de TRS, hemodiálisis (HD), diálisis peritoneal (DP) y trasplante renal. La HD se lleva a cabo en centro o en domicilio y sus únicas contraindicaciones absolutas son la ausencia de acceso vascular (imposibilidad de fístula arterio-venosa o catéter venoso central) o inestabilidad cardiovascular. La DP es una técnica domiciliaria y a su vez tiene dos modalidades, DP automatizada (DPA) que se realiza mediante una cicladora, y, la DP continua ambulatoria (DPCA) que es manual. La DP utiliza la membrana peritoneal para el transporte de solutos y ultrafiltración, por lo que está contraindicado cuando hay daño del peritoneo o imposibilidad de colocar un catéter. Sin embargo, el trasplante renal es el tratamiento de elección siempre que sea factible (2).

Pronóstico de la ERC según FG y abuminuria: KDIGO 2012				Categorías por albuminuria persistente Descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal o aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	> 300 mg/g > 30 mg/mmol
Categorías por FG, descripción y rango (mL/min/ 1,73m <sup>2</sup> )	G1	Normal o alto	> 90			
	G2	Levemente disminuido	60-89			
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
	G3b	Descenso moderado- grave	30-44			
	G4	Descenso grave	15-29			
	G5	Fallo o fracaso renal	< 15			

**Tabla 1.** Clasificación de la enfermedad renal crónica según las categorías de filtrado glomerular y de albuminuria.

Riesgo de complicaciones específicas de la enfermedad renal, riesgo de progresión y riesgo cardiovascular: verde, riesgo de referencia, no hay enfermedad si no existen otros marcadores definitorios; amarillo, riesgo moderado; naranja, riesgo alto; rojo, riesgo muy alto. Tomado de García-Maset R. y cols. (3)



## 1.2 Riesgo cardiovascular en la enfermedad renal crónica

Conforme progresa la ERC, el riesgo cardiovascular (RCV) de estos pacientes aumenta exponencialmente, *tabla 1*. De hecho, la enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de muerte en la ERC con un riesgo de morbilidad de 15 a 30 veces mayor a la de la población general al ajustar por edad (4). De hecho, el 50% de pacientes con ERCA, fallecen antes de empezar una TRS. Se conoce que jóvenes de 25 a 34 años con ERCA tienen una mortalidad anual que se corresponde con la de una persona de 85 años sin patología renal (5), y en quienes ya están en diálisis, el riesgo de muerte por complicaciones cardiovasculares es de 10 a 20 veces más que en la población general. Todo ello llevó a la Sociedad Europea de Cardiología (ESC, por sus siglas en inglés) a catalogar a los pacientes con ERC dentro del grupo de alto RCV (6). Estas dos entidades están interrelacionadas. Así, la ECV es causa de ERC y, por otro lado, la propia ERC es un factor independiente de RCV (1), (7).

Esto es debido a que, con el descenso de la función renal, a los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) tradicionales (edad, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular -ECV-, hipertensión arterial -HTA-, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo y obesidad), se suman los no tradicionales (albuminuria, alteraciones del metabolismo óseo-mineral, sobrecarga de volumen, estrés oxidativo, desnutrición y disfunción endotelial) desembocando en una excesiva morbilidad (5).

## 1.3 Factores de riesgo cardiovascular: alteraciones del metabolismo óseo-mineral

En el año 2009 las guías KDIGO propusieron las siglas en inglés CKD-MBD, Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder, para referirse a las anomalías de laboratorio (calcio -Ca-, P, vitamina D, paratohormona -PTH-, factor de crecimiento fibroblástico 23 -FGF23- y klotho), óseas (osteodistrofia) y de calcificación vascular (CV) o de tejidos blandos que acontecen en el enfermo renal.

A continuación, se describe la fisiopatología de estas alteraciones.

### 1.3.1 Alteraciones de laboratorio

#### 1.3.1.1 Eje kloto/FGF23

El primer fenómeno en acontecer en los estadios tempranos de ERC es la pérdida acelerada del contenido del gen de la longevidad klotho que induce al hueso a producir el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23). FGF23 se une a su co-receptor, klotho, para mantener la normofosfatemia mediante dos mecanismos: la inhibición de la síntesis de vitamina D hormona, (a través de la inhibición de la enzima CYP27B1 encargada de la formación de calcitriol a partir del 25-hidroxi-vitamina D) con lo que evitará la absorción intestinal de fósforo (P), como así también la reducción de los cotransportadores de NaPi IIa en los túbulos proximales favoreciendo la fosfatúria. El descenso del calcitriol estimulará a la PTH que modulará la endocitosis de estos cotransportadores participando también de la eliminación de P. Sin embargo, el FGF23 llega a elevarse de forma extrema conforme progresa la ERC asociándose a enfermedad aterosclerosa, eventos cardiovasculares y CV. El impacto cardiovascular adverso de FGF23 promoviendo hipertrofia ventricular izquierda, es independiente de Klotho (8). En la ERC, la CV se va a ver favorecida por un descenso en la excreción fraccional de P (EFP), se sabe incluso que un índice EFP/FGF23  $<1/3,9$  es indicativo de mayor riesgo de calcificación aórtica grave (9).

#### 1.3.1.2 Hiperparatiroidismo secundario

La hiperfosfatemia estimula el desarrollo de hiperplasia paratiroidea, un desorden donde disminuirán los receptores de vitamina D (RVD) y el sensor de Ca, contribuyendo a la resistencia del tratamiento del hiperparatiroidismo secundario (HPTS) (10),(11). El HPTS se asocia a mortalidad en pacientes con ERC estadios 3, 4 y 5 así como en diálisis (12),(13). Indudablemente, la causa es su comportamiento como una toxina urémica capaz de generar pérdida ósea, CV y de tejidos blandos, favorecer al desgaste calórico-proteico, a la anemia refractaria al tratamiento y a la inflamación (14). En el caso concreto de la CV, en un modelo animal donde se realizó nefrectomía simulada 5/6 a ratas y a las que se les administró PTH, se pudo apreciar calcificación intensa de la media aórtica independientemente de la uremia, lo que sugiere la importante contribución de la PTH a la CV (15).

#### 1.3.1.3 Vitamina D

El citocromo p450 CYP27B1 induce la formación renal de 1,25 hidroxí vitamina D (calcitriol) a partir de su sustrato, la 25 hidroxívitamina D3 (calcidiol). Sin embargo, el HPTS y el exceso de FGF23 reducen la expresión de esta enzima contribuyendo al descenso de calcitriol en la ERC. Este descenso, además de actuar a nivel intestinal disminuyendo la absorción de Ca y P y de estimular la síntesis de PTH como se comentó previamente, reducirá, a nivel renal, la absorción tubular de Ca, los niveles de cyp27B1 en el túbulo proximal, la expresión de klotho, del cotransportador NaPi IIa y la expresión de megalina. Con respecto al nivel óseo, el resultado será la reducción de la síntesis

de FGF23, el remodelado óseo (ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B -RANKL-/ osteoprotegerina -OPG-) y la mineralización, contribuyendo a la CV; y, a nivel de las células de músculo liso vascular (CMLV) disminuirá la expresión génica de miR145, un regulador esencial del fenotipo contráctil de estas células (16). De hecho, Shroff y cols., describieron que niveles bajos de 1,25D se asocian con niveles altos del marcador inflamatorio PCR ultrasensible y CV (17).

La megalina es necesaria para la reabsorción tubular de calcidiol unido a su proteína transportadora DBP del filtrado glomerular, por lo que su descenso marcado en el curso de la ERC contribuye a la deficiencia de vitamina D con consecuencias relevantes en la salud ósea y vascular. En población general con función renal normal, los niveles bajos de calcidiol secundarios a la poca exposición al sol, se asocian con HPTS y masa mineral ósea disminuida y por cada descenso de 10 ng/ml de calcidiol, la calcificación aórtica progresa en un 33% (18),(19). En pacientes en diálisis, se refuerza aún más este vínculo adverso manifestándose de forma muy marcada la relación existente entre fracturas y CV (20). También se ha visto que niveles de calcidiol inferiores a 23 ng/ml multiplican por dos el riesgo de progresión de la enfermedad renal, medida por la duplicación de la creatinina, aún después de ajustar por los mayores factores de riesgo (21).

#### 1.3.1.4 Hiperfosfatemia

Una dieta alta en P reduce los niveles de klotho renal y deteriora la función renal por daño tubular asociado a inflamación y estrés oxidativo. Estos cambios suceden con concentraciones normales de P (22). Sin embargo, el agotamiento de los mecanismos fosfatúricos desembocarán en hiperfosfatemia y su presencia nos indicará que “el paciente ya se ha calcificado” (9). Se sabe que mínimos cambios de P, aunque se encuentren dentro del rango de normalidad, tienen un impacto negativo (23). Así, la hiperfosfatemia es etiquetada por Fernández E. como un “asesino silencioso” capaz de empeorar el hiperparatiroidismo secundario, la desmineralización ósea y el estrés oxidativo, generando inflamación sistémica y contribuyendo al desarrollo de CV (24).

### 1.3.2 Calcificación vascular

La CV del enfermo renal es un campo que está en permanente investigación, sin embargo, se conoce que aumenta conforme avanza la ERC, que se trata de un proceso activo que inicia en la capa media arterial y luego se extiende a la íntima, es decir, es propulsado fundamentalmente por las CMLV, y, que el P es considerado su principal inductor (25),(26).

#### 1.3.2.1 Fisiopatología de la calcificación vascular

Son varios los factores que participan en la CV, algunos forman parte del curso natural de la ERC y otros, de la iatrogenia como se describe a continuación.

### 1.3.2.1.1 Hiperfosfatemia

Las CMLV expresan cotransportadores de P. En condiciones fisiológicas, el P ingresa a estas células a través del cotransportador PiT-1 y participa de la formación de ATP por parte de la sintetasa y de la fosforilación oxidativa (27). Sin embargo, la hiperfosfatemia, produce varias alteraciones:

1) Induce la expresión de PiT-1 y genera daño mitocondrial al producir sustancias reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que modifican su potencial de membrana volviéndola permeable y generando apoptosis, un estímulo para CV (28).

2) Favorece la síntesis de proteínas formadoras de hueso como son las proteínas morfogénicas óseas (BMP) 2 y 4, Runx2, entre otras, e inicia una diferenciación osteogénica de estas células. Esta transformación es compleja e intervienen varias vías que aún no están totalmente dilucidadas sin embargo mencionamos a tres en las que el P actúa como promotor: a) WNT/ $\beta$ -catenina que a su vez induce la producción de metaloproteasas de matriz (MMP2 y MMP9), b) promueve la expresión de la cadena ligera kappa del factor nuclear de células B activadas (NF- $\kappa$ B) y facilita su entrada en el núcleo celular para que se produzca su traslocación lo que dará lugar a la transcripción génica de moléculas de adhesión, citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, y proteínas formadoras de hueso, y, c) la reducción de la expresión de miR-145 que causa pérdida del fenotipo contráctil durante el proceso de diferenciación osteogénica (29),(16).

3) El P es el principal componente de los cristales de hidroxapatita que se depositan en la matriz extracelular en el contexto de CV (30).

4) La inflamación que produce el P en el endotelio vascular ocasiona disfunción endotelial, "el riesgo de los factores de riesgo" (31),(32),(33). La inflamación crónica del endotelio es clave en la aterosclerosis. Se conoce que este hecho ocurre desde estadios tempranos de ERC y que la progresión de la aterosclerosis está estrechamente relacionada con niveles altos de P como se vio en el estudio NEFRONA (Observatorio Nacional de Atherosclerosis en NEFrología) (34). Además, se ha observado que, aumentos en la densidad de los vasa vasorum adventiciales (VVa) están asociados al desarrollo de las placas ateromatosas. El VV es una red de microvasos localizado en la adventicia, de forma paralela al vaso y se encarga de nutrir las paredes de los vasos (35). Su neoformación excesiva favorece el engrosamiento miointimal desarrollando aterosclerosis de "afuera hacia adentro" (36). De esta manera se puede ver como el daño de las capas adventicia, media e íntima, forman parte de la misma entidad en estos pacientes (37).

#### 1.3.2.1.2 Descenso de miR-145

El complejo entre la forma hormonal de la vitamina D (calcitriol) y su receptor (VDR) induce la expresión de miR-145 en las CMLV. Se trata de una pequeña molécula de ARN que junto a miR-125b y miR-155 contribuyen a mantener el fenotipo contráctil de las CMLV con niveles de actina adecuados (16),(38),(39),(40). De los tres, el más abundante en estas células y el principal regulador de su viabilidad y función es miR-145 (41). Sus descensos, perjudiciales para la salud vascular, están desencadenados por la hiperfosfatemia, la propia ERC y enfermedades vasculares proliferativas, y, favorecen la diferenciación osteogénica con aumentos en los marcadores de formación ósea como Runx2 y Osterix y descensos paralelos en los niveles de actina (42). Los descensos de miR-145 se asocian directamente al proceso de inflamación vascular a través de la estimulación de la expresión génica de ADAM17 (43).

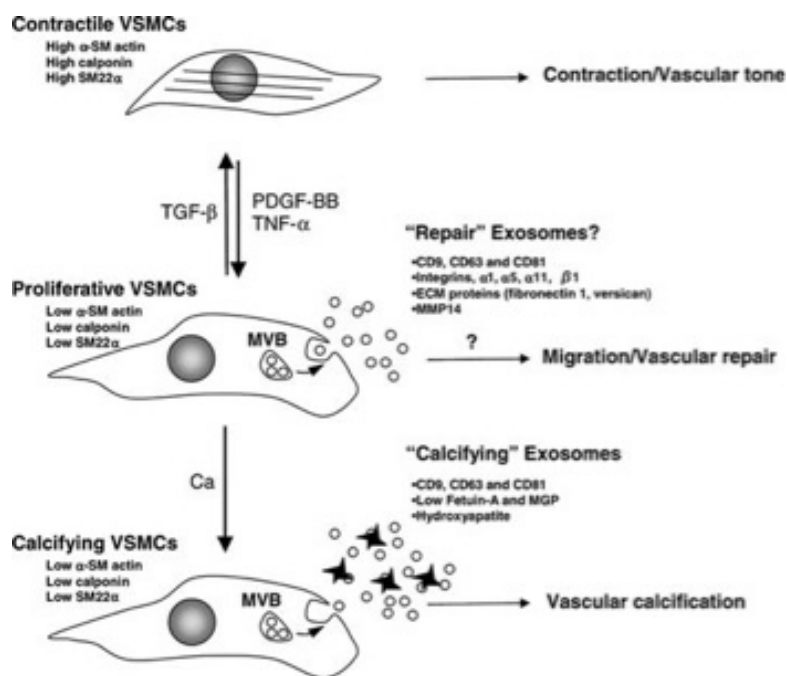
#### 1.3.2.1.3 ADAM17

ADAM17 (también llamada TACE por Tumor Necrosis Alpha Converting Enzyme), se describió inicialmente como la metaloproteasa responsable de escindir el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) de su precursor en la membrana celular, liberando su forma soluble a la circulación (44). La forma soluble del TNF $\alpha$  es una potente citoquina proinflamatoria producida principalmente por monocitos y macrófagos y ampliamente estudiada ya que promueve inflamación sistémica y participa de forma activa en el proceso de aterosclerosis y CV. TNF $\alpha$  es "el principal inductor de la muerte de las células endoteliales en las enfermedades cardiovasculares", como lo catalogan Sommer y cols. (45). Además, induce aumentos de la BMP2 y estimula a NF- $\kappa$ B en las CMLV (46). A su vez, se conoce que TNF $\alpha$  regula la expresión génica de ADAM17, lo que genera un circuito peligroso al perpetuar la inflamación y el daño multiorgánico que la acompaña. En la ERC existe un aumento en la expresión renal de ADAM17, como así también de la actividad de ADAM17 circulante que guarda relación con el desarrollo de ECV posteriores como lo mostró el estudio NEFRONA (47), *Fig.2*.

#### 1.3.2.1.4 Esfingomielinasa neutra 2

Se conoce que TNF $\alpha$ , otras citoquinas como interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferón gamma (INF $\gamma$ ), el aumento del calcio extracelular y ROS (48),(49), activan la enzima esfingomielinasa neutra 2 (nSMase2), conocida también como esfingomielina fosfodiesterasa 3 (Smpd3). Se trata de la enzima que hidroliza la esfingomielina de las membranas celulares para convertirla en ceramida, el exceso de ceramida promueve la detención el crecimiento celular, la senescencia, la apoptosis y con todo ello, genera inflamación. Además, estimula a las moléculas de adhesión ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM -1 (molécula de adhesión de células vasculares-1), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1) y el reclutamiento de macrófagos. Finalmente participa directamente en la liberación de exosomas procalcificantes por

parte de las CMLV hacia las células vecinas y hacia las células endoteliales con lo que promueve la calcificación de la media y de la íntima, *Fig. 1* (50),(51),(52),(53),(54). Los exosomas son vesículas extracelulares pequeñas, la principal forma de comunicación intercelular, y en el caso de los exosomas procalcificantes se originan a partir de endosomas que experimentan invaginación, gemación y escisión de la membrana plasmática con incrementos en las tasas de secreción al espacio extracelular (55).



**Fig 1.** Rol propuesto de los exosomas en la reparación y calcificación vascular.

Las células musculares lisas vasculares contráctiles sanas (VSMC) mantienen el tono vascular, pero la lesión provoca una transición fenotípica y una proliferación. Las VSMC proliferativas liberan activamente exosomas positivos para CD63/CD81 enriquecidos con inhibidores de la calcificación, como fetuina-A, y otras cargas que pueden facilitar los procesos de reparación vascular, como la adhesión y la migración. El estrés prolongado y un desequilibrio mineral aumentan la liberación de exosomas y los desplazan hacia un estado procalcificado. Tomado de Kapustin y cols. (55)

### 1.3.2.1.5 Activación de la vía cGAS/STING

En el proceso de inflamación sistémica predisponente a CV también participa STING. Se trata de una proteína del citoplasma celular cuyo ligando es GMP-AMP sintasa cíclica (cGAS). La vía cGAS-STING es activada por aumentos en IFN- $\gamma$  y/o por daño del ADN nuclear se traduce en la aparición de fragmentos de ADN en el citoplasma celular, similares a los que ocurren con una invasión bacteriana, ocasionando la llamada "inflamación estéril". La respuesta celular consiste en un aumento de la expresión de genes que codifican citoquinas como IFN-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 e interleuquina 8 (IL-8), así como la activación de los macrófagos del endotelio vascular con lo que participa de la CV y aterosclerosis. De hecho, se ha evidenciado que las lesiones ateroscleróticas carotídeas en humanos expresan STING y que, al bloquearlo farmacológicamente, mejora la aterogénesis (56),(57).

Aunque existen inhibidores de la CV (Pit-2, fetuina A, la proteína Gla de la matriz dependiente de vitamina K, OPG, osteopontina, osteonectina, proteína formadora de hueso 7, pirofosfato y klotho), estos son superados por los estímulos procalcificantes entre los que destaca la hiperfosfatemia por su componente inflamatorio.

### 1.3.2.1.6 Consecuencias negativas del tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en la calcificación vascular

Las guías KDIGO recomiendan tratar el HPTS en función de los niveles progresivamente crecientes o persistentemente elevados de PTH por encima del límite superior, aunque se desconoce con exactitud los valores óptimos para cada estadio de ERC, excepto para enfermos en HD según revelara el estudio COSMOS (58). El control del HPTS involucra precisamente el tratamiento de los factores modificables que lo impulsan: hiperfosfatemia, hipocalcemia y déficit de vitamina D, tanto calcidiol como calcitriol. El tratamiento de CKD-MBD no es sencillo y ha sido motivo de amplio debate por el desenlace en CV.

A continuación, se muestra cómo el manejo del HPTS ha ocasionado durante muchos años, CV iatrogénica al abordar cada uno de sus factores condicionantes.

#### *a. Fósforo*

Existen dos medidas principales para el control de la hiperfosfatemia, la primera, consiste en la restricción dietética de P, evitando que el paciente llegue a la desnutrición, y, la segunda, en el uso de captadores intestinales de P. Los captadores de base cálcica se han asociado a hipercalcemia y CV, además, pueden interactuar con la vitamina K2 limitando su biodisponibilidad y, por tanto, la imposibilidad de activación de la proteína Gla de la matriz exacerbando la CV (59),(60),(61). De todas maneras, Cannata y cols., en el estudio COSMOS, demostraron por primera vez que el uso

de captadores de P en pacientes con ERC estadio 5 en HD redujo la mortalidad por todas las causas y cardiovascular en un 29 y 22%, respectivamente (62). Entre ellos, el sevelamer, un captador que parece disminuir la mortalidad por todas las causas al compararlo con captadores cálcicos, y esto probablemente se deba a que reduce la inflamación y los productos de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) y a que aumenta los niveles de fetuina A (63),(64). Sin embargo, las reacciones adversas de los captadores a nivel intestinal como estreñimiento o diarrea, son causa frecuente del abandono del tratamiento. Finalmente, en los pacientes que ya se encuentran en diálisis, la dosis de diálisis es un factor a tener en cuenta como terapia reductora de P (65).

#### ***b. Calcio***

A medida que avanza la ERC, los niveles de Ca van en descenso. Sin embargo, las guías KDIGO nos indican que la hipocalcemia leve y asintomática no debería corregirse ya que no se ha asociado a un peor pronóstico en la ERC. Lo contrario sucede con la hipercalcemia, debido a que en la ERC existe dificultad para eliminar el Ca, y, los suplementos cálcicos y el mal uso de la vitamina D tanto activa como nutricional, pueden favorecer la progresión de daño renal y la CV (65). De hecho, excesos de vitamina D activa y sobre-supresión de PTH causan la enfermedad ósea adinámica en la que el defecto en la mineralización ósea predispone a calcificación ectópica (66),(67),(68).

#### ***c. Vitamina D nutricional***

Se ha demostrado que la monoterapia con colecalciferol puede retrasar el desarrollo del HPTS en la enfermedad renal pediátrica y también controlar el HPTS en ERC estadios 3-4 (69). Sin embargo, existen varios aspectos a considerar por la controversia en el riesgo de CV.

En primer lugar, hay errores de concepto de las distintas formas de la vitamina. Así tenemos que el colecalciferol (vitamina D3) es la principal forma natural de vitamina D nutricional en mamíferos y el ergocalciferol (vitamina D2) es la forma natural en vegetales. El ergocalciferol es menos potente que el colecalciferol solo si se administra en dosis quincenales o mensuales debido a que su vida media en la circulación es mucho menor a la del colecalciferol. Las dosis diarias de colecalciferol y ergocalciferol son igualmente efectivas y no hay diferencias en los niveles de calcidiol a partir estas 2 formas naturales de la vitamina D. El calcidiol (25(OH)D3 o 25(OH)D2 según se sintetice a partir de colecalciferol o ergocalciferol) es el metabolito circulante de mayor concentración y con la mayor vida media, y, el calcitriol (1,25-(OH)2D3 o D2) es la forma hormonal de la vitamina y que circula en concentraciones 1000 veces inferiores a las de 25(OH)D (70).

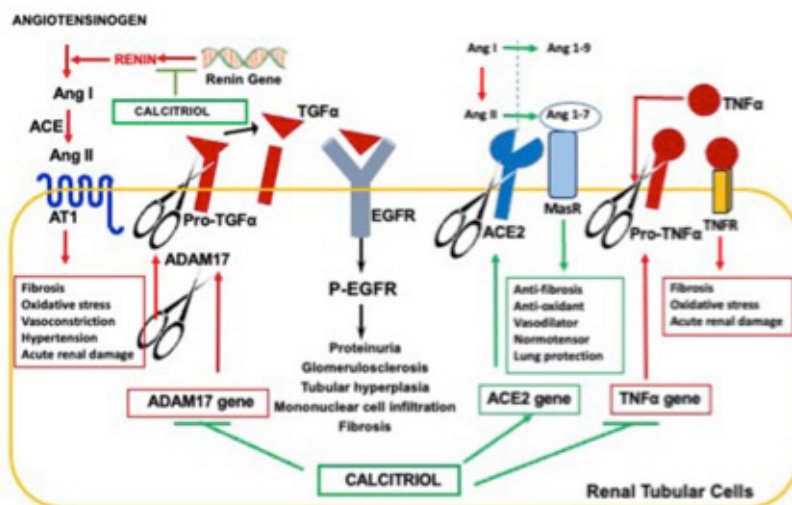
En segundo lugar, hay controversia sobre las cifras objetivo de 25(OH)D en el enfermo renal (71),(72),(73). Es importante indicar que no se realizan mediciones de calcitriol de forma rutinaria ya que no está estandarizada y debido a que su corta vida media en la circulación (7-8 horas) dificulta una adecuada interpretación de los resultados.



Finalmente, existe confusión en la manera de prescribir para una adecuada corrección de la deficiencia de vitamina D. En España, existen dos presentaciones de vitamina D para aumentar los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D o calcidiol pero no son equivalentes: colecalciferol y calcidiol (25 hidroxivitamina D<sub>3</sub>), donde cada microgramo del segundo es 5 veces más eficaz que el primero para incrementar los niveles ya que no necesita conversión, pero sus acciones de incrementar la absorción intestinal de Ca son también más potentes con lo que se aumenta el riesgo de hipercalcemia. Este es un dato a considerar ya que, aunque se necesitaría una dosis mucho menor de calcidiol para corregir niveles bajos de 25(OH) circulante, se aumenta el riesgo de efectos indeseables como hipercalcemia e hipercalciuria si se dan dosis elevadas. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda, por otro lado, no superar los 100 µg diarios lo que equivale a 4.000 UI de colecalciferol siendo esta dosis, segura. En último lugar es recomendable el uso de dosis diaria a bolos, ya que, con estos últimos, disminuye la tasa de conversión a 25 (OH)D y se controlan las disminuciones en las concentraciones circulantes debido a la menor vida media del ergocalciferol (Vitamina D<sub>2</sub>) con respecto al colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub>) (74). En España, habitualmente se suplementa con 266 mcg de calcifediol mensual que se correspondería con una dosis de 533 UI/día.

#### *d. Vitamina D activa y análogos*

La forma hormonal de la vitamina D, calcitriol y su análogo paricalcitol, parecen reducir el riesgo de mortalidad cardiovascular, así lo mostró un metaanálisis con 194.932 pacientes (75). Son fármacos eficaces para suprimir la PTH y son el tratamiento estándar del HPTS. Sin embargo, tienen como efecto secundario aumentar los niveles de Ca y P acelerando el daño vascular (76) y también la FGF23 circulante a niveles que promueven la hipertrofia ventricular izquierda. A principios del año 2000, Teng y cols., reportaron un aumento de la supervivencia en pacientes de HD a los que se les sustituyó calcitriol por paricalcitol (77). Estos beneficios del paricalcitol se deben a una multiplicidad de acciones renales y cardiovasculares: 1) produce menos episodios de hipercalcemia y controla mejor el HPTS, 2) reduce los niveles de TNF $\alpha$ , *Fig. 2*, y *3*) disminuye la expresión de BMP2 y los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear en las CMLV (78),(79),(29).



**Figura 2.** Propiedades antihipertensivas del complejo calcitriol-VDR que reducen la progresión de la ERC.

El calcitriol mejora el daño renal provocado por la hipertensión mediante la supresión de la expresión del gen de la renina, responsable de las elevaciones de la angiotensina II circulante; Inhibición de la expresión de ADAM17 para contrarrestar eficazmente los aumentos mediados por angiotensina II en las señales de TGF $\alpha$ /EGFR responsables de la progresión de la ERC; Inducción de ACE2 para la síntesis de angiotensina 1-7 y señales antihipertensivas, antifibróticas y antiinflamatorias del receptor de angiotensina 1-7/MAS, e inhibición de la expresión de TNF $\alpha$ , cuya inducción del gen ADAM17 aumenta aún más la inflamación sistémica y la lesión renal. Tomado de Dusso y cols. (43)

Por ello las guías KDIGO recomiendan, en caso de usar estos fármacos, se haga con dosis pequeñas vigilando los niveles de Ca y P para evitar estos efectos indeseables que se asocian con mortalidad (65),(80).

#### e. Calcimiméticos

Para tratar el HPTS en los pacientes que están en diálisis, disponemos de calcimiméticos cuyo mecanismo de acción se basa en aumentar la sensibilidad del sensor de Ca, de las glándulas paratiroides a las concentraciones extracelulares de Ca lo que disminuye la secreción de PTH y con ello, la mineralización de las CMLV (81). El efecto secundario es que, junto a este descenso, se reduce también la calcemia, lo que requiere vigilancia. Aparte de su control sobre el HPTS, se ha visto que podrían reducir las hospitalizaciones de causa cardiovascular, probablemente sea debido a que atenúan los aumentos en los niveles de FGF23, involucrado en morbilidad cardiovascular (82),(76).

Es posible combinar calcimiméticos con análogos de la vitamina D activa, no solo para mantener un balance adecuado de Ca por la inducción de los receptores de vitamina D y Ca, sino por su capacidad para disminuir la calcificación de tejidos blandos, tanto a nivel aórtico como arteriolar (arteriopatía urémica calcificante) (83),(84).

Deberíamos administrar las dosis mínimas de vitamina D y/o calcimimético necesarias para controlar el HPTS sin que se generen efectos adversos que incluyen, a más de lo comentado previamente, la excesiva supresión de la PTH lo que podría contribuir a enfermedad ósea adinámica. Es también importante destacar el descubrimiento reciente de que el sensor de Ca funciona también como sensor de P (10). Las concentraciones elevadas de P del enfermo renal inducen una alteración en la molécula del sensor de Ca que se traduce en una menor capacidad de respuesta a los aumentos de Ca. Parte de la variabilidad del enfermo renal en su respuesta a calcimiméticos podría deberse a diferencias en las concentraciones de P que alteran la respuesta del sensor de Ca a los estos fármacos (10).

#### *f. Paratiroidectomía*

Finalmente, cuando falla la terapia farmacológica, la paratiroidectomía sigue siendo una opción según las recomendaciones de las guías KDIGO, pero pueden producirse algunos problemas asociados con la misma como la hipocalcemia grave y aumento de mortalidad precoz (85).

#### **1.3.2.1.7 Subpoblaciones leucocitarias**

La inflamación sistémica y el estrés oxidativo asociado a los procesos inflamatorios contribuyen de forma mayoritaria a la CV, sin embargo, lo hacen a través de distintos mecanismos inmunológicos que están muy poco entendidos. Se describen subpoblaciones celulares leucocitarias consideradas marcadores de daño vascular y propensión a inflamación.

#### *a. Granulocitos de baja densidad y defensiva 3*

Hacbarth y Kajdacsy-Balla describieron por primera vez un subconjunto de granulocitos llamados granulocitos de baja densidad (LDG, del inglés low density granulocytes) por su capacidad de sedimentar en las fracciones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) (86). Difieren de los neutrófilos por su grado de madurez. Se cree que son liberados tempranamente desde la médula ósea al ser estimulada por citoquinas, o que éstas, junto con el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y macrófagos, participan en su proceso de diferenciación (87),(88). Su liberación se llevaría a cabo mediante vasos transcorticales cuya expresión mayoritaria es en zonas de resorción ósea (89). Al observarlos al microscopio electrónico, se aprecian como células segmentadas o similares a mielocitos, sin embargo, quedan dudas sobre sus características en cuanto a madurez en la granulopoyesis (87).

Guardan relación con ECV en patologías inflamatorias autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide y psoriasis, así como también en el cáncer y VIH ya que actúan como mediadores de inflamación (86),(90). Se sabe que tienen una mayor capacidad de producir citoquinas como INF-1, TNF $\alpha$  e interleuquina 17 (IL-17) y ADN de doble cadena (dsADN), además, de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) generando NETosis, un tipo de muerte celular producida por fibras de cromatina liberadas al espacio extracelular junto a proteínas de los gránulos de neutrófilos (91), (92). Las NET son citotóxicas para las células endoteliales y producen en ellas una apoptosis temprana. Todo ello les permite intervenir en el proceso de aterosclerosis temprana que sufren estos pacientes (87).

Por otro lado, se describió un gen que guarda relación con la etapa intermedia de maduración de los granulocitos, que se conoce como defensina 3 (DEFA3) y que podría constituir un marcador de la expansión de los LDG y de riesgo de daño endotelial en enfermos renales (93),(94).

#### ***b. Células CD4+CD28null***

El daño en el ADN y el acortamiento de los telómeros son un estímulo para que se pierda el receptor CD28 dando lugar a las células CD4+CD28null. Este subtipo de linfocitos T expresan moléculas citotóxicas y receptores para las mismas (como CX3CR1, receptor de CX3CL1 o fractalcina, que interacciona con TNF $\alpha$ ) que destruyen las células endoteliales por lo que su comportamiento termina asemejándoles a las natural killer. Liuzzo y cols., demostraron que estas células son predictoras independientes de síndromes coronarios agudos (95). Se les considera, por tanto, marcadores de inmunosenescencia y envejecimiento vascular (96),(97),(98). Es conocido que en personas de edad avanzada y sin daño vascular, los niveles circulantes de CD4+CD28null son mínimos en relación con aquellos que sí tienen patología a ese nivel (96). Por otro lado, se ha demostrado un incremento en su frecuencia y su asociación con aterosclerosis en pacientes con ERC-DP (99),(100).

#### ***c. Linfocitos T angiogénicos (Tang)***

El daño vascular y quimioquinas como CX3C12, estimulan al nicho hematopoyético para liberar células progenitoras endoteliales (CPE). Existen dos tipos de CPE que se diferencian por la expresión de distintos marcadores. Las tardías se conocen como células formadoras de colonias endoteliales (CFCE). Dentro de ellas se encuentra una población de células T CD3+CD1+CXCR4+/184 denominadas células Tang. Tang producen factores angiogénicos y movilizan a las CPE a los VVa. Una vez ahí, las CPE se unen a las células del endotelio del VV y se diferencian en células endoteliales, además, reclutan CMLV de los VVa y se produce así la formación de nuevos vasos (101). Estos neovasos son patológicos y se distinguen no solo porque son perpendiculares al vaso y no paralelos como los fisiológicos, sino que tienen una mayor densidad e invaden la capa media provocando cambios que exacerban el engrosamiento íntima-media. Se ha demostrado que la

neovascularización adventicial precede al engrosamiento de la íntima-media. Por otro lado, los VVa expresan moléculas de adhesión como ICAM que se correlacionan con sus valores en sangre periférica. Las células Tang, son, por tanto, importantes en la reparación del daño vascular por eso interesa mantener niveles adecuados en la enfermedad renal. Sin embargo, la densidad de las células Tang, guarda una correlación inversa con los FRCV presentes mayoritariamente en enfermedades inflamatorias como Esclerosis Sistémica, Artritis Reumatoide y LES, y es importante destacar también que la disminución de las células Tang se asocia directamente a un mayor grado de actividad de cada una de estas entidades autoinmunes (102),(103),(104). Se ha visto que estas células también descienden en pacientes con diabetes mellitus, una enfermedad que condiciona daño endotelial (101).

### 1.3.2.2 Métodos para estimar el daño vascular

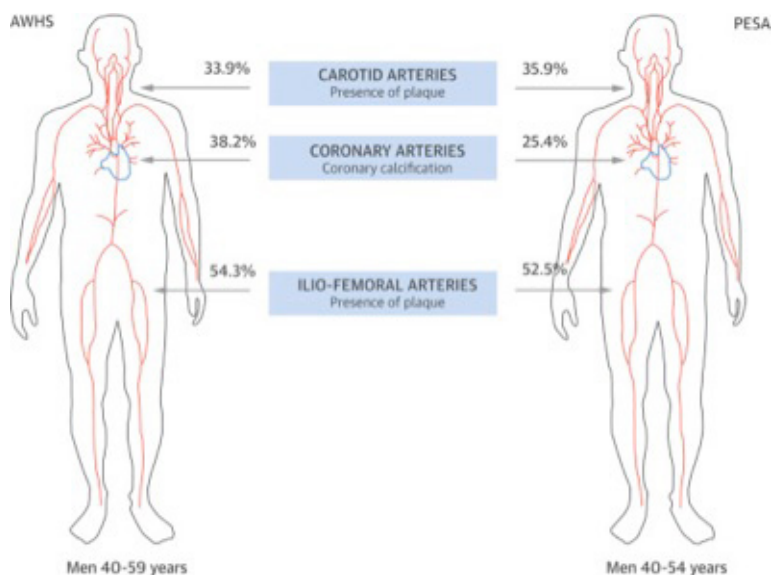
Pese a que los pacientes con ERC son considerados de alto RCV, es importante re-estratificar su riesgo, sobre todo cuando se encuentran asintomáticos de tal forma que se pueda establecer enfermedad vascular subclínica. Lo que se busca es demostrar el daño vascular en ausencia de signos y síntomas. Para ello contamos con los siguientes métodos:

**a) Índice tobillo-brazo:** se trata del cociente de las presiones sistólicas de tobillo/brazo para cada extremidad inferior. Valores inferiores a 0,9 se traducen en estenosis mayor al 50% a nivel aorto-ilíaco, y, superiores a 1,4, en calcificación arterial (105). Es, por lo tanto, un método tardío.

**b) Placas de ateroma carotídeas:** se denomina así al engrosamiento focal mayor del 50% de la pared arterial o al grosor íntima-media carotídeo (GIMc) mayor a 1,5 mm difuso o que protruye hacia la luz (106). Las guías de práctica clínica de la AHA/ACC y de la Sociedad Europea del Corazón/Sociedad Europea de Cardiología (ESH/ESC) recomiendan medir el GIMc en pacientes con RCV ya que es un predictor de ECV que indica aterosclerosis. Un GIMc superior al percentil 75 para edad, raza y sexo se asocia con riesgo de enfermedad coronaria y calcificación arterial coronaria (107),(108),(109),(110). En los últimos años se ha sugerido la evaluación del territorio femoral en vista de que su daño precede al carotídeo y coronario como lo demostraron los estudios PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) y AWHS (Aragon Workers' Health Study), *Fig. 3* (111).

**c) Calcificación de aorta lumbar:** las guías KDIGO recomiendan realizar una radiografía lateral simple de abdomen para establecer el Índice de Kauppila (IK) en pacientes con ERC estadios 3-5D. El IK es una reconocida medida de CV cuyos valores por encima de 5, son considerados marcadores de CV con significado clínico; además, guarda muy buena correlación con la angiotomografía que estima calcificación coronaria (112).

d) **Calcio coronario:** su evaluación se realiza por tomografía axial computarizada y predice mejor los eventos isquémicos que la presencia de placa carotídea y femoral. Se mide en unidades Agatston, así, un puntaje superior a 300 o un Agatston por encima del percentil 75 para edad, sexo y raza, se traduce en alto RCV por tratarse de una fase avanzada de arteriosclerosis coronaria. El problema para su uso rutinario es la radiación y el coste (105).



**Figura 3.** Prevalencia de Aterosclerosis Subclínica por territorio vascular en hombres de dos estudios de cohorte: AWHS (Aragon Workers' Health Study) y PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis).

Se aprecia una mayor frecuencia de placas a nivel de las arterias femorales, seguidas de calcificación coronaria y placas carotídeas en el caso del estudio AWHS, y, seguidas de placas carotídeas y calcificación coronaria en el caso del estudio PESA. Tomado de Laclaustra y cols. (111)

e) **Vasodilatación mediada por flujo en la arteria humeral:** se mide el porcentaje del cambio en el diámetro de la arteria durante la hiperemia reactiva que sigue a un periodo breve de isquemia transitoria ejercida por un manguito. La vasodilatación se produce por la liberación de óxido nítrico desde el endotelio. Sin embargo existe falta de consenso para su uso (113).

f) **Velocidad de onda de pulso carotídeo-femoral:** es el “gold estándar” para evaluar rigidez arterial por disfunción endotelial y el único que ha demostrado tener un valor predictivo de morbimortalidad. El flujo de sangre eyectado por el ventrículo izquierdo al recorrer por el trayecto arterial genera una onda que depende de la elasticidad de las arterias. Detecta la llegada sincrónica de la onda a las localizaciones carotídea y femoral. La onda es la suma de la transmisión anterógrada del impulso ejercido por la presión cardíaca y del reflejo retrógrado producido por el sistema vascular periférico. Un incremento de la VOP en 1 m/s incrementa los eventos cardiovasculares en un 14% y la mortalidad cardiovascular en un 15%, independiente de los factores de riesgo tradicionales por lo que la Sociedad Europea de Hipertensión recomienda medirla. Aunque es de fácil manejo, requiere personal entrenado y un equipo especializado por lo que está reservado para el ámbito de la investigación (114),(115),(116). Se han establecido valores de referencia de VOP para población europea, *tabla 2* (117).

Edad/PA	Óptima	Normal	Normal/Alta	Estadio I	Estadio II/III
<30	6.1 (4.6–7.5)	6.6 (4.9–8.2)	6.8 (5.1–8.5)	7.4 (4.6–10.1)	7.7 (4.4–11.0)
30–39	6.6 (4.4–8.9)	6.8 (4.2–9.4)	7.1 (4.5–9.7)	7.3 (4.0–10.7)	8.2 (3.3–13.0)
40–49	7.0 (4.5–9.6)	7.5 (5.1–10.0)	7.9 (5.2–10.7)	8.6 (5.1–12.0)	9.8 (3.8–15.7)
50–59	7.6 (4.8–10.5)	8.4 (5.1–11.7)	8.8 (4.8–12.8)	9.6 (4.9–14.3)	10.5 (4.1–16.8)
60–69	9.1 (5.2–12.9)	9.7 (5.7–13.6)	10.3 (5.5–15.1)	11.1 (6.1–16.2)	12.2 (5.7–18.6)
≥70	10.4 (5.2–15.6)	11.7 (6.0–17.5)	11.8 (5.7–17.9)	12.9 (6.9–18.9)	14.0 (7.4–20.6)

**Tabla 2.** Valores de referencia de la velocidad de onda de pulso (VOP) (m/s) en 11092 personas europeas según edad y presión sanguínea.

Tomado de “The reference values of arterial stiffness collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors” (117).

g) Endo-PAT: se trata de una tecnología basada en pletismografía, es decir, mide los cambios de volumen de flujo sanguíneo en el dedo de la mano tras ejercer presión. Se convierte en una medida del flujo sanguíneo basal y depende de tono arterial periférico (PAT). Valores menores a 1,7 significan disfunción endotelial (113).

h) **Ecografía con contraste de microburbujas:** en el año 2.000 se empezó a utilizar contraste ecográfico para para obtener una mejor resolución de las imágenes vasculares, la técnica se denominó CEUS, (Contrast-enhanced ultrasound, por sus siglas en inglés) (118),(119). Más adelante, con la finalidad de evaluar la neovascularización de las placas de ateroma en las endarterectomías se descubrió el valor de CEUS en la estimación de la

neovascularización de la adventicia carotídea como un marcador más sensible y que precede a cambios del GIMc para la detección temprana de riesgo subclínico de aterosclerosis, **Fig.4** (120),(121),(122),(123). A pesar de que el contraste es seguro, existe el riesgo de efectos secundarios como reacciones de hipersensibilidad o anafilactoides y que, además, cuenta con otras desventajas como su uso restringido en pacientes con coronariopatía grave e hipertensión pulmonar además de su elevado coste (119).

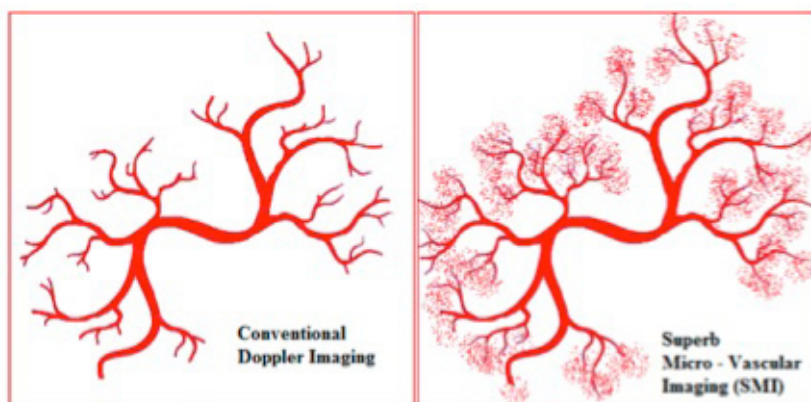


**Figura 4.** *Imagen de ecografía carotídea con contraste.*

*La luz de la arteria carótida común aparece blanca, lo que representa el agente de contraste de ultrasonido reflejado (Optison, Amersham). Los pequeños puntos blancos señalados con flechas rojas, representan las microburbujas que atraviesan la capa media. Cortesía de la Dra. María Victoria Arcidiacono*

**i) Ecografía Ultrasensible Sin Contraste, Superb Microvascular Imaging (SMI):** lo antes mencionado ha llevado al desarrollo de un tipo de ecografía Doppler que se equipara a CEUS y, por tanto, con las mismas indicaciones, se conoce como Super Microvascular Imaging (SMI) (124),(125),(126),(127). Tiene características muy peculiares entre las que destaca su alta sensibilidad ya que permite visualizar flujos de velocidad lenta con mínimos artefactos, y su mayor ventaja es que no utiliza medios contraste y es de fácil operación, **Fig. 5** (124).





**Figura 5.** Diferencias entre las imágenes proporcionadas por ecografía Doppler y SMI en la evaluación de vasos pequeños.

*Se puede apreciar la mayor resolución y capacidad de visualizar vasos con flujo sanguíneo bajo proporcionados por SMI al comparar con ecografía Doppler convencional. Tomado de Jasionyte, G. y cols (128)*

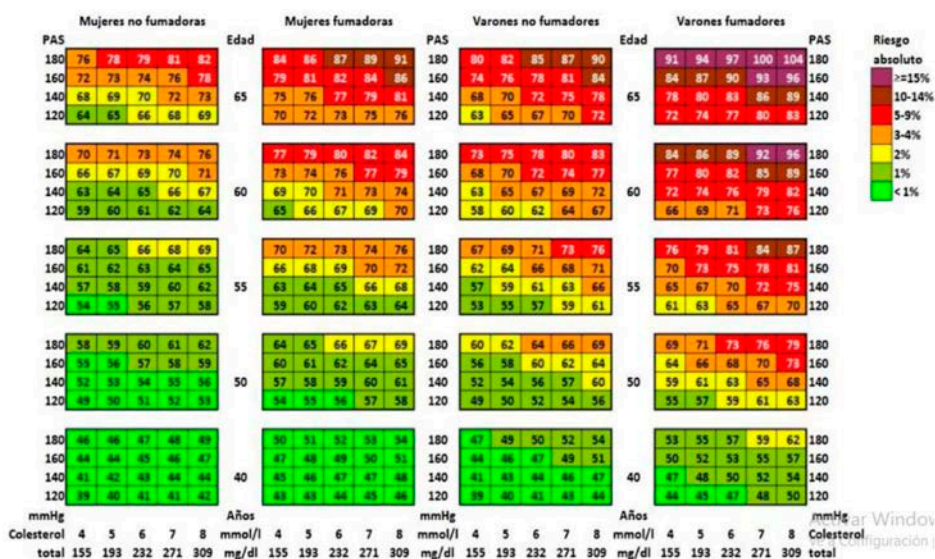
j) **Bioimpedancia eléctrica y ángulo de fase:** Los enfermos renales son vulnerables desde el punto de vista nutricional y con alta prevalencia de malnutrición, definida por Soeters como “un estado subagudo o crónico en el que se combinan varios grados de sobre o infranutrición con un patrón inflamatorio que genera cambios en la composición corporal y en la funcionalidad” (129). Se estima que hasta un 54% de los pacientes con ERCA y hasta el 70% de pacientes en diálisis, tienen el llamado Síndrome de Desgaste Proteico Energético (DPE), un término acuñado por la Sociedad Internacional de Nutrición Renal y Metabolismo que hace referencia al desgaste continuo de los depósitos proteicos y de las reservas energéticas y que conlleva a un incremento de la morbimortalidad (130),(131),(132),(133). La fisiopatología es compleja e involucra las toxinas urémicas, el estrés oxidativo, la acidosis metabólica y la inflamación que desemboca en CV. Se estableció así el término MIA para referirse a la estrecha relación existente entre Malnutrición, Inflamación y Aterosclerosis (134),(135). Sin embargo, las interacciones fisiopatológicas entre estos tres componentes no están del todo entendidas.

Disponemos en la práctica clínica de varios métodos para valorar el estado nutricional de nuestros pacientes. Uno de ellos es la bioimpedancia eléctrica (BIE), cada vez más

usado de forma rutinaria en las unidades de diálisis. La BIE proporciona información sobre la composición corporal y su funcionalidad, es decir, permite hacer una valoración morfofuncional de los pacientes. El ángulo de fase (AF) provisto por la BIE, es una medida bioeléctrica de la salud celular que se calcula tomando en cuenta el estado de hidratación y el grado de celularidad tisular y constituye un buen marcador del estado nutricional, como así también un marcador pronóstico en distintas patologías. De hecho, un AF  $<4,5^\circ$  predice el síndrome de desgaste proteico y valores  $<4^\circ$  predicen la probabilidad de desarrollar sarcopenia en pacientes en DP (136),(137). También se le considera un marcador de estrés oxidativo e inflamación incluso en población sana, y, como predictor de CV tanto en HD, como en DP (138),(139),(140),(141). El AF es considerado el parámetro que mejor predice supervivencia en ERC, cáncer y síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) y valores inferiores a  $4,5^\circ$  son indicativos de peor pronóstico en estas patologías (142),(143). Estas aseveraciones se deben a que el AF es un marcador de integridad celular. Precisamente, uno de los procesos adversos en la viabilidad celular es la senescencia que en sujetos con función renal normal está asociada a inflamación crónica estéril y también a enfermedades crónicas como la ERC, caracterizada por un envejecimiento multiorgánico acelerado que favorece su progresión (144),(145),(146).

**k) Calculadoras de RCV:** A más de las herramientas mencionadas, en la práctica clínica se cuenta con varias calculadoras que nos permiten estimar el riesgo de muerte cardiovascular de causa aterosclerótica a 10 años. En España, existen tres sistemas: el de la Guía Europea de Hipertensión, REGICOR (por REgistre GIroní del COR) y SCORE (por Systematic COronary Risk Estimation). Las guías europeas recomiendan el uso de SCORE para países de bajo RCV y personas que aún no han tenido un evento cardiovascular.

El algoritmo SCORE, por las siglas en inglés de “estimación sistemática del riesgo coronario”, integra información sobre el colesterol total, presión arterial (sistólica), tabaquismo, edad y sexo, **tabla 3**. El riesgo estimado se utiliza en la práctica clínica para estratificar a los pacientes (según las guías de la ESC) en categorías de riesgo para intervenciones farmacológicas y no farmacológicas. El algoritmo SCORE se ha validado en la población europea por lo que está limitado en otros grupos étnicos (147).



**Tabla 3.** Sistema SCORE (Systematic COronary Risk Estimation).

Estima el riesgo cardiovascular (RCV). Se considera bajo RCV cuando es < 1%, moderado si es  $\geq 1\%$  y < 5%, alto si es  $\geq 5\%$  y < 10% y muy alto si es  $\geq 10\%$

De lo mencionado en los párrafos anteriores se llega a determinar que existen distintos biomarcadores de CV en el enfermo renal, siendo considerados dentro de este grupo, los diversos inductores o inhibidores de la misma: OPG, osteopontina, osteonectina, BMP 2, 4 y 7, pirofosfato, FGF-23/klotho, fetuina A, anhidrasa carbónica y la proteína Gla de la matriz. Sin embargo, a ellos podrían sumarse marcadores de CV de tipo inmunológico como son las subpoblaciones leucocitarias (LDG, células inmunosenescentes CD4+CD28null y células Tang), pero cuya caracterización aún falta en la ERC. Además, los recientes parámetros clínicos, medibles y cuantificables (la evaluación de la microvasculatura adventicial mediante ecografía ultrasensible, el ángulo de fase provisto por medidas de la bioimpedancia eléctrica y el algoritmo SCORE probado en población general), permitirían estimar el riesgo de CV y aproximarnos al diagnóstico de ECV en este tipo de pacientes, es decir, podrían ser considerados marcadores de la misma.

### 1.3.2.3 Tratamiento de la calcificación vascular

Aunque se han ensayado varias terapias para prevenir o revertir la CV como las vitaminas K y D, captadores de P, calcimiméticos, tiosulfato de sodio, análogos de pirofosfato y hexafosfato de mioinositol, aún estamos lejos del objetivo. Este hecho se debe a que se desconocen aspectos de la fisiopatología de la CV.

Como se ha expuesto, la CV es el resultado de la exposición prolongada a estímulos procalcificantes que incluye principalmente la inflamación, y junto a ella, el estrés oxidativo, las toxinas urémicas entre otros. Por ello, el abordaje de la CV involucra cada uno de estos estímulos.

La AHA insiste en la prevención primaria como la principal estrategia de abordaje del daño cardiovascular y entre sus recomendaciones está el consumo de granos integrales (6). En un reciente metaanálisis se objetivó el beneficio del consumo de fibra y cereales integrales como parte de una dieta saludable que protege del daño renal (148). Se conoce desde hace algunos años que los betaglucanos ( $\beta$ glucanos), un tipo de fibra soluble compuesto por polisacáridos de glucosa, y que se encuentra principalmente en dos cereales, cebada y avena, tienen propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes lo que les confiere la capacidad de atenuar el impacto adverso de la inflamación sistémica en diversos tejidos, incluyendo la vasculatura, lo que sería de gran relevancia clínica para el control de la salud cardiovascular en la enfermedad renal. Es por ello que la EFSA y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) recomiendan el consumo de 3 g diarios de  $\beta$ glucanos (149).

Su consumo es seguro, de hecho, está presente en la dieta humana y se usan de forma cotidiana en la industria del pan para mejorar su calidad (150). No producen efectos negativos en cuanto a morbilidad, al contrario, los beneficios son múltiples como describimos a continuación.

#### 1.3.2.3.1 Betaglucanos como antiinflamatorios y antioxidantes

Sin duda, los  $\beta$ glucanos han sido el foco de atención en múltiples estudios donde se ha demostrado su efecto antiinflamatorio y antioxidante. Kao et. al demostraron que los  $\beta$ glucanos son capaces de reducir la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y esto lo consiguen mediante la inhibición de la actividad de nSMase (151). Este hecho es trascendental ya que la nSMase2 hidroliza la esfingomielina para formar ceramidas involucradas en inflamación, senescencia y apoptosis celular (152). Se sabe también que la inhibición de nSMase2 disminuye la inflamación de las células endoteliales al provocar una reducción de MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1 (50). Es decir, los  $\beta$ glucanos podrían contrarrestar el grado de inflamación crónica del enfermo renal que agrava la CV.

Su concepto como antioxidante se ha establecido tanto in vitro como en modelos animales y en humanos. En células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y en macrófagos murinos expuestos a LPS produciendo un aumento de la producción de IL-1B, IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1 y expresión del gen de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la administración de  $\beta$ glucanos redujo los niveles de dichas citoquinas y contrarrestó el estrés oxidativo (153),(154),(155). Se estudiaron también a ratas que recibieron bleomicina, un antineoplásico que actúa produciendo radicales libres fuertemente reactivos y genera de forma muy frecuente fibrosis pulmonar, los  $\beta$ glucanos evitaban dicha patología al ser administrados los días previos a la inoculación del fármaco (156).

En humanos, en cambio, se han administrado distintos tipos de  $\beta$ glucanos y dosis diferentes, para valorar su capacidad antiinflamatoria. Así, en un ensayo clínico con 44 pacientes con sobrepeso, la

mitad recibieron 477 mg diarios de  $\beta$ glucanos de levadura por vía oral (VO) durante por seis semanas y se vio la capacidad de estos para reducir  $\text{TNF}\alpha$  e IL-6 al comparar con los controles (157). En otro estudio realizado en 16 sujetos sanos que ingirieron 250 mg diarios de  $\beta$ glucanos de levadura por VO y fueron sometidos a ejercicio de resistencia, tuvieron niveles más bajos de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-8 y de MCP-1 en comparación con el placebo (158). De igual forma, Aarsæther y cols. demostraron que el consumo de 1.400 mg de  $\beta$ glucanos por VO durante los cinco días previos a la revascularización coronaria atenúa el síndrome isquemia-reperusión caracterizado por la producción de radicales libres, disfunción mitocondrial e infiltración por células inflamatorias (159),(160).

Como se mencionó anteriormente, ADAM17 es la enzima que se encarga de liberar  $\text{TNF}\alpha$  e iniciar así la cascada inflamatoria. Por otro lado, el propio estrés oxidativo induce a ADAM17 generándose así, un círculo vicioso (161). Es importante, por tanto, inhibir la activación de ADAM17 en células mieloides para disminuir la letalidad como lo demostraron Horiuchi y cols. (162).

### 1.3.2.3.2 Betaglucanos como anticalcificantes

Los  $\beta$ glucanos podrían ejercer un efecto anticalcificante al actuar a distintos niveles:

#### *a) nSMase2*

La nSMase2 participa como agravante de la inflamación, la senescencia, la aterosclerosis y de la CV propiamente dicha. Como se mencionó anteriormente, contribuye a liberar exosomas procalcificantes que intervienen en la transdiferenciación de las CMLV. Los  $\beta$ glucanos son capaces de silenciarla lo que reduciría la activación de las células endoteliales mediante Nrf2 y la respuesta inflamatoria (IL-1B, IL-6,  $\text{TNF}\alpha$ , MCP-1, iNOS) en macrófagos, que como se conoce, es un condicionante de CV (151),(50).

#### *b) Microbiota intestinal*

A nivel de la microbiota intestinal los  $\beta$ glucanos producen un cambio de proteolítico a sacarolítico con lo que se reduce el acúmulo de toxinas urémicas circulantes, principalmente p-cresol, indol y N-óxido de trimetilamina (TMAO) cuya relación con CV y eventos trombóticos es estrecha (163),(164),(165). El estímulo sacarolítico sobre la microbiota conduce a un aumento en los niveles circulantes de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), con acciones antiinflamatorias y osteoprotectoras que se describirán posteriormente.

#### *c) Metabolismo de lípidos y glucosa*

Beneficios adicionales de la ingesta de  $\beta$ glucanos están basados en sus propiedades de disminuir el colesterol LDL (c-LDL) y la glicemia, dos FRCV tradicionales que se asocian a calcificación de la íntima y contribuyen al desarrollo de aterosclerosis (166).

En el enfermo renal existe un patrón lipídico peculiar donde las moléculas de c-LDL son pequeñas y densas lo que les permite atravesar con facilidad la pared arterial y oxidarse, otorgando un perfil aterogénico (167). Se conoce que las placas ateroscleróticas de estos pacientes se caracterizan por tener tendencia a la ruptura y ser más inestables (168). La prescripción de estatinas en estos casos parece que calcifica las placas volviéndolas más estables aunque aumentan su volumen. Por esta razón se aprecia una progresión de la CV en relación con el uso de estos fármacos (169),(170),(171). Otro efecto secundario que producen frecuentemente las estatinas son las mialgias lo que en ocasiones lleva a su suspensión. Así, los  $\beta$ glucanos en dosis de 3 g diarios reducen los niveles

de colesterol total y LDL sin efectos negativos adversos y pueden reducir los ECV en varones cuyo riesgo de coronariopatía a 10 años es  $\geq 5\%$  independientemente del consumo de estatinas. Esto quiere decir que los  $\beta$ glucanos solos o sumados a estatinas, son una estrategia rentable (172).

En cuanto a la hiperglucemia, es conocido su rol como generador de estrés oxidativo, disfunción endotelial, inflamación y AGEs, y, a nivel renal, reduce los glucosaminoglicanos de la membrana basal glomerular con la consiguiente pérdida de la carga negativa, contribuyendo a la proteinuria (173). En un reciente metaanálisis se ratificó la capacidad de los  $\beta$ glucanos en reducir la respuesta glucémica cuando se añade a alimentos que contienen carbohidratos lo que recobra aún más interés en el caso de la nefropatía diabética (174).

#### 1.3.2.3.3 Betaglucanos como protectores renales y antiresortivos

Los  $\beta$ glucanos demostraron que son capaces de disminuir la morbimortalidad en ratas expuestas a LPS. El motivo es su acción antioxidante y antiinflamatoria sistémica, pero a más de ello, produjeron una mejoría hemodinámica con lo que consiguieron optimizar la función renal (155). En un modelo murino de isquemia/reperfusión renal, también se vio su papel como nefroprotectores (175),(176). En la misma línea se estudió el rol que ejercen en ratas que recibieron contraste yodado con la finalidad de inducirles nefropatía por contraste. Se vio su efecto protector al producirse menos deterioro de la función renal y presentar menos lesiones histopatológicas que el grupo control (177).

Finalmente, es de destacar que, a nivel intestinal, con la inducción de un cambio de proteolítico a sacarolítico, los  $\beta$ glucanos incrementan las bacterias productoras de AGCC (165). Los AGCC no solo son compuestos antiinflamatorios, sino que, promueven la salud ósea, principalmente el butirato y el propionato, que tienen un potencial osteoformador y regulan el metabolismo de los osteoclastos (178),(179). Los niveles de AGCC en pacientes con ERC son muy bajos, al menos tres veces menores al comparar con población general (180). Por otro lado, se ha visto que, en cocultivos de células de médula ósea y osteoblastos de ratón, los  $\beta$ glucanos reducen la resorción ósea al suprimir a RANKL y la diferenciación de osteoclastos (181). Estos hechos resultan relevantes ya que como se mencionó anteriormente, los  $\beta$ glucanos inhiben la nSMase2 y se sabe que la delección del gen que la codifica, produce osteogénesis severa y dentinogénesis imperfecta (182). Como contrapartida a un probable impacto adverso sobre el hueso por la inhibición excesiva de la nSMase2 ósea, los  $\beta$ glucanos promueven la transformación de la microbiota intestinal a una actividad sacarolítica con aumento en AGCC osteoprotectores.

Resumiendo, el importante efecto que generan los  $\beta$ glucanos como antiinflamatorios, antioxidantes, protectores del árbol vascular y del hueso, en conjunto, se evaluó en un grupo de ratas en las que se simuló un modelo de enfermedad periodontal que se conoce que genera disfunción endotelial en las arterias coronarias. La administración de  $\beta$ glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* a dosis de 50 mg/Kg por VO antes y durante la enfermedad, redujo la pérdida ósea y retrasó la disfunción endotelial al reducir IL-1B, TNF $\alpha$  e iNOS (183).

#### 1.3.2.3.4 Betaglucanos y su falta de niveles detectables en sangre

Se ha visto en animales que, una vez ingeridos los  $\beta$ glucanos por VO, alcanzan el intestino donde son capturados por los macrófagos e internalizarse en distintos tipos de células inmunes a través de varios receptores, incluyendo la Dectina-1, el receptor del complemento (CR3) y receptores tipo Toll (TLR-2/6), sin embargo, sus niveles en sangre prácticamente son indetectables (184).

En un estudio realizado por Sandvik et. al, donde se indujo shock por LPS a ratas, se administró 20 mg/Kg de  $\beta$ glucanos derivados de *Saccharomyces cerevisiae* por VO a un grupo de ellas y 2 mg/Kg por vía subcutánea (VSC) a otro, en el primer caso, apenas se detectaron niveles de  $\beta$ glucanos, sin embargo, la concentración de los niveles en sangre fue 40 veces superiores en el grupo de administración por VSC. Esto quiere decir que la vía por la que se administran es un condicionante al momento de evaluar sus niveles en sangre. Pese a ello, los  $\beta$ glucanos fueron más efectivos por vía oral en mejorar la función renal y hemodinámica, aunque las dos vías hayan tenido el mismo efecto en cuanto a la reducción de las citoquinas inflamatorias (155).

En el primer ensayo clínico fase I donde se administró  $\beta$ -1,3-D-glucano de levadura a 17 voluntarios sanos por VO a dosis de 400 mg diarios, su valor en suero se mantuvo bajo (<20 pg/ml) lo que indica que no hubo absorción sistémica detectable de los mismos, o que su rápida captación por las células diana reduce rápidamente su niveles circulantes, pero, a pesar de ello, se vio que, al quinto día, aumentó en saliva la inmunoglobulina A, lo que demuestra que pese a no ser detectables sus niveles, se ve su efecto, en este caso como inmunomodulador (185).

De igual forma, se administró por VO un batido rico en  $\beta$ glucanos equivalente a 234 mg/g de Pachyman (1,3- $\beta$ -D-glucanos) a 4 controles sanos y 10 voluntarios enfermos (por VIH y cirrosis hepática), de estos últimos, un paciente con cirrosis CHILD-C y uno con VIH sin tratamiento, tuvieron niveles por encima de 60 pg/ml en relación con traslocación intestinal; en el resto de participantes, los niveles se mantuvieron bajos (186).

En el mercado disponemos de varios métodos para cuantificar los  $\beta$ glucanos en sangre periférica. Entre ellos, el test Fungitell que consiste en un ensayo colorimétrico modificado de la ruta del lisado de amebocitos *Limulus* (LAL), tiene una sensibilidad del 65% y una especificidad del 81%. El resultado se expresa en pg/ml de suero, así, serán niveles indetectables aquellas concentraciones inferiores a 31 pg/ml según su ficha técnica. Ensayos de ELISA tienen una eficacia similar (187).

### 1.3.3 Alteraciones óseas

Como se describió previamente, la pérdida de masa y función renal, la hiperfosfatemia, la hipocalcemia, el déficit de vitamina D, la resistencia al calcitriol, la hiperplasia paratiroidea, además de las toxinas urémicas, promueven la afectación ósea en los enfermos renales. De esta manera, es de entender que el riesgo de fractura en la ERC es de 2 a 100 veces mayor al de la población general (188).

La incidencia de fracturas se triplica en HD y se duplica en DP al comparar con el trasplante renal (189). De hecho, se ha visto que las fracturas vertebrales son prevalentes hasta en la cuarta parte de pacientes en HD y un metaanálisis mostró que la HD aumenta en un 60% el riesgo de fractura de cadera al comparar con la DP (13),(190). Se conoce que el sexo femenino es un factor predictivo de fractura (191). En el estudio realizado por Naylor y cols., durante 3 años de seguimiento, se vio que hasta el 10% de mujeres y el 5% de hombres con ERC estadio 5 tuvieron al menos una fractura (192). Maravic y cols., demostraron que las mujeres en diálisis que presentan fractura de cadera son más jóvenes con respecto a la población general (191). Este hecho refuerza el concepto de que la ERC es un condicionante para desarrollar un envejecimiento temprano que incluye el esqueleto. A la fragilidad ósea observada con la edad (osteoporosis senil/postmenopáusica) se suma el efecto

de la propia ERC en cuanto a la calidad y la microestructura ósea definida como osteodistrofia renal y que algunos autores describen como osteoporosis urémica (193). Estos términos engloban:

- a) Enfermedad ósea adinámica: se presenta como un bajo remodelado óseo, con mineralización normal, hipoparatiroidismo secundario, descenso de la fosfatasa alcalina y calcemia normal.
- b) Osteítis fibrosa: es el resultado de un alto remodelado óseo con una mineralización normal, existe hiperparatiroidismo secundario y los valores de fosfatasa alcalina y calcio se mantienen normales.
- c) Osteomalacia: se aprecia un remodelado óseo y mineralización reducidos, la PTH puede estar normal o elevada, la fosfatasa alcalina alta y la calcemia normal o baja.
- d) Osteítis mixta: tiene lesiones de alto remodelado y osteomalacia.

Como se comentó previamente, existe un fenómeno paradójico de “desmineralización ósea y mineralización vascular” tanto en población general como en enfermos renales. La calcificación aórtica grave se asocia a mayor número y gravedad de fracturas (194). La fisiopatología del llamado “eje hueso-vaso” es compleja e intervienen varios factores entre los que destacan la edad, la desnutrición y la inflamación sistémica, un factor de RCV no tradicional agravado en el enfermo renal por el envejecimiento acelerado, con incremento de células senescentes que promueve un estado inflamatorio que “sincroniza” el deterioro de múltiples órganos y sistemas, condicionando el agrupamiento de diversas enfermedades degenerativas (195).

El abordaje de la ERC es integral y la mayoría de los FRCV son dianas terapéuticas. Sin embargo, el foco de atención de este estudio estará en el RCV asociado a las alteraciones del metabolismo óseo, específicamente, en la CV por ser a) un proceso acelerado que causa muerte, b) influenciado en parte por la iatrogenia, c) un factor modificable, y, d) con opciones terapéuticas escasas (196). De hecho, en la casi totalidad de necropsias de pacientes en diálisis se encuentra calcificación de las arterias coronarias (197).



## 2. OBJETIVOS



## OBJETIVOS

### Objetivo principal:

Caracterizar la contribución del grado de inflamación sistémica al daño vascular en la ERC. Identificar los mejores biomarcadores sistémicos de inflamación y envejecimiento inmunológico que estimen precozmente el grado de CV subclínica, con ellos, se conseguiría monitorizar de forma personalizada la eficacia de estrategias terapéuticas dirigidas a prevenir el desarrollo de CV o a atenuar su progresión.

### Objetivos específicos:

1º Evaluar si los niveles aórticos de  $TNF\alpha$ , ADAM17 y nSMase2 estimulan el depósito de calcio en la media arterial en un modelo animal experimental de ERC hiperfosfatémica.

2º Estimar la eficacia antiinflamatoria y anticalcificante de los  $\beta$ glucanos de cebada en un modelo animal experimental de ERC hiperfosfatémica y en humanos sin ERC.

3º Establecer la duración y cantidad necesarias de consumo de  $\beta$ glucanos de cebada para la obtención de cambios significativos en los biomarcadores que inducen CV tanto en el modelo experimental de ERC como en humanos sin ERC evaluando el grado de inflamación sistémica.

4º Determinar si cambios en poblaciones leucocitarias de pacientes con ERC-5D en DP se asocian a daño vascular y propensión a CV así como a deterioro óseo, y si pudieran ser considerados nuevos marcadores de inflamación sistémica. Específicamente se estudiaron:

1. Granulocitos de baja densidad circulantes.
2. Linfocitos CD4+CD28null senescentes.
3. Linfocitos T angiogénicos.

5º Identificar nuevas técnicas sensibles de riesgo cardiovascular en pacientes con ERC-5D en DP. Concretamente se valoró la sensibilidad y la eficacia de la medición de la neovascularización de la adventicia carotídea mediante ecografía ultrasensible sin contraste (SMI) para estimar el grado de daño vascular subclínico en el curso de la ERC

al compararlo con técnicas standard de rigidez arterial (velocidad de la onda de pulso) y propensión a aterosclerosis (SCORE).

6º Evaluar la contribución de la malnutrición a la inflamación sistémica, la rigidez arterial y la propensión a aterosclerosis y calcificación vascular en pacientes con ERC-5D en DP mediante bioimpedancia eléctrica (ángulo de fase).

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS



# MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación incluye dos estudios, el primero, realizado en un modelo animal experimental de ERC y en humanos sin ERC, en los que se investigaron un nuevo mecanismo molecular de inflamación y CV y la manera de contrarrestarlo con  $\beta$ glucanos de cebada; y, el segundo, en pacientes con ERC-5D en DP en los que se estudiaron nuevos marcadores de inflamación y CV y su correlación con parámetros clínicos que permitirían estimar el daño vascular y monitorizar el efecto de los  $\beta$ glucanos.

## 3.1 Un nuevo mecanismo de calcificación vascular y los $\beta$ glucanos de cebada como estrategia anticalcificante en un modelo animal experimental de ERC y en humanos sin ERC

### Declaración de Ética

La aprobación para el estudio en humanos se obtuvo de la Junta de Revisión Institucional (Comité de Ética en Investigación Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias -HUCA-), en cumplimiento de La Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

La aprobación para el estudio en animales se obtuvo del Comité de Ética para la Experimentación Animal en la Universidad de Lleida en cumplimiento con la legislación internacional vigente para la investigación animal. Todos los métodos en los protocolos experimentales descritos a continuación se llevaron a cabo siguiendo las regulaciones para Investigación biomédica de la Universidad de Lleida y de la Universidad de Oviedo.

### Estudio humano

Diez voluntarios (2 hombres, 8 mujeres, de 20 a 60 años), con la función renal normal, ingirieron pan de cebada diariamente durante 4 semanas. El pan fue fabricado con harina de granos de cebada seleccionados por su alto contenido de  $\beta$ -D-glucanos (8%), de tal forma que proporcionaba 3 g de  $\beta$ glucanos de cebada en 100 g de pan (producidos en el departamento de Ciencia, Alimentos y Tecnología de la Universidad de Lleida). Se extrajeron 5 ml de sangre al inicio y en las semanas 1 y 4 para obtener plasma y leucocitos circulantes (después de la lisis de glóbulos rojos). Como biomarcadores de inflamación sistémica, medimos 1) la producción mitocondrial de radicales superóxido por los leucocitos circulantes, para ello, las células obtenidas se lavaron con una

disolución amortiguadora de fosfatos (PBS), posteriormente se suspendieron en una sonda sensible a superóxido 5  $\mu$ M MitoSOXTM (Thermo-Fisher Scientific) en PBS durante 10 minutos a 37 ° C, protegidos de la luz y se lavaron dos veces con PBS; el citómetro de flujo FACS CantoTMII (Becton Dickinson Bioscience) se utilizó para medir los niveles de anión superóxido; 2) ARNm de TNF $\alpha$ , 3) ADAM17, 4) nSMase2, y, 5) el sistema cGAS/STING. Se midieron los valores de colesterol, glucemia, función renal, metabolismo óseo-mineral e inflamación sistémica. También se analizaron los niveles séricos de  $\beta$ glucanos (1, 3) mediante el uso de un reactivo (Fungitell). Sin embargo, a pesar de la ingesta diaria de 3 g de  $\beta$ glucanos, los niveles circulantes fueron no detectables aun después de un mes de ingesta. La razón por la que se eliminaron 5 de los 10 voluntarios iniciales del estudio fue la omisión de la ingesta diaria más de dos veces por semana.

### **Estudio animal**

Se alimentó a 26 ratas hembra, nefrectomizadas 5/6 (NX), Sprague-Dawley (200–225 g) durante 4 semanas con una dieta alta en fosfato (P 0.9%; Ca 0.6%; Altromin). Se les dividió en dos grupos, el primero no recibió  $\beta$ glucanos de cebada (n=13) y el segundo (n=13) recibió una dieta que contenía una dosis de 2 mg de  $\beta$ -glucanos/g de dieta, sin que la adición de la harina de cebada proveyendo los  $\beta$ glucanos resultara en cambios en el contenido de proteínas, P, carbohidratos o lípidos. El método Megazyme modificado cuantificó el contenido final de  $\beta$ -D-glucano en la dieta.

### **Estudios in vitro**

*Las acciones antiinflamatorias de  $\beta$ glucanos de cebada se examinaron en la línea celular de monocitos murinos Raw 264.7 y en las células de músculo liso vascular A7r5 proveniente de aorta de rata.*

**Protocolo 1:** Raw264.7 en reposo, obtenido por sincronizado a G0 por exposición a medio de cultivo DMEM libre de suero fetal bovino (SFB) durante 6 h, fueron tratados durante 16 horas con 5  $\mu$ g/ml de LPS de Escherichia coli 0111: B4 (L4391, Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ g/ml de  $\beta$ -D-glucanos (1–3) (1–4) de cebada (G6513, Sigma-Aldrich; 95% de pureza) o ambos.

**Protocolo 2:** las células A7r5 se expusieron a 5  $\mu$ g/ml de LPS, 100  $\mu$ g/ml de  $\beta$ -D-glucanos (1–3) (1–4) de cebada o ambos en DMEM + 1% de SFB durante 16 horas.

**Protocolo 3:** para probar los estímulos inflamatorios/calcificantes impulsados por la uremia, las células A7r5 se expusieron a suero control (proveniente de un grupo de ratas con función renal normal, alimentadas con una dieta con contenido de P normal; DMEM + suero control al 10%), o



suero urémico (proveniente de un grupo de ratas con uremia de 14 semanas, alimentadas con una dieta alta en fósforo; DMEM + 10% de suero urémico, con o sin 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ glucanos de cebada durante 16 horas).

*Las acciones anti-calcificantes de los  $\beta$ glucanos de cebada se examinaron en células A7r5 y en anillos aórticos (1–2 mm) de ratas normales.*

**Protocolo 4:** los anillos aórticos se lavaron en PBS frío y luego se colocaron en placas de 6 pocillos (8 anillos / pocillo) tratadas con fibronectina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) con los medios de cultivo que se describen a continuación. A7r5 y anillos aórticos fueron expuestos durante 4 días a un medio de cultivo no calcificante (No MC: DMEM-F12 + 0.1% BSA, Ca 1 mM, P 1 mM) o al medio calcificante (MC: DMEM-F12 + 0.1% BSA, 2 mM Ca, 3 mM P) con 0 o 100  $\mu\text{g/mL}$  de  $\beta$ glucanos de cebada. Los niveles del receptor de  $\beta$ glucanos Dectina1 en las células A7r5, fueron examinados por qPCR y los niveles intracelulares de  $\beta$ -D-glucanos (1–3) como se ha indicado para su detección en la circulación, como se especifica en el apartado de química sanguínea.

### **Bioquímica sanguínea y proteinuria**

Los parámetros bioquímicos en humanos se midieron en el Laboratorio de Medicina del HUCA utilizando el módulo Cobas 8000 (Roche Diagnostics) c702, para la mayoría de los parámetros, y Módulo e801 para inmunoensayo de PTH. Para los estudios en animales se utilizaron espectrofotometría e inmunoensayos (Cobas 8000, Roche Diagnostics) para medir los niveles séricos de Ca, P, creatinina y 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D). El kit QuantiChrom<sup>TM</sup> midió el nitrógeno de urea en sangre (BUN, BioAssay System). Se usaron kits ELISA para medir la PTH intacta en la rata (Immutopics), FGF23 (EMD Millipore), fosfatasa alcalina específica de hueso de rata (Biosource), TNF $\alpha$  de sangre y orina (Abcam plc, Cambridge, Reino Unido). El TNF $\alpha$  humano en suero se midió mediante ensayo multiplex (BiolegendPlex, Biolegend, Alemania) analizado en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) equipado con un software FACS Diva 6.5, siguiendo los protocolos de los fabricantes. Tiras reactivas para medir proteinuria (SIEMENS MULTISTICK 10SG, Analyticon Biochemistry). El kit Fungitel<sup>TM</sup> (Asociados de Cape Code, Inc) midió  $\beta$ -D-glucanos (1-3) en suero, plasma y a nivel intracelular.

### **Análisis histológicos**

Las secciones renales y aórticas de 5  $\mu\text{m}$  en parafina de rata se desparafinizaron e hidrataron. A nivel renal, ADAM17, CD45 y Klotho fueron evaluados mediante inmunohistoquímica (anti-ADAM17, anti-CD45, anti-Klotho) con EMD Millipore (#Ab19027), Abcam plc (#ab10558) y R&D

Systems (#AF1819), respectivamente. Posteriormente, tanto en riñón como en aorta, se utilizó inmunofluorescencia para ADAM17, en el primer caso, la contratinción se hizo con hematoxilina-eosina y en el segundo, con Hoechst.

### **Tinción de Von kossa**

Se incubaron secciones de aorta de rata desparafinada e hidratada en nitrato de plata al 5%. Los portaobjetos colocados en tiosulfato de sodio al 2% fueron teñidos de color rojo.

### **Mediciones totales de calcio**

Un segmento de 20 mm de la aorta abdominal de rata, proximal a la bifurcación ilíaca, primero se molió en nitrógeno líquido y luego se descalcificó con HCl 0,6 N. Las células A7r5, lavadas tres veces con PBS, fueron descalcificados con 0,6 N HCl. Las muestras se agitaron suavemente a 4 ° C durante 24 h. Tras la centrifugación, se midió calcio total en los sobrenadantes con la técnica de la O-cresolfaleína-complexona. Los sedimentos se resuspendieron en solución de NaOH 0,1 N, SDS al 0,1%, para extracción y cuantificación de proteínas (método de Lowry, Bio-Rad). Para los anillos aórticos de rata, el calcio total se midió como anteriormente se indicó, en los sedimentos celulares de extracción de ARN y se expresaron como  $\mu\text{g}$  de calcio /  $\mu\text{g}$  de ARN.

### **Actividad de esfingomielinasa2**

El kit de ensayo Amplex Red Sphingomyelinase (Molecular Probes, Invitrogen) se usó en secciones de aorta y en extractos de células enteras A7r5.

### **PCR cuantitativa**

El ARN total de tejido o células, extraído con reactivo TRI (Sigma-Aldrich), se transcribió inversamente con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Para analizar el contenido de ARN utilizamos PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con los sistemas Stratagene Mx3005P QPCR (Agilent Technologies), Fast Start Universal Probe Master (Roche), con ensayos desarrollados previamente para cada ARN (Thermo-Fisher Scientific) y cuantificación de  $\Delta\Delta\text{Ct}48$ .

### **Análisis estadístico**

Se utilizaron Pruebas T, ANOVA o Kruskal-Wallis con prueba post-hoc de Bonferroni para establecer diferencias estadísticas entre grupos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE a menos que

se indique lo contrario. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism, SPSS 17.0 para Windows o R.

### 3.2 Nuevos marcadores no invasivos de daño vascular en pacientes con enfermedad renal crónica

#### Declaración de Ética

La aprobación para el estudio se obtuvo de la Junta de Revisión Institucional (Comité de Ética Regional de Investigación Clínica, referencia PI16 / 00113), de conformidad con la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

#### Participantes

Participaron 33 pacientes con ERC en DP (ERC5-DP) que llevaran más de 6 meses en TRS, reclutados de la Unidad de Gestión Clínica de Nefrología del HUCA, Oviedo, España. Simultáneamente, un grupo de 15 voluntarios sanos de la población general fue reclutada como controles sanos. Además, 16 pacientes en HD (ERC5-HD) elegidos con los mismos criterios, y 6 controles sanos fueron reclutados independientemente como cohorte de replicación. Los criterios de exclusión fueron: tratamiento inmunosupresor en curso, enfermedad concomitante inmunomediada o diagnóstico de cáncer, proceso infeccioso reciente o actual, enfermedad cardiovascular previa, embarazo o diabetes mellitus.

La carga de los factores de riesgo CV tradicionales se evaluaron mediante el algoritmo SCORE (gráficos de bajo riesgo) de acuerdo con las guías de la ESC.

#### Pruebas de laboratorio

A todos los sujetos del estudio se les realizó extracción sanguínea y se procedió a analizar hemograma, perfil renal, lipídico, nutricional, inflamatorio y de metabolismo calcio-fósforo, en el Laboratorio de Medicina (HUCA) utilizando los métodos de rutina. Para otras pruebas, las muestras de suero se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En los pacientes en DP, se recolectó orina de 24 horas para estimar la función renal residual (FRR) definida como el promedio del aclaramiento de urea y creatinina  $((\text{CCr} + \text{CU})/2)$  en orina de 24 h)  $>1$  ml/min y diuresis  $>100$  ml/día.

El tipo de transporte peritoneal se estableció según los criterios de la Sociedad Internacional de Diálisis Peritoneal, en base al índice de creatinina diálisis/plasma (DP), en rápido (1,03-0,82), medianamente rápido (0,81-0,65), medianamente lento (0,64-0,50) y lento (0,49-0,34).

### **Análisis de poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica**

Las muestras de sangre periférica se procesaron inmediatamente y las fracciones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron mediante centrifugación (1900 rpm, 20 minutos) en gradientes de densidad (Lymphosep, Lymphocyte Separation Medium, Biowest, Alemania). Las PBMC se trataron con reactivo de bloqueo de FcR (Milteny Biotech, Alemania) durante 20 minutos a 4 °C para evitar la unión de anticuerpos inespecíficos a los receptores Fc.

#### **Granulocitos de baja densidad**

Las células se incubaron con CD14 FITC (Immunostep, España), CD15 PE-Cy7 (Milteny Biotech), CD16 APC-Cy7 (BioLegend, Alemania) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron con PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) equipado con un software FACS Diva 6.5. En primer lugar, se diseñó una 'puerta activa' que incluía todos los subconjuntos de celdas y excluía los desechos y los eventos no celulares. Los LDG fueron controlados primero por sus propiedades FSC/SSC y luego, el CD15 +se seleccionó la población (total de LDG). El porcentaje (frecuencia) de cada población se calculó y se refirió a la "puerta viva". Se analizó la expresión de Siglec8 para confirmar que los eosinófilos no estaban presentes en las células CD15 +, después de incubar con un anticuerpo Siglec8 FITC (BioLegend).

#### **Subpoblaciones linfocitarias**

Las células se incubaron con CD3 PerCP-Cy-5, 5 (Tonbo Biosciences, Bélgica), CD184 PE- Cy7 (BD Biosciences, Alemania), CD31 FITC (BD Biosciences), CD4 PE (Immunostep) y CD28 APC-Cy7 (Thermo Fischer, Alemania) o los anticuerpos del isotipo correspondiente durante 30 min a 4 °C protegidos de la luz. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo [FACS Canto II (BD Biosciences) con software FACS Diva 6.5].

La identificación de subpoblaciones celulares leucocitarias se realizó mediante la expresión de sus marcadores específicos. Los LDG inmaduros y maduros se detectaron por su fenotipo LDG CD14 CD16 CD15+y CD14lowCD16+CD15+, respectivamente, y sus valores se expresan como % de CD15+. Los linfocitos CD4+ senescentes se identificaron por su fenotipo CD4+ CD28null y sus valores se expresan como % de CD4+según el método descrito por López P y cols. (198), y, las células Tang, por su expresión CD3+CD31+CD184+ según el método descrito por Rodríguez Carrio y cols. (104).

### **Análisis de expresión génica**

El ARN total de las PBMC circulantes se extrajo usando reactivo TRI (Sigma-Aldrich). Después de la transcripción inversa utilizando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems), las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizaron por triplicado utilizando los sistemas Stratagene Mx3005P QPCR (Agilent Technologies), Fast Start Universal Probe Master (Roche) y Thermo-Fisher Scientific. La cuantificación de genes humanos DEF3 y CD10, como unidades relativas a la expresión GAPDH, se realizó comparando ciclos de umbral usando el método  $\Delta\Delta CT$ .

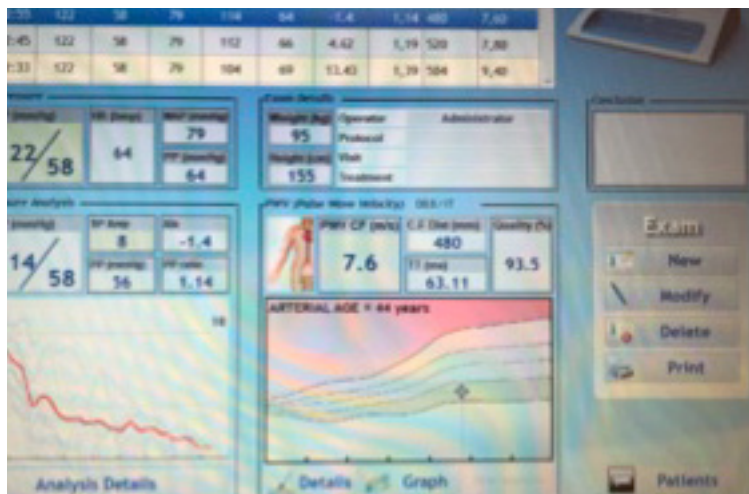
### **Cuantificación de citoquinas**

Los niveles séricos de IL-10, IL-6, IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  se midieron con un ensayo multiplex (BiolegendPlex, BioLegend), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los límites de detección fueron 1,2 pg / ml para IL-10 e IL-2 o 2,4 pg / ml para IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ .

### **Marcadores de daño vascular**

#### **Rigidez arterial**

La VOP se midió utilizando Complior Analyze (ALAM Médico) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados son el promedio de tres mediciones óptimas, *Fig. 6*.



**Fig. 6.** Medición de la velocidad de onda de pulso (VOP) de un participante del estudio.

Se pueden objetivar las tres mediciones realizadas con los datos de presión arterial (BP), frecuencia cardíaca (HR), presión arterial media (MAP), presión de pulso (PP), índice de aumento de la presión arterial central (Aix), peso (weight), talla (height), velocidad de onda de pulso (PWV), distancia carotídeo-femoral (C-F Dist), calidad de la prueba (quality %)

### Calcificación vascular

La calcificación aórtica abdominal se estableció con el IK. Se realizaron radiografías lumbares laterales y se evaluó la presencia de calcificaciones en las paredes anterior y posterior de la aorta a nivel de las vértebras L1-L4. Cada sección recibió una puntuación de 0 a 3, pudiendo sumar un máximo de 24, Fig. 7.



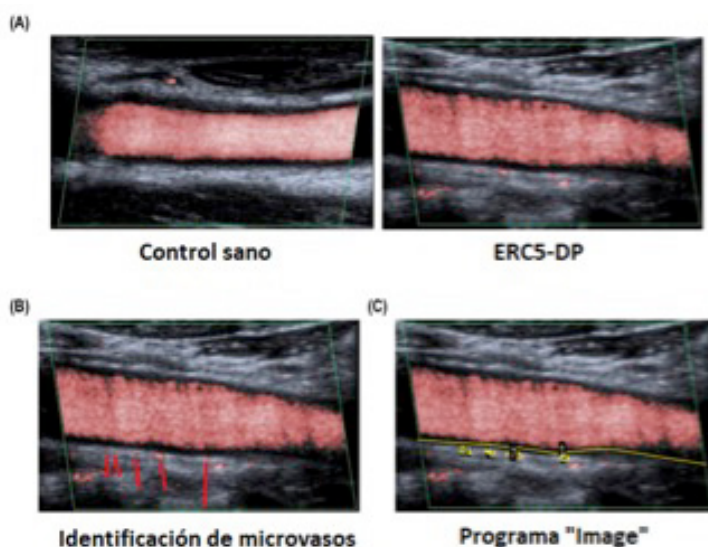
**Figura 7.** Radiografía lateral de columna lumbar.

*Se observa calcificación de la aorta abdominal correspondiente con un Índice de Kauppila (IK) de 10; además, aplastamiento GII/II de L2 y L4, acúñamiento GI en D11 y artrosis en segmento lumbar bajo. Grosor íntima-media carotídea, presencia de placas y neovascularización de la adventicia*

La exploración ecográfica fue realizada por una radióloga experimentada utilizando una máquina Toshiba-Aplio 500 (Toshiba American Medical Systems). Todos los sujetos fueron colocados en decúbito supino y se sometieron a un examen axial y luego longitudinal de las arterias carotídea y femoral izquierdas. Se eligió el lado izquierdo por el efecto de lateralización entre los que destacan factores hemodinámicos. La zona de estudio fue al menos a 1 cm de la bifurcación (entre 1 y 2 cm proximales a ambas bifurcaciones). Con el modo B, se midió en primera instancia, el grosor íntima-media en la pared posterior de la arteria carótida izquierda, a 1 cm de la bifurcación, según convenio.

En segundo lugar, se describió la presencia de placas, su localización, dimensiones, ecogenicidad y homogeneidad (estable e inestable). Finalmente, utilizando el modo Doppler Superb Microvascular Imaging (SMI) color, se evaluó el vasa vasorum adventicial (VVa) siguiendo un método similar al validado por Arcidiacono y cols. (123). Se realizó la medición del VVa con SMI, sin precisar de contraste y lo hicimos en la pared posterior (no en la anterior por las señales hiperecogénicas que

puede mostrar y que artefactarían el estudio) de la carótida y femoral común, a 1 cm proximal a la bifurcación. Se hicieron clips de cine de 10 a 15 segundos de duración y posteriormente se obtuvieron imágenes del VVa durante la diástole. Con el programa ImageJ, se identificaron los vasos patológicos, es decir, los perpendiculares a la luz arterial, cuyo origen era la adventicia y atravesaban la capa media. Una vez identificados, se cuantificaron y se calculó la densidad adventicial tomando en cuenta el área total de neovasos y la longitud de la pared arterial seleccionada que fue de 32 mm en ambas arterias (esta cifra corresponde a la longitud de la caja de volumen que aparece al pulsar el modo SMI color), *Fig. 8*. Todas las mediciones vasculares fueron realizadas por un operador que no conocía a los participantes del estudio.



**Figura 8.** Imágenes de ecografía vascular mediante “Superb Microvascular Imaging”.

(A) Se aprecia la imagen de la arteria carótida común izquierda (ACCI) de un individuo sano. (B) ACCI de un paciente con ERC. (C) Las líneas rojas señalan los neovasos patológicos de la adventicia. (D) Cuantificación de la densidad de la adventicia en el programa “Image J”



## Composición corporal

La composición corporal se evaluó mediante bioimpedancia eléctrica (BIE) multifrecuencia utilizando BCM®, Body Composition Monitor, de Fresenius Medical Care. Las mediciones se obtuvieron a una frecuencia de 50 Hz, con el paciente en decúbito supino y después del drenaje del líquido de DP. El software arrojó los datos de resistencia (R), reactancia (Xc), agua corporal total (TBW), agua intracelular (ICW), agua extracelular (ECW), ECW/TBW, litros (OH), masa de tejido magro (LTM Kg), índice de tejido magro (LTI Kg/m<sup>2</sup>), masa de tejido adiposo (ATM, Kg), índice de tejido graso (FTI Kg/m<sup>2</sup>), índice de masa corporal (BMI Kg/m<sup>2</sup>) y AF a 50 Hz. El AF  $\leq 4,5^\circ$  se ha asociado con supervivencia.

Se diagnosticó de DPE en base a los criterios de la ISRNM, a quienes cumplían al menos 3 de los indicadores y una prueba bioquímica de las siguientes: niveles séricos de albúmina inferiores a 3,8 g/dl o colesterol total < 100mg/dl; IMC inferior a 23 kg/m<sup>2</sup>; FFMI inferior a 17,0 kg/m<sup>2</sup> o 15,0 kg/m<sup>2</sup> para hombres y mujeres según los criterios de la Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo (ESPEN, por sus siglas en inglés); sobrehidratación (ECW/TBW >0,385) (199).

## Deterioro óseo

Si bien sólo la densitometría ósea permite cuantificar de forma precisa la masa ósea, se estratificó a los pacientes considerando el deterioro óseo en virtud de la presencia de osteopenia radiológica y/o los antecedentes de fractura por fragilidad. Se evaluaron las radiografías simples de columna dorsal y lumbar en proyección lateral y se definió como osteopenia a la disminución de la densidad del cuerpo vertebral del hueso esponjoso central y de las trabéculas horizontales, ya que las verticales están afectadas en osteopenias más severas, con el consiguiente remarque de las corticales (200). Las fracturas vertebrales se identificaron siguiendo los criterios de Genant. Las fracturas periféricas se constataron mediante informe médico o revisión de las radiografías, *Fig. 9*. La lectura radiográfica fue realizada por una radióloga experimentada.



**Figura 9.** Radiografía lateral de los pies.

*Se evidencia fractura de ambos huesos calcáneos y calcificación severa de las arterias tibial posterior, peronea y plantar bilateral.*

### **Análisis estadístico**

Las variables continuas se expresaron como mediana (rango intercuartílico) o media  $\pm$  estándar desviación, según la distribución de las variables. Se resumieron las variables categóricas como n (%). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante pruebas T de Student, U de Mann Withney o Kruskal-Wallis (con corrección de Dunn-Bonferroni para comparaciones múltiples), según corresponda. Las asociaciones entre variables continuas se evaluaron mediante correlaciones (prueba de rangos de Spearman) o modelos de regresión lineal, univariados o multivariados ajustados por factores de confusión, se calcularon los coeficientes B y los intervalos de confianza (IC) del 95%. Se utilizaron curvas ROC para evaluar la idoneidad de los subconjuntos de LDG como biomarcadores y áreas bajo la curva (AUC) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 1 24.0 y GraphPad Prism 8.0 para Windows.

# 4. RESULTADOS



## RESULTADOS

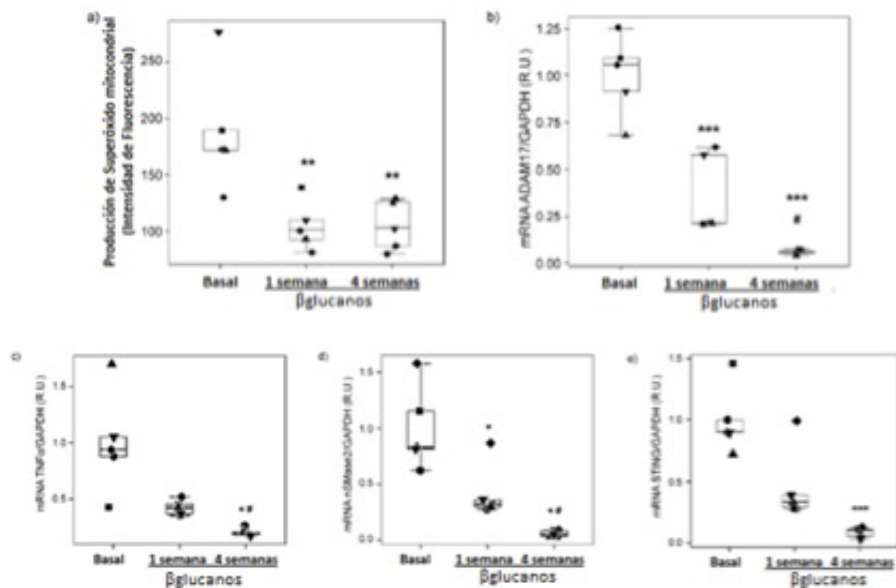
### 4.1 Un nuevo mecanismo de calcificación vascular y los $\beta$ glucanos de cebada como estrategia anticalcificante en un modelo animal experimental de ERC y en humanos sin ERC

Este estudio se desarrolló en dos partes, la primera, en humanos y la segunda, en un modelo animal de ERC.

#### Estudio humano

##### *$\beta$ glucanos como antiinflamatorios sistémicos*

Participaron 10 individuos con función renal normal quienes ingirieron diariamente pan de cebada que contenía 3 g de  $\beta$ glucanos. Se vio, que, al finalizar la primera semana, ya se había atenuado el estrés oxidativo al reducirse en un 50% la producción de superóxido mitocondrial leucocitario. De los voluntarios, 5 continuaron con la ingesta durante un mes, y se objetivó que dicha reducción se mantuvo hasta finalizar la semana 4, *Fig. 10a*. Con respecto a los marcadores inflamatorios, disminuyeron los niveles de ARNm leucocitario de ADAM17 (80% en la semana 1 y 94% en la semana 4;  $p < 0,05$ ), *Fig. 10b*, TNF $\alpha$  (64% -no significativo- en la semana 1 y 80% en la semana 4,  $p < 0,05$ ), *Fig. 10c*, y nSMase2 (58% en la semana 1 y 77% en la semana 4;  $p < 0,05$ ), *Fig. 10d*. En cuanto a las citoquinas proinflamatorias, la única que mostró una reducción significativa fue el INF $\gamma$  (en la semana 4) pese a que sus niveles circulantes se encontraban en el rango normal. Finalmente se vio que al culminar la semana 4, se redujo el ARNm de STING leucocitario en un 90% ( $p < 0,01$ ), *Fig. 10e* y a su vez, este descenso se correlaciona de forma significativa con una disminución de los niveles circulantes de INF $\gamma$ , aun dentro de los límites normales, y también con una reducción de la expresión génica de la nSMase2 de los leucocitos circulantes ( $r=0,80$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 10.** Los  $\beta$ glucanos inhiben la producción mitocondrial de superóxido y los niveles de expresión génica de ADAM17, TNF $\alpha$ , nSMase2 y de STING en leucocitos circulantes de adultos sanos.

Diagrama de cajas y bigotes que representa los cambios producidos, en cuanto al valor basal, de la producción mitocondrial de radicales superóxido (a), ADAM17 (b), TNF $\alpha$  (c), nSMase2 (d) y STING (e) en los monocitos de sangre periférica de 5 adultos sanos que ingirieron 3 g de  $\beta$ glucanos diariamente durante 4 semanas. \* $p<0,05$  y \*\* $p<0,01$  vs basal, # $p<0,05$  vs 1 semana.

## Estudio animal

### $\beta$ glucanos como antiinflamatorios renales

Se utilizó un total de 26 ratas con ERC a las que se les alimentó con una dieta rica en fósforo. 13 de ellas recibieron a la vez, 2 mg de  $\beta$ glucanos por gramo de dieta, que, con una ingesta media de 20 g diarios, eleva la ingesta de  $\beta$ glucanos a 40 mg diarios.

Se vio en primera instancia que no hubo modificaciones en cuanto al consumo diario de alimentos (20 g / día) o en el peso corporal (ERC:  $234 \pm 13$  g a  $248 \pm 23$  g; ERC +  $\beta$ glucanos:  $237 \pm 9$  g a  $255 \pm 18$  g).

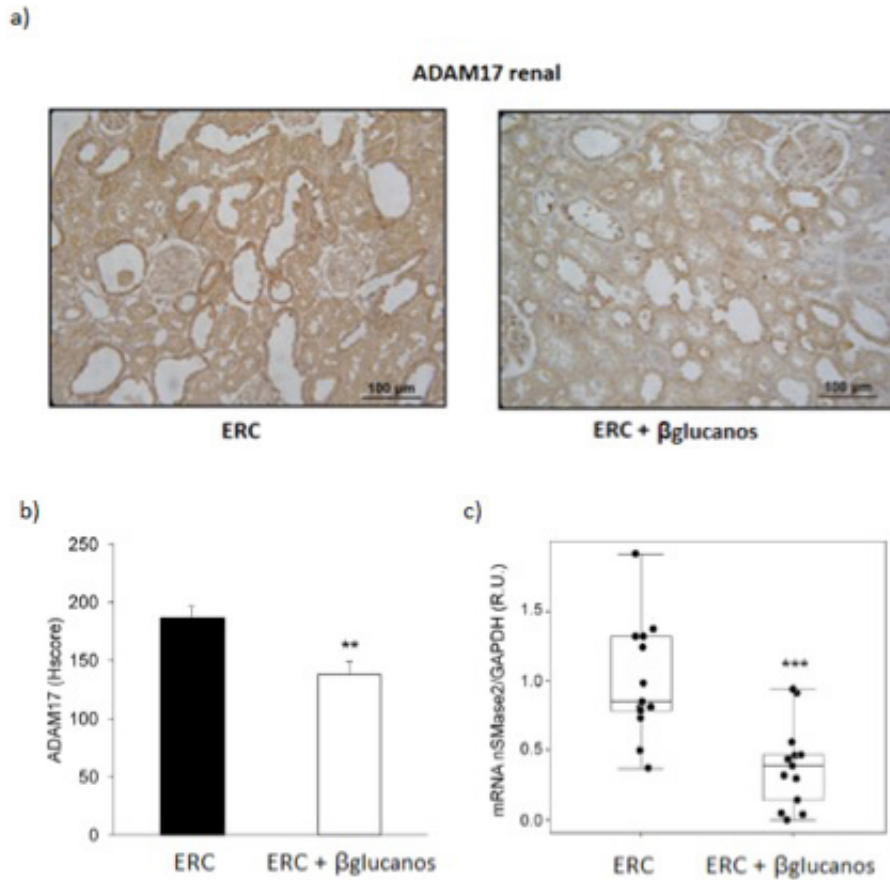
En segundo lugar, el grupo que recibió  $\beta$ glucanos mostró una mejor función renal determinada por las cifras de creatinina sérica, BUN, proteinuria y klotho renal. Los parámetros de metabolismo óseo-mineral (calcio, fósforo, PTH, 25-hidroxivitamina D, FGF23, fosfatasa alcalina ósea y fosfaturia) no se modificaron con la ingesta de  $\beta$ glucanos, *tabla 4*.

	ERC (n = 13)	ERC + $\beta$ glucanos (n = 13)	P
<b>Parámetros de función renal</b>			
Creatinina sérica	1,0 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	<b>0,03</b>
BUN (mg/dL)	52,9 $\pm$ 9,6	44,3 $\pm$ 7,2	<b>0,02</b>
Proteinuria (mg/24 horas)	101,1 $\pm$ 80,0	21,4 $\pm$ 32,1	<b>0,04</b>
$\alpha$ -Klotho (IOD/Area)	1477,2 $\pm$ 459,7	3197,0 $\pm$ 1839,4	<b>0,02</b>
<b>Parámetros de metabolismo óseo-mineral</b>			
Calcio (mg/dL)	9,8 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 0,8	0,19
Fósforo (mg/dL)	8,1 $\pm$ 2,6	7,7 $\pm$ 2,2	0,66
PTH (pg/mL)	3107 $\pm$ 2152	2044 $\pm$ 1127	0,14
25-hidroxivitamina D (ng/mL)	29,4 $\pm$ 8,7	27,9 $\pm$ 6,5	0,63
FGF23 (ng/mL)	10,9 $\pm$ 5,6	12,5 $\pm$ 6,5	0,58
Fosfatasa alcalina ósea (U/mL)	42,1 (33,3–70,2)	28,1 (16,9–74,0)	0,28
Fosfaturia (nmol/24 horas)	1,9 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,6	0,15

**Tabla 4.** Marcadores de función renal y metabolismo óseo-mineral en ratas con ERC que recibieron o no,  $\beta$ glucanos.

Las variables se expresan como media  $\pm$  SD o mediana (rango intercuartil).

En tercer lugar, con el análisis histológico de los riñones, se pudo objetivar que en el grupo que consumió  $\beta$ glucanos hubo menos infiltración de macrófagos (2,2  $\pm$  2,4 vs. 1,0  $\pm$  0,7, p=0,04), y una disminución de ADAM17 y ARNm de nSMase2, *Fig.11*. Los niveles séricos y urinarios de TNF $\alpha$  fueron indetectables en ambos grupos dietéticos.



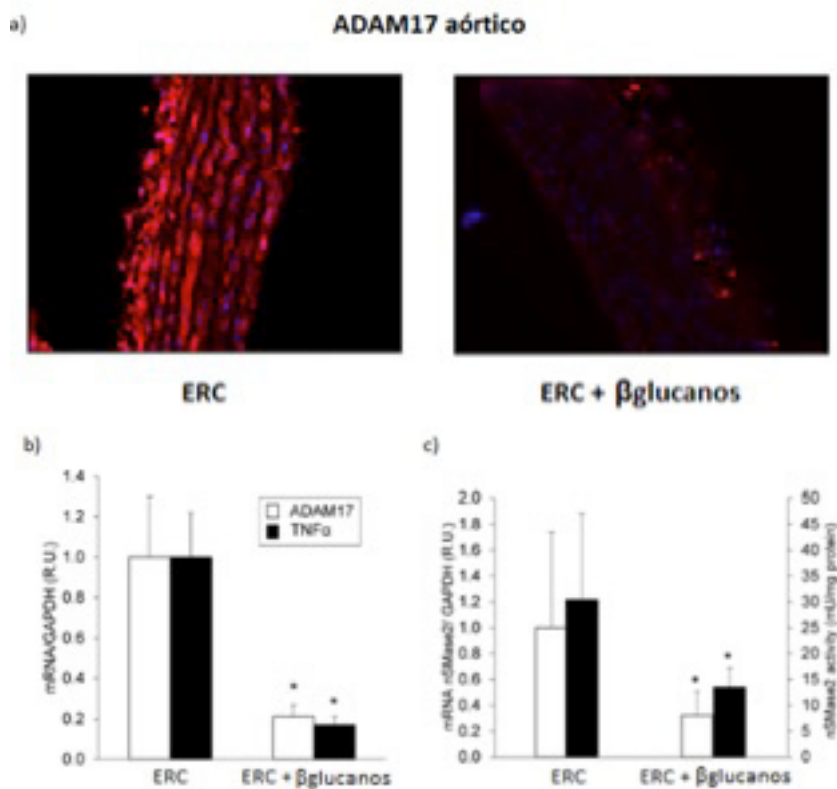
**Figura 11.** Renoprotección ejercida por βglucanos en ratas con ERC hiperfosfatémica.

a) Biopsia renal donde se observan imágenes de inmunohistoquímica de ADAM17 en ratas nefrectomizadas 5/6 que recibieron dieta rica en fósforo con o sin βglucanos/g (ERC n=13, ERC + βglucanos n=13) durante 4 semanas; (b) Cuantificación de inmunotinción por histoscore y se representa mediante barras que indican la media ± SD; c) Diagrama de cajas y bigotes que muestran la expresión génica de nSMase2 en los riñones descritos. \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs. ERC.

### βglucanos como antiinflamatorios vasculares

A nivel aórtico, se vio, que las ratas que consumieron βglucanos tuvieron una reducción del 47% en la expresión de ADAM17, *Fig. 12a*, y un 80% menos de TNFα; con respecto al nSMase2 se vio un descenso de un 65% de los niveles de ARNm y de un 55% de su actividad, al comparar con el grupo de ERC, *Fig. 12c*. Cabe indicar que los niveles de ARNm de TNFα se correlacionaron directamente con ARNm de ADAM17 ( $r=0,81$ ;  $p<0,001$ ) y también con niveles y actividad de ARNm de nSMase2 ( $r=0,89$ ;  $p<0,001$  y  $r=0,81$ ;  $p<0,01$ , respectivamente), *Fig. 12b*.





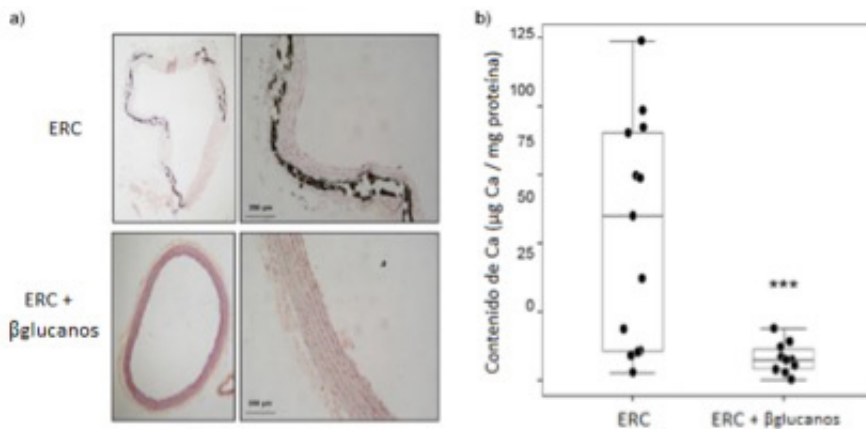
**Figura 12.** Protección vascular efectuada por  $\beta$ glucanos.

a) Corte histológico de la aorta donde se observan imágenes de inmunohistoquímica de ADAM17 en ratas con nefrectomía de 5/6 que recibieron dieta rica en fósforo con o sin  $\beta$ glucanos/g (ERC n=13, ERC +  $\beta$ glucanos n=13) durante 4 semanas; (b) Cuantificación de inmunotinción de ADAM17 aórtico y expresión génica de TNF $\alpha$ , mediante histoscore y se representa mediante barras que indican la media  $\pm$  SD; c) nSMase2 aórtica, las cajas blancas muestran la expresión génica (ERC n = 9; ERC +  $\beta$ glucanos n = 7) y las cajas negras, la actividad enzimática (ERC n = 13; ERC +  $\beta$ glucanos N = 11). \* $p < 0,05$  vs. ERC.

### $\beta$ glucanos como antagonistas de la calcificación vascular

El 36% de las aortas de las ratas urémicas que no consumieron  $\beta$ glucanos presentaron marcadores histológicos de calcificación vascular al teñirse de forma positiva con la prueba de Von Kossa, mientras que todas las aortas del grupo de ERC +  $\beta$ glucanos presentaron tinción de Von Kossa negativa, **Fig. 13a**. La mediana del calcio total aórtico fue 8 veces menor en el grupo de ERC +  $\beta$ glucanos (7,5  $\mu$ g Ca/mg proteína) en comparación con los controles urémicos (60  $\mu$ g Ca/mg proteína), **Fig. 13b**. El aumento en contenido total de calcio aórtico fue paralelo a los aumentos de actividad de la nSMase2 ( $r=0,60$ ;  $p < 0,01$ ).

En cuanto a los marcadores de diferenciación osteogénica, el grupo de ERC mostró elevación, a nivel aórtico, de los ARNm de Runx2 y Osterix, y, disminución de  $\alpha$ -actina que no alcanzaron significado estadístico.



**Figura 13.** Acción anticalcificante ejercida por  $\beta$ glucanos.

(a) Representación de los depósitos de calcio, teñidos con Von Kossa (tinción negra), en los anillos aórticos torácicos de ratas nefrectomizadas 5/6 NX y alimentadas con una dieta rica en fósforo y adición o no de 2 mg de  $\beta$ glucanos/g dieta durante 4 semanas. (b) Diagrama de cajas y bigotes que muestran los cambios mencionados. \* $p < 0,05$  vs. ERC

### **$\beta$ glucanos como antiinflamatorios y anticalcificantes por acción directa sobre CMLV**

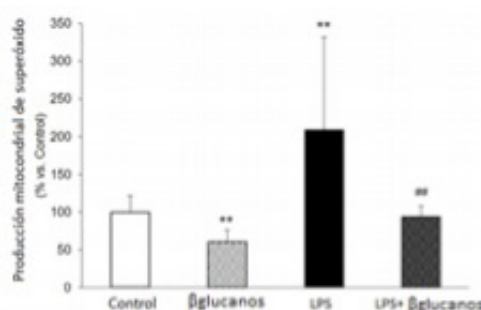
Este estudio se realizó in vitro, siguiendo cuatro protocolos.

#### a) Protocolo 1

Se procedió a identificar la dosis de  $\beta$ glucanos capaz de contrarrestar la inflamación.

Para ello, se generó un modelo de inflamación severa al exponer a monocitos Raw 264.7 durante 16 horas, a 5  $\mu$ g/mL de lipopolisáridos (LPS) de E. Coli, produciéndose un incremento en 2 veces de superóxido mitocondrial. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ g/ml de  $\beta$ glucanos y con ello, se constató una reducción de la producción de radicales superóxido en un 50%. Lo propio se evidenció en monocitos no estimulados con LPS lo que quiere decir que los  $\beta$ glucanos son capaces de

reducir el estrés oxidativo aún en monocitos normales, Fig. 14. Este hecho coincide con el 50% de disminución en la producción mitocondrial de radicales superóxido observado en los leucocitos de los individuos sanos que ingirieron 3 g diarios de  $\beta$ glucanos de cebada.



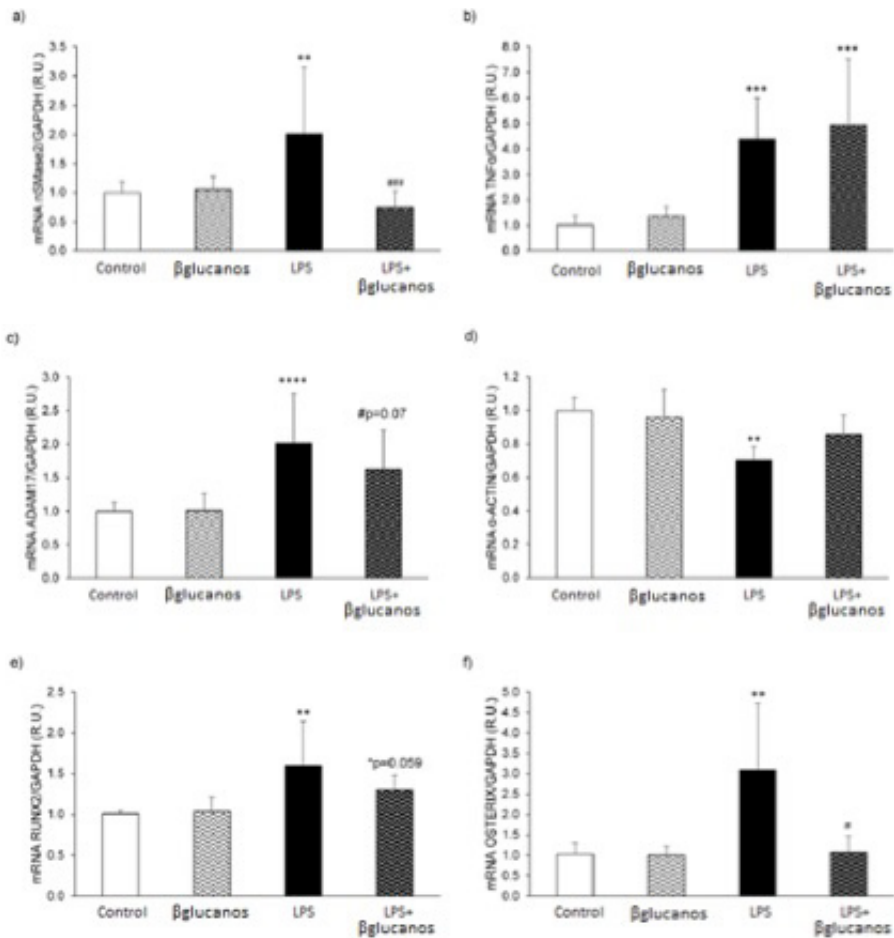
**Figura 14.** Propiedades antioxidantes de los  $\beta$ glucanos en células inmunes.

Producción mitocondrial de radicales superóxido (expresada como porcentaje de las condiciones de referencia) por células 264.7 expuestas durante 16 horas al medio de control (control), 100  $\mu$ g / ml de  $\beta$ glucanos ( $\beta$ glucanos), 5  $\mu$ g / mL LPS (LPS) o la combinación (LPS+ $\beta$ glucanos). Diagrama de barras que indican la media  $\pm$  SD de tres experimentos desarrollados, cada uno realizado por triplicado. \*\* $p < 0,01$  vs. Control; # $p < 0,01$  vs. LPS

#### a) Protocolo 2

Se identificaron los cambios en el fenotipo de las CMLV propulsadas por la acción inflamatoria de LPS.

Se hicieron tres experimentos. El primero, consistió en exponer a células A7r5 a 100  $\mu$ g / ml de  $\beta$ glucanos durante 16 horas, no se vio ningún efecto en cuanto a la expresión de nSMase2, TNF $\alpha$  o ADAM17. En el segundo, dichas células fueron expuestas a LPS durante 16 horas, tras lo cual, se produjo un aumento significativo de los tres marcadores mencionados, Fig. 15a,b,c, y de dos marcadores osteogénicos, como son el gen Runx2 y Osterix, Fig. 15e,f, lo contrario sucedió con los niveles de  $\alpha$ -actina. Fig. 9d, un marcador del fenotipo contráctil. Finalmente fueron expuestas a una combinación de LPS con 100  $\mu$ g/ml de  $\beta$ glucanos y lo que se objetivó fue que los  $\beta$ glucanos evitaron que los LPS incrementen la expresión del gen nSMase2 manteniendo el ARNm de nSMase2 al mismo nivel que el grupo de control, no consiguió contrarrestar la inducción de TNF $\alpha$  por LPS, y, redujo marginalmente, la expresión del gen ADAM17 inducida por LPS.



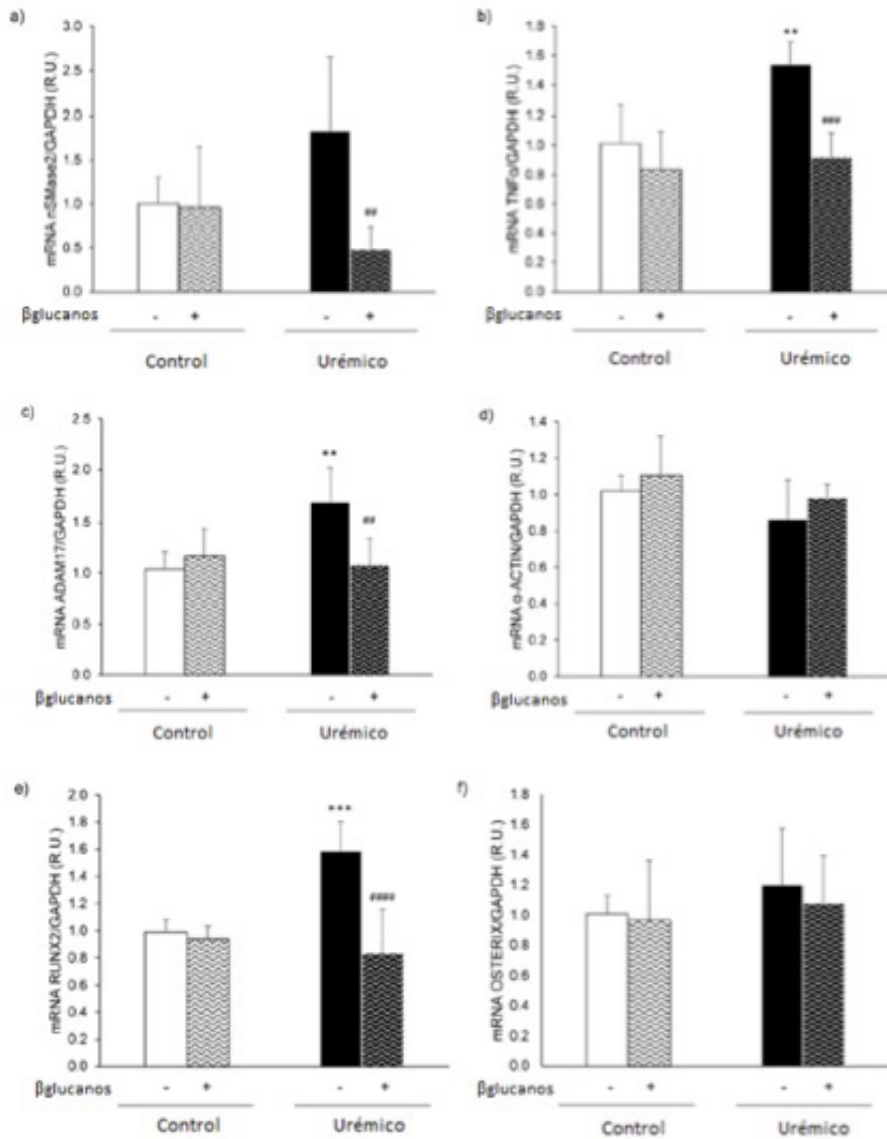
**Figura 15.**  $\beta$ glucanos atenúan la inflamación de las CMLV y la diferenciación osteogénica inducida por LPS.

Expresión genética de nSMase2 (a), TNF $\alpha$  (b), ADAM17 (c),  $\alpha$ -actina (d), Runx2 (e) y Osterix (f) en células A7r5 expuestas al medio de control (Control), 100  $\mu$ g/mL de  $\beta$ glucanos ( $\beta$ -gl), 5  $\mu$ g/mL de LPS (LPS) o la combinación de 100  $\mu$ g/mL de  $\beta$ glucanos y 5  $\mu$ g / mL de LPS (LPS +  $\beta$ gl) durante 16 horas. Diagrama de barras que indican la media  $\pm$  SD de tres experimentos desarrollados, cada uno realizado por triplicado. R.U.: unidades relativas. \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Control, # $p < 0,05$  y ###  $p < 0,001$

### a) Protocolo 3

Se identificaron los cambios en el fenotipo de las CMLV propulsadas por la acción inflamatoria de la uremia.

Células A7r5 fueron expuestas durante 16 horas a suero urémico de ratas hiperfosfatémicas, tras lo cual hubo un incremento significativo de  $TNF\alpha$  y ADAM17, Fig. 16b,c, y, no significativo en la expresión génica de nSMase2 pese a que se duplicó su valor inicial, Fig. 16a. Con respecto a los marcadores osteogénicos, solamente aumentaron los niveles de Runx2, Fig. 16e. Sin embargo, al añadir  $\beta$ glucanos, esos aumentos fueron atenuados. Solamente actina y Osterix no se modificaron con el suero urémico y los  $\beta$ glucanos tampoco produjeron cambios. La exposición de las células a suero normal y  $\beta$ glucanos, no mostró cambios en  $\alpha$ -actina, Runx2 y Osterix.



**Figura 16.** βglucanos atenúan la inflamación y la diferenciación osteogénica de las CMLV inducidas por la uremia.

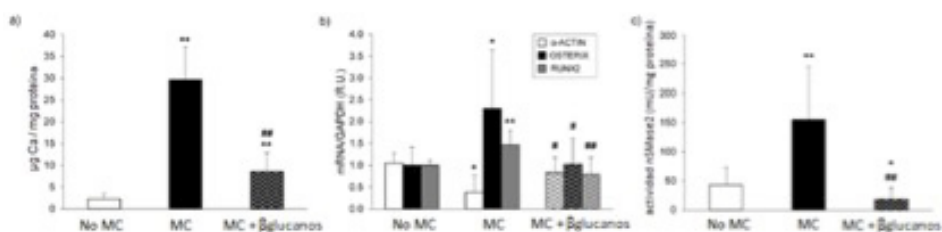
Expresión génica de nSMase2 (a), TNFα (b), ADAM17 (c), α-actina (d), Runx2 (e) y Osterix (f) en células A7r5 expuestas a suero de ratas con función renal normal (Control), con o sin 100 μg/mL de βglucanos (β-gl), o expuestas a suero de ratas que fueron alimentadas durante 14 semanas con dieta rica en fósforo (Urémica) con o sin 100 μg/mL de βglucanos por 16 horas. Diagrama de barras que indican la media ± SD de tres experimentos desarrollados, cada uno realizado por triplicado. R.U.: unidades relativas. \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs. Control, ##p<0,01, ###p<0,001 y ###p<0,001 vs. urémico

## a) Protocolo 4

Se identificó la acción directa anticalcificante y anti-nSMase2 por parte de los  $\beta$ glucanos.

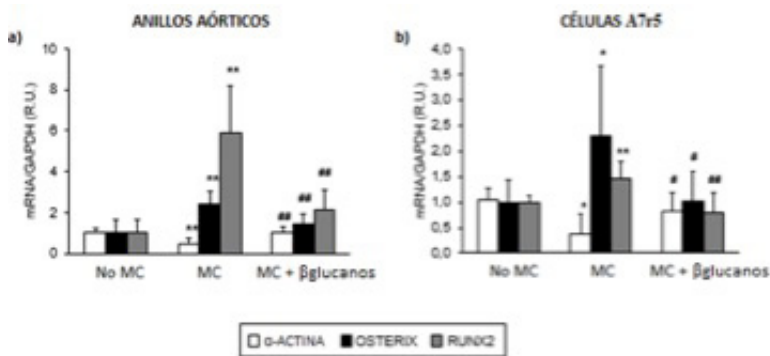
Células A7r5 fueron expuestas durante 4 días, a un medio calcificante (MC), lo que produjo un aumento de los depósitos de calcio en 13 veces, Fig. 17a. Al añadir  $\beta$ glucanos, se contrarrestó en un 72% dicho fenómeno y se evitó que se incrementen los niveles de Osterix y Runx2 y que disminuyan los de  $\alpha$ -actina, Fig. 17b. Hallazgos similares se vieron al realizar un experimento ex vivo donde se cultivaron anillos aórticos de ratas normales a las que se les expuso a MC y MC+ $\beta$ glucanos en las condiciones explicitadas para los experimentos in vitro, Fig. 18.

En cuanto a nSMase2, la exposición a dicho medio aumentó 3 veces su actividad, lo que resultó prevenible al agregar 100  $\mu$ g/ml de  $\beta$ glucanos al medio calcificante, Fig. 17c.



**Figura 17.**  $\beta$ glucanos atenúan los depósitos de calcio al inhibir la diferenciación osteogénica de las CMLV y actividad de nSMase2 en células A7r5.

(a) Depósitos de calcio en las células A7r5 expuestas a un medio no calcificante (No MC: 1 mM Ca; 1 mM P) o medio calcificante (MC: 2 mM Ca; 3 mM P) con 0 o 100  $\mu$ g/mL de  $\beta$ glucanos (MC +  $\beta$ gl) durante 4 días. (b) Expresión génica de  $\alpha$ -actina (barras blancas), Osterix (barras negras) y Runx2 (barras grises) en células A7r5 expuestas a los medios descritos. (c) Actividad de nSMase2 en células A7r5 expuestas a los medios descritos. Diagrama de barras que indican la media  $\pm$  SD de tres experimentos desarrollados, cada uno realizado por triplicado. R.U.: unidades relativas. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. No MC, # $p < 0,05$  y ## $p < 0,01$  vs. MC



**Figura 18.** Replicación de la acción de βglucanos en la inhibición de la diferenciación osteogénica de las CMLV y actividad de nSMase2 en anillos aórticos de ratas sanas.

(a) Anillos aórticos de rata sana expuestos a un medio no calcificante (No MC: 1 mM Ca; 1 mM P) o medio calcificante (MC: 2 mM Ca; 3 mM P) con 0 or 100 μg/mL de βglucanos (MC + β-Gl) durante 4 días. Se muestra la expresión génica de α-actina (barras blancas), Osterix (barras negras) and Runx2 (barras grises). (b) Células A7r5 expuestas a los medios descritos durante el mismo tiempo. Se muestra la expresión génica de los marcadores osteogénicos de la misma manera mencionada. Diagrama de barras que indican la media ± SD de tres experimentos desarrollados, cada uno realizado por triplicado. R.U.: unidades relativas. \*p<0,05 y \*\*p<0,01 vs. No MC, #p<0,05 y ##p<0,01 vs. MC

Se sabe que uno de los receptores de los βglucanos es la Dectina-1, sin embargo, sus niveles de ARNm fueron indetectables en las CMLV. A pesar de la falta de Dectina-1 en la membrana celular los niveles de βglucanos dentro de las células se incrementaron significativamente lo que indica que los βglucanos se internalizaron por un mecanismo que no involucra a este receptor y que nos permite plantear la hipótesis de que la disminución de la calcificación podría deberse a un fenómeno de autofagia, como demuestran estudios preliminares de aumentos en el flujo autofágico en CMLV expuestas a condiciones calcificantes y que se acompañan de una reducción del depósito de calcio.



## 4.2 Nuevos marcadores no invasivos de daño vascular en pacientes con enfermedad renal crónica

### Características de los participantes

Los pacientes tenían una edad media de 55 años, el 69% eran hombres. El índice de Charlson medio fue de  $5 \pm 2$ . Las causas de ERC fueron glomerulonefritis (34%), no filiada (25%), vascular (13%), poliquistosis hepatorrenal (13%), intersticial (9%) y otras (6%). El tiempo medio en DP fue de 15 meses. El 62% de los pacientes fueron tratados con DPA y el 38%, con DPCA con función renal residual en el 75% de los casos. El 52% tenían un transporte peritoneal rápido, el 35%, medianamente rápido y el 13%, medianamente lento. El 68% de los pacientes cumplieron con criterios de DPE. El 54.5% tenían CV con un IK medio de 8. Aproximadamente la mitad tomaba análogos de la vitamina D activa, captores de fósforo y estatinas, cerca del 75% recibían eritropoyetina y el 25%, corticoides. Los pacientes tenían niveles más bajos de albúmina y datos de hiperparatiroidismo secundario con hiperfosfatemia, hipocalcemia y déficit severo de vitamina D (niveles de 25-hidroxivitamina D inferiores a 10 ng/ml), *tabla 5*.

	Controles sanos (n = 15)	Pacientes con ERC 5-DP (n = 33)	p
Edad (años)	48 (22–68)	55 (21–77)	0,07
Sexo (f/m)	10/5	13/20	0,08
<b>Características clínicas</b>			
Albumina, mg/dl	44 ± 2	34 ± 4	<0,001
Urea, mg/dl	33,46 ± 8,08	132,66 ± 43,76	<0,001
Creatinina, mg/dl	0,78 ± 0,17	7,81 ± 2,72	<0,001
Calcio plasmático, mmol/l	2,34 ± 0,07	2,17 ± 0,16	<0,001
Fósforo plasmático, mmol/l	1,04 ± 0,18	1,64 ± 0,42	<0,001
PTH, pg/ml	49 ± 15	371 ± 198	<0,001
25-hidroxivitamina D, ng/ml	32,9 ± 15,4	10,1 ± 6,9	<0,001
Colesterol total, mg/dl	202,25±49,20	159,32±40,28	0,005
Colesterol HDL, mg/dl	67,63±13,14	59,00±24,52	0,017
Colesterol LDL, mg/dl	113,00±38,38	74,71±38,56	0,002
Triglicéridos, mg/dl	65,53±25,54	131,82±75,33	0,003
Troponina T, ng/l	5,33±3,45	61,48±41,82	<0,001
PCR, mg/dl	0,14±0,07	0,64 ± 0,86	0,002
Calcificación vascular, n(%)		18 (54,5)	
IK		8 ± 9	
VOP		9±2	
Tiempo en diálisis, meses		15 (16)	
Función renal residual, sí/no		24/9	
Presión arterial sistólica, mmHg		133,88±16,04	
Presión arterial diastólica, mmHg		81,05±10,70	
<b>Tratamiento, n (%)</b>			
Paricalcitol		15 (45,4)	
Captore de fósforo		18 (54,5)	
Estatinas		21 (63,6)	
Metilprednisona		9 (27,22)	
Eritropoyetina		24 (72,7)	
<b>Citoquinas séricas, pg/ml</b>			
IL-2	1,30 (1,91)	1,60 (0,70)	0,34
IL-6	4,73 (4,58)	6,77 (10,07)	0,15
IL-10	1,49 (0,80)	1,77 (1,05)	0,10
IFN $\gamma$	8,32 (6,80)	12,82 (6,57)	0,18
TNF $\alpha$	8,38 (7,66)	14,01 (6,38)	0,21

**Tabla 5.** Características demográficas, clínicas e inmunológicas de los participantes del estudio.

Las variables se expresan como media ± SD o mediana (rango intercuartil).

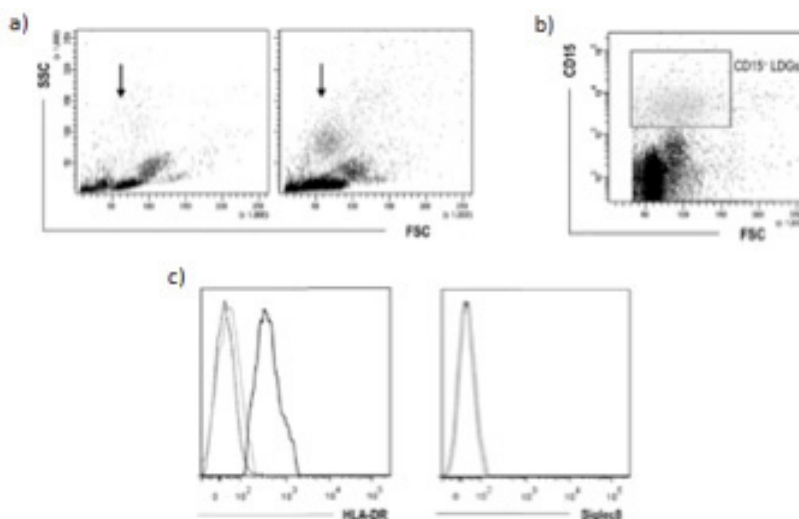
## Granulocitos de baja densidad

### Expansión de LDG en pacientes con ERC

Los LDG fueron obtenidos de la fracción de PBMC y separados de los monocitos y linfocitos. Se procedió a identificarlos en base a cuatro características:

- 1) Señal de dispersión directa baja y dispersión lateral alta, es decir, se trata de células grandes y densas, *Fig. 19 a*.
- 2) Marcador de linaje CD15, *Fig. 19 b*.
- 3) Ausencia de la expresión del antígeno leucocitario humano clase II (HLA-DR), marcador de monocitos, *Fig. 19 c*.
- 4) Ausencia de la expresión de Siglec8, marcador de eosinófilos, *Fig. 19 c*.

Se vio que los pacientes exhibieron una mayor frecuencia de LDG que los controles.

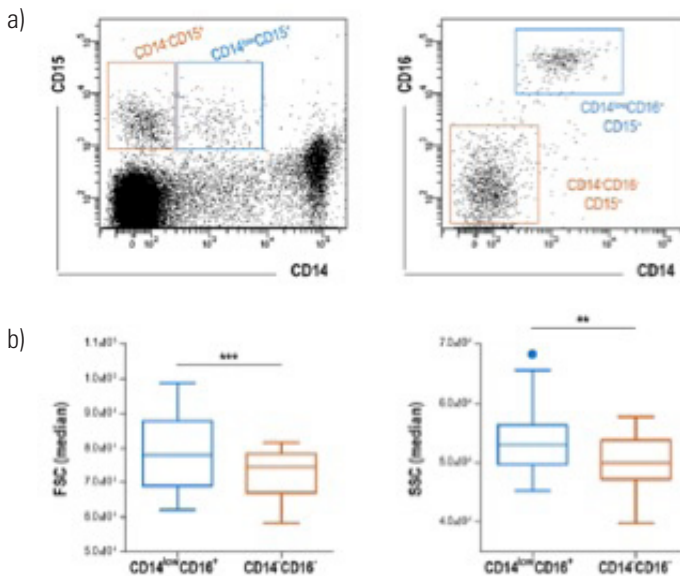


**Figura 19.** Identificación y cuantificación de LDG.

Imágenes de citometría de flujo. a) Patrón FSC/SSC de la subpoblación de LDG en un control sano (izquierda) y en un paciente (derecha), identificados con flechas. b) Se aprecian los LDG con el marcador CD15. c) Histogramas donde se visualiza la expresión HLA-DR (control de isotipo: línea negra punteada, población CD15+: línea gris, monocitos: línea negra) y Siglec8 (control de isotipo: línea negra punteada, población CD15+: línea gris, monocitos: línea negra)

### Subpoblaciones de LDG

Tras identificar los LDG, se analizaron en ellos dos marcadores de linaje: CD16 y CD14, que permitieron describir por primera vez dos subpoblaciones de LDG: CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> y CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>, con patrones FSC/SSC diferentes, Fig. 20 a y b.



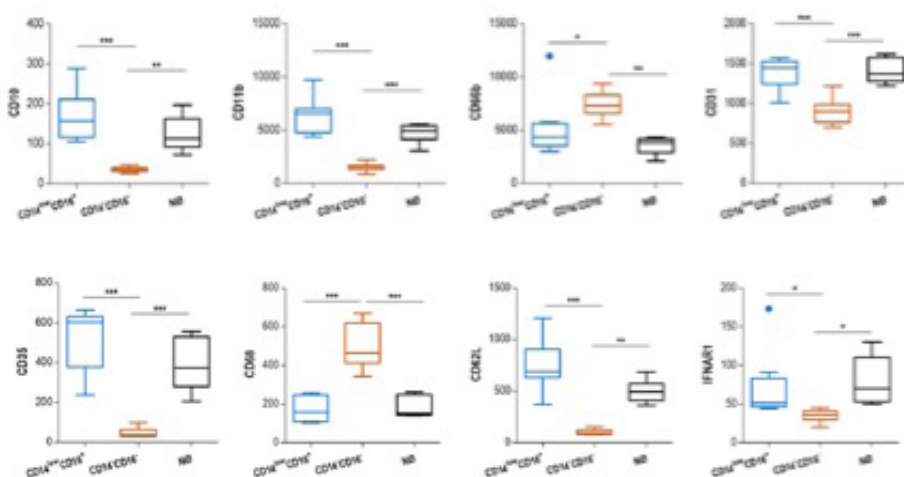
**Figura 20.** Identificación de subpoblaciones de LDG.

a) Diagrama de puntos. En el total de células CD15<sup>+</sup>, se aislaron dos subconjuntos de LDG en base a la expresión de CD14 y CD16, CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> y CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>. b) Diagrama de cajas y bigotes que representa el patrón FSC/SSC de las dos nuevas subpoblaciones de LDG, CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> y CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>. Las cajas están delimitadas por el cuartil 1 y 3. Las líneas dentro de las cajas indican la mediana. Las líneas que salen de las cajas representan los valores mínimo y máximo. Las diferencias se evaluaron mediante pruebas U de Mann-Whitney o pruebas apareadas (Wilcoxon). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### Heterogeneidad de LDG en ERC

Posteriormente se analizaron, en cada subpoblación, los marcadores de maduración CD10, CD11b, CD31, CD35, CD62L, CD66b, CD68 e IFNAR1 en las dos subpoblaciones lo que permite interpretar

que CD14-CD16-CD15+ es un conjunto más inmaduro, mientras que CD14<sup>low</sup>CD16+CD15+ expresa mayor cantidad de marcadores de granulocitos maduros, *Fig. 21*.



**Figura 21.** Expresión de marcadores de granulocitos.

Diagrama de cajas y bigotes cuantificando biomarcadores de maduración en ambos subtipos de LDG, CD14-CD16-CD15+ (naranja), CD14<sup>low</sup>CD16+CD15+ (azul) y en neutrófilos maduros (negro). Las diferencias se evaluaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn-Bonferroni para la prueba de comparaciones múltiples

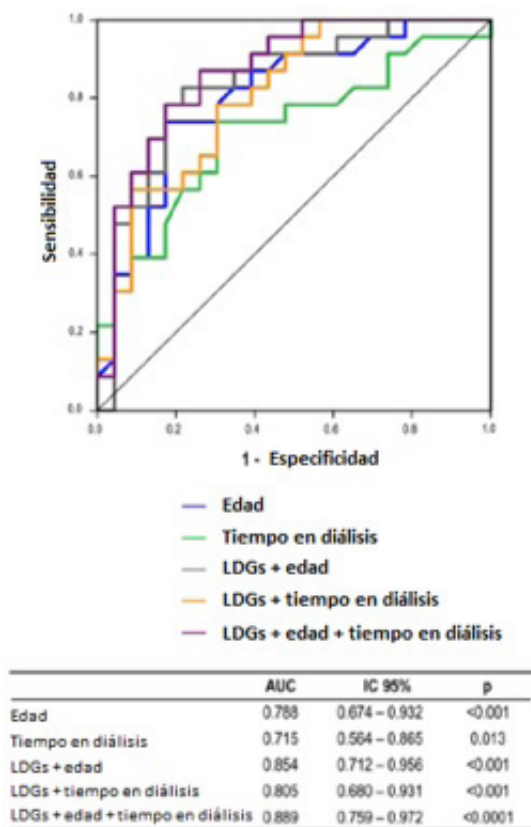
Como se mencionó anteriormente, los pacientes expresaron más LDG que los controles, sin embargo, se vio que fue a expensas de la subpoblación CD14-CD16-CD15+ ( $24,59 \pm 19,50$  vs.  $12,21 \pm 10,12$ ,  $p=0,01$ ). A los 6 meses se realizó un nuevo análisis sanguíneo en 8 pacientes elegidos al azar y se evidenció que esta distribución se mantuvo. Esto nos indica que el paciente con ERC presenta una expansión persistente de LDG y, entre ellos, la subpoblación que predomina es el conjunto inmaduro, CD14-CD16-CD15+.

#### **Subpoblación CD14-CD16-CD15+ como marcador de calcificación vascular**

Se objetivó que ninguno de estos subconjuntos de LDG estaban relacionados con la edad, el tiempo de diálisis, la función renal residual, los medicamentos o las citoquinas circulantes (todos  $p > 0,05$ ), tampoco con los recuentos absolutos de neutrófilos (todos  $p > 0,05$ ), pero sí guardaron relación con

el grado de CV de los pacientes. Específicamente, encontramos que la subpoblación CD14-CD16-CD15+ se asoció con la VOP ( $r=0,50$   $p=0,01$ ) y con IK  $>5$  pero no con aquellos sin CV ( $1,29 \pm 1,09$  vs.  $0,41 \pm 0,33$ ,  $p=0,01$ ). Esto no ocurrió con CD14lowCD16+CD15+ ( $p=0,25$  y  $p=0,15$ , respectivamente). En vista de esta importante asociación, se realizó un análisis de regresión logística múltiple que concluyó que los CD14-CD16-CD15+ son predictores independientes de CV (OR [IC 95%],  $p$ : 1,11 [1,01–9,17],  $p=0,02$ ) después de ajustar por edad, género y tiempo en diálisis.

Lo propio se evidenció al realizar curvas ROC, con un AUC [IC 95%] que fue de 0,77 [0,61, 0,92] ( $p=0,01$ ) para la cohorte de ERC-DP, lo que se confirmó en ERC5-HD (0,80 [0,62, 0,98],  $p=0,01$ ). Se vio también que no solo actúa como un factor independiente para CV sino que potenció la capacidad predictiva para CV de la edad y el tiempo en diálisis, *Fig. 22*.



**Figura 22.** Predicción de LDG en calcificación vascular.

Análisis ROC del papel de CD14-CD16-CD15+ como un biomarcador para predecir CV. Se trazaron curvas ROC y se calcularon AUC, IC 95% y valores p (tabla)

### Expresión génica de la defensina alfa 3

Para corroborar la contribución de los LDG al daño vascular por métodos diferentes a la citometría de flujo, se analizó en las fracciones de PBMC, la expresión génica DEFA3 que codifica la expresión de defensina alfa 3 o péptido neutrófilo humano 3 (PNH3), una enzima producida por neutrófilos inmaduros, liberada durante situaciones de estrés celular o daño tisular y que es capaz de activar el sistema inmunológico innato. Se encontraron mayores niveles de defensina 3 en los pacientes en comparación con los controles, aunque no se alcanzó significado estadístico [ERC: 1,02 (2,56) frente a controles: 0,55 (0,76) unidades relativas,  $p=0,13$ ]. Sin embargo, se vio que la expresión de DEFA 3 aumenta en proporción directa con el incremento en el porcentaje de LDG ( $r=0,37$ ,  $p=0,04$ ) pero que son los CD14-CD16-CD15+ los responsables de esta asociación ( $r=0,73$ ,  $p<0,001$ ) y no los CD14lowCD16+CD15+ ( $r=0,13$ ,  $p=0,40$ ). La expresión de DEFA3 mostró una fuerte asociación con la subpoblación CD14-CD16-CD15+ y con el IK ( $r=0,50$ ,  $p=0,01$ ). Podríamos decir por tanto que la DEFA3 podría proporcionar un marcador sustitutivo a la citometría de flujo para estimar los niveles circulantes de CD14-CD16-CD15+ y, por tanto, el riesgo de CV.

### *Replicación del estudio en pacientes en HD*

Para incrementar el aporte clínico de estos hallazgos utilizamos una población de validación en un grupo de pacientes en otro programa de TRS como es la HD.

Para ello, el estudio se replicó en 16 pacientes en HD y 6 controles sanos. Las características de estos pacientes eran muy similares a las de quienes hacían DP en cuanto a edad y parámetros clínicos, *tabla 6*.

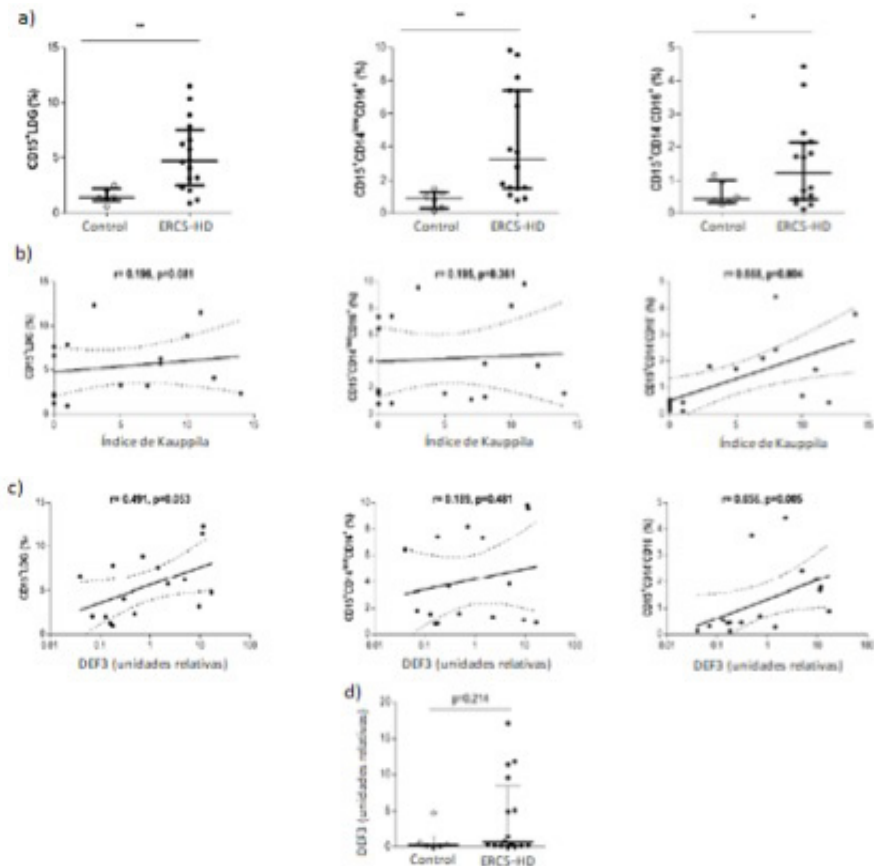


	Controles sanos (n=6)	Pacientes con ERC 5-HD (n=16)	P
Edad (años)	57,00 (49,00 – 67,00)	54,87 (21,00 – 74,00)	0,59
Sexo (f/m)	2/4	6/10	0,86
<b>Características clínicas</b>			
Albúmina, mg/dl	44,08±2,07	36,08±6,78	<0,001
Urea, mg/dl	38,16±7,08	100,93±29,95	<0,001
Creatinina, mg/dl	0,99±0,20	8,19±2,26	<0,001
Calcio plasmático, mmol/l	2,47±0,08	2,19±0,22	0,03
Fósforo plasmático, mmol/l	1,01±0,13	1,49±0,60	0,01
PTH, pg/ml	50,20±15,67	379,31±321,74	<0,001
25-hidroxivitamina D, ng/ml	29,72±8,59	8,32±5,85	<0,001
PCR, mg/dl		0,38±0,36	
Calcificación vascular, n(%)		10 (62,5)	
IK		6,33±4,98	
Tiempo en diálisis, meses		31,00 (54,50)	
<b>Tratamiento, n (%)</b>			
Paricalcitol		7 (43,7)	
Captore de fósforo		11 (68,7)	
Estatinas		9 (56,2)	
Corticoide		4 (25,0)	
Epo		13 (81,2)	
<b>Citoquinas séricas, pg/ml</b>			
IL-2	1,35 (1,05)	1,62 (0,59)	0,87
IL-6	5,12 (3,75)	5,10 (3,04)	0,98
IL-10	1,72 (1,07)	1,50 (1,29)	0,57
IFN $\gamma$	8,19 (7,10)	13,14 (8,56)	0,12
TNF $\alpha$	7,79 (5,35)	10,11 (4,28)	0,45

**Tabla 6.** Características demográficas, clínicas e inmunológicas de la cohorte donde se replicó el estudio: controles sanos y pacientes en HD

Las variables se expresan como media±SD, %. Las diferencias fueron analizadas mediante los test T Student, U de Mann-Whitney o chi 2 según la distribución normal o no normal en la variable analizada.

Se constató que también en los pacientes en HD, hay mayor expansión de LDG que en controles. Se vio también que la subpoblación de LDG CD14-CD16-CD15+ guarda relación con la calcificación vascular medida por el IK ( $r=0,67$ ,  $p=0,04$ ) y con la expresión génica DEFA3 ( $r=0,66$ ,  $p=0,01$ ), Fig. 23.



**Figura 23.** Subconjuntos de LDG en la cohorte de replicación de pacientes con ERC5-HD.

a) Las frecuencias de CD15 + LDG totales, así como de los subconjuntos CD14-CD16-CD15+ y CD14lowCD16+CD15+ en fracciones de PBMC se compararon entre controles sanos (círculos abiertos) y enfermos renales en hemodiálisis (círculos negros). Las barras centrales representan los valores medios, mientras que los bigotes representan los percentiles 25 y 75.

Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante pruebas U de Mann-Whitney. b) Asociación de los subconjuntos de LDG con el índice de Kauppila en la cohorte de replicación. c) Asociación de la expresión del gen DEFA3 en fracciones de PBMC. Las correlaciones se evaluaron mediante la prueba de rango de Spearman. d) Niveles de expresión de DEF3 en controles sanos y enfermos renales en HD. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante pruebas U de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### ***Subpoblación CD14-CD16-CD15+ como marcador de deterioro óseo***

Una vez relacionados los LDG CD14-CD16-CD15+ con una mayor propensión a CV en la ERC avanzada, y conociendo la asociación entre CV y fracturas por fragilidad tanto en población general como en pacientes renales, se procedió a evaluar la contribución de estas células al deterioro óseo en la cohorte de pacientes sometidos a DP.

La prevalencia de fracturas por fragilidad fue del 5% en los hombres y del 27% en mujeres, todos ellos con fracturas vertebrales y, en una de las pacientes, además con dos fracturas periféricas.

En la tabla 7 se recogen los parámetros clínicos, determinaciones analíticas del metabolismo óseo relacionados con la ERC, así como los parámetros nutricionales e inflamatorios estudiados, la etiología de la ERC, los tratamientos médicos con repercusión metabólica-ósea y las diferencias entre los pacientes con o sin deterioro óseo. Como cabría esperar, los pacientes con deterioro óseo fueron de mayor edad, con un predominio significativo de las mujeres [26,3% de hombres y 77,8% de mujeres ( $p = 0,01$ )] y con un índice de Charlson discretamente superior. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con o sin deterioro óseo en los parámetros analíticos vinculados a CKD-MBD, incluyendo los niveles de PTH. Esta ausencia de vinculación puede ser debida a la estimación categórica y poco precisa del deterioro óseo y, sobre todo, al tamaño muestral. Además, hasta 2017 no se recoge la relevancia de la DXA en la evaluación sistemática de pacientes con CKD-MBD y no formaba parte de la rutina de parámetros clínicos, al contrario de la evaluación radiológica.

	Sí N=14 (45,2%)	No N=17 (54,8%)	p valor
<b>Parámetros clínicos</b>			
Sexo (H/M)	5/9	15/2	<b>0,02</b>
Edad (años) (media (SD))	62,6 ±9,5	51,9 ± 15,3	<b>0,02</b>
Índice de Charlson (mediana [IQR])	6 [3 - 7]	4 [2 - 6]	0,07
Tiempo en diálisis (meses)(mediana [IQR])	18 [11 - 32]	15 [9 - 48]	0,92
Función renal residual (Sí/No)	12/2	12/5	0,31
<b>Parámetros CKD-MBD</b>			
Calcio, mmol/l (media (SD))	2,18 ± 0,18	2,18 ± 0,17	0,96
Fósforo, mmol/l (media (SD))	1,69 ± 0,35	1,64 ± 0,42	0,71
Magnesio, mmol/l (mediana [IQR])	0,81 (0,77 - 0,95)	0,87 (0,67 - 1,01)	0,95
PTH, pg/ml (mediana [IQR])	386 (230 - 453)	300 (214, 600)	0,57
25-hidroxivitamina D, ng/ml (mediana [IQR])	10,1 (5,1 - 18,6)	8 (6, 13)	0,89
Fosfatasa alcalina, U/L (mediana [IQR])	106 (81 - 143)	89 (71, 127)	0,30
IK (mediana [IQR])	6 (1 - 16)	0 (0 - 4)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Parámetros nutricionales</b>			
Proteínas totales, mg/dl (media (SD))	63 ±6	63 ± 7	0,94
Albúmina, mg/dl (media (SD))	37 ± 3	36 ± 5	0,56
IMC Kg/m <sup>2</sup> , (media (SD))	28,6 ±7,1	27,1 ± 5,4	0,52
<b>Parámetros inflamatorios</b>			
PCR, mg/dl (mediana [IQR])	0,3 (0,1 - 1,7)	0,3 (0,1 - 0,7)	0,86
IFN γ, pg/ml (mediana [IQR])	7,33 (3,80 - 15,50)	7,82 (5,88 - 11,19)	0,54
TNFα, pg/ml (mediana [IQR])	8,13 (4,13 - 13,07)	8,50 (7,76 - 12,48)	0,25
IL-2, pg/ml (mediana [IQR])	1,60 (1,32 - 2,30)	1,52 (1,26 - 1,91)	0,57
IL-6, pg/ml (media (SD))	11,26 5±09	11,31 ± 9,01	0,98
IL-10, pg/ml (mediana [IQR])	1,71 (1,36 - 2,30)	1,91 (1,36, 4,78)	0,51
LDG CD14 CD16 CD15* [log], % CD15+ (media (SD))	-0,44 ±0,4	-0,12 ± 0,4	<b>&lt;0,01</b>
DEFA3 [log] (media (SD))	0,07 ±0,41	-0,12 ±0,67	0,38
<b>Etiología, (%)</b>			
Glomerular	50	23,5	0,13
Nefritis intersticial	0	5,9	0,36
No filiada	14,29	35,29	0,18
Otras	0	11,76	0,19
Pielonefritis	0	5,88	0,36
PQHR	14,29	11,76	0,84
Nefroangioesclerosis	21,43	5,88	0,19
<b>Tratamientos, (%)</b>			
Vitamina D nutricional	38	41,1	0,88
Vitamina D activa	50	47	0,87
Cinacalcet	35,7	29,4	0,71
Captadores de fósforo	64,28	47	0,34
Corticoides	17,6	18,75	0,78

**Tabla 7.** Características clínicas, CKD-MBD, nutricionales e inmunológicas en pacientes con ERC5-DP discriminados por presencia o ausencia de deterioro óseo.

Las variables se expresan como media±SD, %. Las diferencias fueron analizadas mediante los test T Student, U de Mann-Whitney o chi 2 según la distribución normal o no normal en la variable analizada.

Es destacable la deficiencia/insuficiencia de vitamina D en ambos grupos. Los valores medios de 25-hidroxivitamina D en pacientes que tenían prescrito con vitamina D nutricional (38,7%) fueron de 8,4 [6,8, 18,3] ng/ml, frente a 9,3 [5,4-15] ng/ml en los que tenían prescrito, ambos niveles en el rango de deficiencia de vitamina D (<20 ng/ml). En el 48,4% de los pacientes que recibían vitamina D activa (calcitriol o paricalcitol), los valores medios de vitamina D fueron de 9,3 [5,4, 12,4] ng/ml, similar al del grupo de pacientes que tenían prescrito con vitamina D nutricional.

Respecto a la cuantificación de las calcificaciones vasculares, el IK fue 6 veces superior en los pacientes con deterioro óseo ( $p < 0,01$ ).

En cuanto a los parámetros nutricionales, no se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas totales, albúmina ni IMC.

Se observó una elevación significativa en la población de LDG inmaduros LDG CD14-CD16-CD15+ en el grupo de pacientes con deterioro óseo.

Con respecto a la etiología de la ERC y los tratamientos médicos que estaban recibiendo en el momento del estudio, no se encontraron diferencias entre los pacientes asociadas al deterioro óseo.

En el análisis de regresión logística analizando el deterioro óseo como variable dependiente respecto a la edad y el sexo, fue el sexo femenino (OR 10,41; IC 95%: 1,52-119,30;  $p = 0,03$ ) la variable con mayor peso, mientras que la edad estuvo en el límite de la significación (OR 1,09; IC 95%: 1,01-1,22;  $p = 0,05$ ).

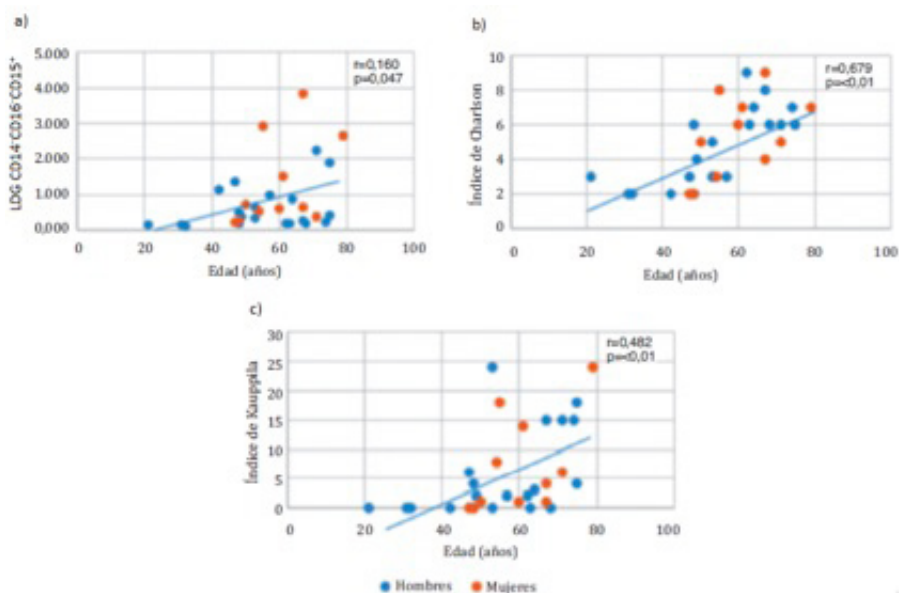
Cuando se analizó la contribución independiente de cada uno de los parámetros de riesgo identificados al deterioro óseo, ajustando por edad y sexo, únicamente los LDG CD14-CD16-CD15+ resultaron ser predictores independientes tanto en datos crudos como ajustados por edad, por sexo y por ambos en conjunto, **tabla 8**. Cabe resaltar que no se observaron diferencias en los neutrófilos circulantes entre pacientes con o sin deterioro óseo. El subconjunto de LDG CD14-CD16-CD15+ tampoco se correlacionó con los recuentos absolutos de neutrófilos ( $p > 0,05$ , datos no mostrados).

	Análisis crudo		Ajustado por edad		Ajustado por sexo		Ajustado por edad y sexo	
	Odds ratio (95% IC)	p	Odds ratio (95% IC)	p	Odds ratio (95% IC)	p	Odds ratio (95% IC)	p
<b>I. Charlson</b>	1,4 (0,97-2,01)	0,07	1,13 (0,71-1,82)	0,60	1,52 (0,96-2,41)	0,07	1,22 (0,68-2,21)	0,50
<b>IK</b>	1,52 (0,96-2,41)	0,07	1,05 (0,93-1,17)	0,44	1,11 (0,98-1,25)	0,10	1,06 (0,93-1,21)	0,39
<b>LDGi [log]</b>	8,57 (2,58-52,39)	<b>0,00</b>	10,5 (2,5-92,5)	<b>0,01</b>	13,21 (2,71-179,6)	<b>0,01</b>	15,6 (2,6-300,2)	<b>0,02</b>
<b>Sexo</b>	13,5 (2,15-84,69)	<b>0,00</b>	15,63 (2,01-121,47)	<b>0,01</b>				
<b>Edad</b>	1,07 (1-1,15)	<b>0,04</b>			1,09 (0,99-1,19)	0,07		

**Tabla 8.** Factores de riesgo de deterioro óseo ajustados por edad y sexo en pacientes con ERC5-DP.

Análisis de regresión logística entre cada uno de los factores de riesgo de daño óseo sin ajuste o ajustados por edad, sexo o edad y sexo.

Importante destacar también que todos los cambios en los parámetros diferencialmente expresados en pacientes con deterioro óseo, como los aumentos en los índices de Charlson o IK y en la densidad de LDG CD14-CD16-CD15+ se correlacionan significativamente con la edad ( $r=0,68$ ,  $p=0,00$ ;  $r=0,48$ ,  $p=0,01$ ;  $r=0,36$ ,  $p=0,04$ ), *Fig. 24*.



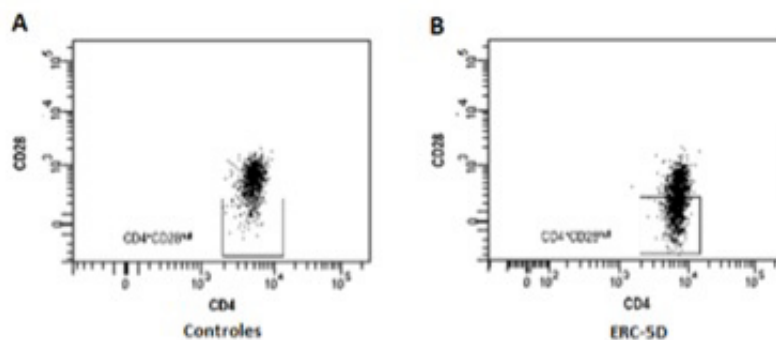
**Figura 24.** Asociación de edad y el sexo con factores de riesgo de deterioro óseo en pacientes con ERC5-DP.

Gráfico de dispersión. Se muestra la correlación de la edad y el sexo con a) LDG: granulocitos de baja densidad inmaduros, b) índice de Charlson y c) Índice de Kauppila. Cada círculo representa un sujeto de estudio

### Subpoblaciones linfocitarias

*Caracterización de cambios de densidad en los Linfocitos T CD4+CD28null en pacientes con ERC5-DP.*

Una vez obtenidos los linfocitos de sangre circulante, se evaluó la expresión de CD4 y CD8. En las células CD4+ se analizó el marcador CD28. Su ausencia permitió la identificación de los linfocitos CD4+CD28null, Fig. 25.



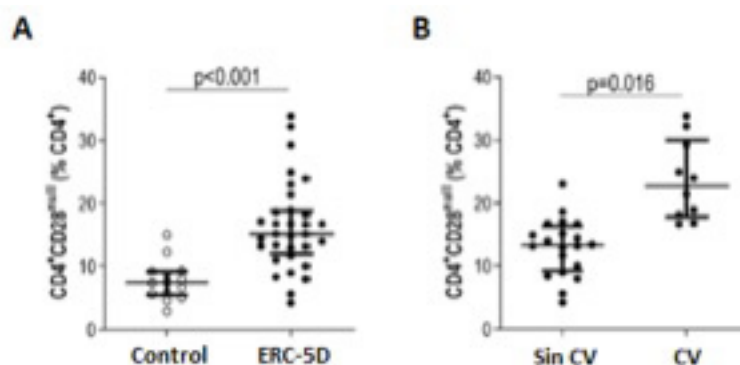
**Figura 25.** Identificación y cuantificación de linfocitos CD4+CD28null.

Imágenes de citometría de flujo. Patrón FSC/SSC de los linfocitos CD4+CD28null en un control sano (A) y en un paciente con ERC-5D (B)

Los pacientes con ERC5-DP mostraron un marcado aumento en esta subpoblación celular en comparación con los controles ( $p < 0,001$ ), *Fig. 26 A*.

#### *Subpoblación linfocitaria CD4+CD28null como marcador de daño cardiovascular*

Los pacientes con CV, presentaron niveles más altos de CD4+CD28null, *Fig. 26 B*.



**Figura 26.** Asociación de la subpoblación linfocitaria CD4+CD28null con calcificación vascular los pacientes con ERC5-DP.

*Análisis de cambios de densidad del subconjunto de linfocitos T CD4+CD28null. (A) Niveles en controles y pacientes con ERC estadio 5 en diálisis peritoneal (ERC-5DP). (B) Expresión de CD4+CD28null en pacientes sin o con calcificación vascular (CV)*

No hubo asociaciones de los linfocitos CD4+CD28null con parámetros bioquímicos, fármacos o tiempo en diálisis ( $p > 0,05$ ). De los parámetros clínicos, se correlacionaron con la edad ( $r = 0,50$ ,  $p = 0,007$ ). Los corticoides no tuvieron efecto sobre esta subpoblación de células inmunes ( $p = 0,24$ ). Cabe mencionar que, al excluir a los pacientes bajo tratamiento con esteroides, el resultado fue similar. Las citoquinas tampoco mostraron asociación ( $p > 0,05$ ).

Se pudo observar que CD4+CD28null se asoció con el IK ( $r = 0,58$ ,  $p < 0,001$ ). Dicha asociación se mantuvo ( $\beta$  [IC del 95%],  $p$ : 0,88 [0,35, 1,40],  $p < 0,01$ ) al realizar un análisis multivariante tras ajustar por FRCV tradicionales y el tiempo en diálisis como factores de confusión.

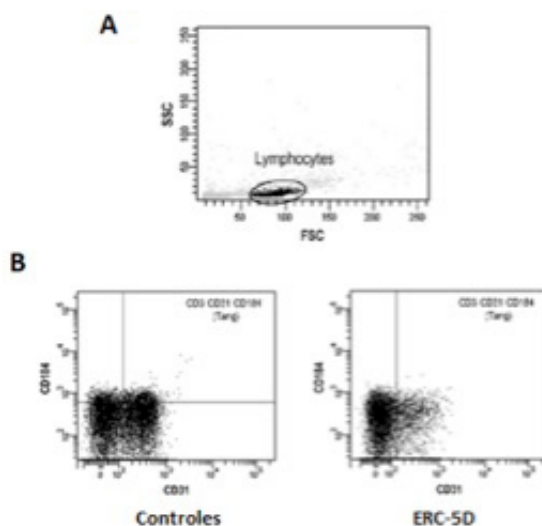


### *Caracterización de Linfocitos T angiogénicos en pacientes con enfermedad renal*

Los Tang fueron obtenidos de los linfocitos aislados de PBMC. Se procedió a identificarlos en base a las siguientes características:

- 1) Citometría de flujo: señal de dispersión lateral y directa bajas, es decir, se trata de células pequeñas y poco granulares, Fig. 27.
- 2) Marcadores de linaje: CD3+ CD31+ CD184+. CD184 también se denomina fusina o receptor de quimiocina CXC tipo 4 (CXCR-4). A su vez, CXCR4 es el receptor para el factor 1 derivado de las células madre hematopoyéticas (SDF-1).

Se vio que los pacientes exhibieron una menor frecuencia de Tang que los controles.



**Figura 27.** Identificación y cuantificación de Tang.

*Imágenes de citometría de flujo. A) Patrón FSC/SSC de los linfocitos, identificados por el marcador CD3. B) Se aprecian los Tang con los marcadores CD3+CD31+CD184+ en un control sano (izquierda) y en un paciente con ERC-5D (derecha)*

Posteriormente se subdividieron Tang en los subconjuntos CD4+ y CD8+. No hubo diferencias en la frecuencia de CD4+ [46,55 (21,07) frente a 48,66 (19,45)%,  $p=0,52$ ] y subconjuntos CD8+ [42,20 (21,01) vs. 41,09 (18,16)%,  $p=0,26$ ] dentro del grupo de Tang entre pacientes y controles. Como consecuencia, tanto CD4+ Tang [1,88 (1,16) frente a 3,43 (1,80)%,  $p<0,001$ ,  $g=1,82$ ] como CD8+ Tang [2,02 (0,88) frente a 3,11 (1,72)%,  $p<0,001$ ,  $g=1,15$ ] disminuyeron en los pacientes con ERC5-DP.

### *Subpoblación linfocitaria Tang como marcador de daño cardiovascular*

Se analizaron los niveles circulantes de Tang en relación con diversos factores de riesgo cardiovascular, entre los que se encuentran el colesterol total y el colesterol LDL (cLDL), precisamente este último es el que confiere el riesgo vascular de la hipercolesterolemia. En los controles, se evidenció una correlación inversa tanto con el colesterol total como con el cLDL ( $r=-0,66$ ,  $p=0,01$ ;  $r=-0,37$ ,  $p=0,02$ , respectivamente).

Otro factor de riesgo estudiado por su alta sensibilidad para enfermedad coronaria, mortalidad e insuficiencia cardíaca es la troponina cardíaca T (TnTc). Se pudo observar en los pacientes, una correlación inversa de los niveles de Tang con la concentración de TnTc ( $r=-0,55$ ,  $p<0,01$ ).

El uso de corticoides no tuvo efecto en la densidad de Tang en la circulación ( $p=0,36$ ). De hecho, la exclusión de los pacientes bajo tratamiento con esteroides no cambió el resultado en cuanto a densidad de Tang en la circulación. La concentración de citoquinas circulantes tampoco mostró asociación ( $p>0,05$ ).

A continuación, se realizaron correlaciones con variables consideradas biomarcadores de CV subclínica. Se pudo observar que Tang se correlacionó con la VOP y marginalmente con el IK ( $r=-0,73$ ,  $p<0,001$ ;  $r=-0,36$ ,  $p=0,06$ ).

### **Ecografía Ultrasensible Sin Contraste: Superb Microvascular Imaging**

#### *Superb Microvascular Imaging (SMI) como un marcador de riesgo subclínico de aterosclerosis*

Se realizaron ecografías carotídeas y femorales a un subgrupo de 17 pacientes (representativos de toda la población) y 14 controles. Se utilizó por primera vez, la ecografía Doppler tipo SMI para cuantificar tanto el número como la densidad del VVa en ambas localizaciones por ser un marcador más sensible que el GIMc.

Se estudió por primera vez la neovascularización femoral y se hizo con un nuevo método ecográfico. Se sabe por el estudio NEFRONA, que alrededor del 17% de pacientes con ERC estadios 3, 4 y 5D, tienen enfermedad ateromatosa solamente a nivel femoral, precediendo estas lesiones a las carotídeas, de aorta abdominal y coronarias, este último evidenciado en los estudios PESA y AWHs como se comentó anteriormente.

Se pudo constatar que los pacientes exhibieron mayor expansión carotídea de VVa y una tendencia que no alcanzó significado estadístico en la localización femoral, junto con valores más altos de VOP y GIMc que en los controles normales, *tabla 9*.

	Controles (n = 14)	ERC5-DP (n = 17)	p
<b>VVa carotídea, número (n vasos)</b>	0,00 (2,00)	3,00 (7,00)	<b>&lt;0,05</b>
<b>VVa carotídea, área (% mm<sup>2</sup>/mm)</b>	0,00 (2,16)	2,61 (8,84)	<b>0,02</b>
<b>VVa femoral, número (n vasos)</b>	0,00 (1,25)	1,00 (3,50)	0,24
<b>VVa femoral, área (% mm<sup>2</sup>/mm)</b>	0,00 (1,57)	0,89 (4,67)	0,12
<b>VOP, m/s</b>	7,20 (1,38)	8,70 (2,82)	<b>0,01</b>
<b>GIMc, mm</b>	0,60 (0,20)	0,75 (0,32)	<b>0,04</b>

**Tabla 9.** Cambios en marcadores de daño vascular inducidos por la ERC.

Las variables se expresan como mediana (rango intercuartil) y se compararon utilizando el test de U de Mann-Whitney.

Posteriormente se analizó en este grupo de pacientes la asociación de los nuevos parámetros carotídeos y femorales de disfunción vascular con conocidos marcadores clínicos de daño vascular como la rigidez arterial medida por la VOP o la propensión a aterosclerosis medida por el GIMc.

Se observó que mientras que el GIMc de estos pacientes no se asocia significativamente con marcadores de daño vascular, las mediciones de neovascularización de la adventicia por el método SMI se asocian de manera significativa con la VOP, *tabla 10*.

El incremento del área del VVa carotídeo, pero no femoral, se correlaciona significativamente con los aumentos en la VOP, con un coeficiente de determinación del 61%, vale decir que el 61% de los cambios en la VOP de estos pacientes podrían ser explicados por los aumentos en el área del VVa carotídeo.

De todos los parámetros inflamatorios, las células CD4+CD28null fueron las únicas en asociarse con el GIMc, mientras que las células Tang se correlacionaron fuertemente con el VVa tanto carotídeo como femoral, *tabla 10*.

	GIMc	VVa carotídea, número	VVa carotídea, área	VVa femoral, número	VVa femoral, área
<b>Características demográficas</b>					
Edad	r=0,33 p=0,13	r=0,27 p=0,30	r=0,29 p=0,24	r=0,26 p=0,31	r=-0,98 p=0,71
<b>Parámetros de daño vascular</b>					
IK	r= 0,16 p= 0,48	r=0,09 p=0,73	r= 0,39 p= 0,12	r=0,39 p=0,12	r=0,05 p=0,85
VOP	r=0,39 p=0,11	r=0,61 <b>p=0,01</b>	r=0,46 p=0,07	r=0,46 p=0,08	r=0,46 p=0,08
<b>Parámetros de inflamación</b>					
PCR	r=0,19 p=0,42	r=0,35 p=0,17	r=0,31 p=0,23	r=0,31 p=0,23	r=0,05 p=0,84
LDG CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	r=0,03 p=0,91	r=0,05 p=0,84	r=-0,06 p=0,82	r=0,05 p=0,84	r=-0,05 p=0,84
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup>	r=0,57 <b>p=0,04</b>	r=0,33 p=0,19	r=0,34 p=0,12	r=0,09 p=0,74	r=0,39 p=0,12
Tang	r=-0,03 p=0,92	r=-0,64 <b>p=0,01</b>	r=-0,81 <b>p&lt;0,001</b>	r=-0,19 p=0,46	r=-0,54 <b>p=0,03</b>

**Tabla 10.** Asociaciones entre características epidemiológicas, cardiovasculares y de inflamación con marcadores ecográficos de aterosclerosis subclínica en pacientes con ERC5-DP.

Las correlaciones fueron realizadas utilizando el test de Spearman.

Por esta razón se realizó un análisis multivariante donde se evidenció la capacidad de Tang para predecir VVa y VOP. También se corrigió el efecto de los FRCV medido por el SCORE. Tang demostró mejorar la capacidad predictiva del SCORE, *tabla 11*.

	VVa carotídea, número	VVa femoral, número	VVa carotídea, área	VVa femoral, número	VOP
<b>Univariante</b>					
<b>Tang</b>	-0,50(-2,28,-0,48)	-0,29 (-1,08, 0,11)	-0,52(-3,81,-0,86)	-0,46 (-2,93,-0,47)	-0,66 (-1,40, -0,68)
	<b>p=0,004</b>	p=0,110	<b>p=0,003</b>	<b>p=0,008</b>	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Multivariante</b>					
<b>Tang</b>	-0,66 (-6,31, -0,58)	0,16 (-1,29, 2,26)	-2,31 (-10,87, -0,41)	-0,39 (-6,96, -0,01)	-0,48 (-3,39, -0,14)
	<b>p=0,02</b>	p=0,57	<b>p=0,04</b>	<b>p=0,04</b>	<b>p = 0,01</b>
<b>SCORE</b>	-0,27 (-2,01, 0,70)	0,540 (-0,07, 1,64)	0,03 (-2,40, 2,63)	0,41 (-0,26, 3,42)	0,37 (-0,24, 1,54)
	p=0,31	p=0,07	p=0,92	p=0,07	p=0,14

**Tabla 11.** Tang como predictor de CV subclínica.

Las asociaciones entre la frecuencia de Tang y marcadores de CV subclínica fueron analizados mediante regresión lineal univariante y multivariante ajustados por el SCORE. Se obtuvieron el coeficiente de regresión estandarizado (B) y un intervalo de confianza del 95% con su correspondiente significado estadístico.

### Bioimpedancia eléctrica (BIE): ángulo de fase (AF).

#### Ángulo de fase: asociación con marcadores de riesgo cardiovascular

La bioimpedancia se pudo obtener en 31 de los 33 pacientes.

La tabla 12 presenta el análisis de las correlaciones entre los valores de AF y las características epidemiológicas, los parámetros nutricionales, de inflamación y de daño vascular más relevantes en estos pacientes.

	<b>R</b>	<b>p</b>
<b>Características epidemiológicas</b>		
Edad	- 0,49	<0,01
I. Charlson	-0,47	<0,01
Tiempo en diálisis	-0,39	0,03
<b>Parámetros nutricionales</b>		
Proteínas	0,50	<0,01
Albumina	0,40	0,02
Prealbumina	0,10	0,55
nPCR	0,03	0,85
LTI Kg/m <sup>2</sup>	0,56	<0,01
OH	-0,44	0,01
OH/ECW	-0,12	0,50
<b>Parámetros de inflamación</b>		
PCR	-0,14	0,47
IL-6	-0,44	0,01
Fibrinógeno	-0,22	0,23
<b>Parámetros de daño vascular</b>		
VVa carotídea, número	-0,27	0,30
VVa carotídea, área	-0,23	0,25
VOP	-0,49	0,03
IK	-0,74	<0,01
LDG CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	-0,59	<0,01
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>int</sup>	-0,37	0,04
Tang	0,25	0,19

**Tabla 12.** Asociación de las características clínicas, parámetros de daño vascular, nutricionales y de inflamación con el AF en pacientes con ERC5-DP.

Las correlaciones fueron realizadas utilizando el test de Pearson o Spearman según la distribución normal o no normal en la variable analizada.

El AF se correlacionó inversamente con los FRCV conocidos como la edad y el índice de comorbilidad de Charlson, así como con el tiempo en diálisis.

En cuanto a los parámetros nutricionales, la correlación fue positiva con los niveles de proteínas totales, albumina y LTI. Curiosamente la prealbumina y la tasa de catabolismo proteico (nPCR) no se asociaron significativamente al AF.

Tanto los aumentos en el grado de inflamación sistémica, medido por los niveles de IL-6, como la sobrehidratación en litros, se asociaron a disminuciones en el AF.

De manera similar, los aumentos en los marcadores de daño vascular, como la calcificación de la aorta abdominal (IK) y de rigidez arterial (VOP), como así también en las subpoblaciones leucocitarias de LDG inmaduros y linfocitos inmunosenescentes CD4+CD28null, se asociaron a disminuciones en el AF.

El análisis de datos clínicos, de composición corporal y de laboratorio, discriminando a los pacientes según  $AF \leq 4,5^\circ$  o  $>4,5^\circ$ , tabla 13, demuestra que los pacientes con un  $AF \leq 4,5^\circ$  son mayores y con mayor grado de comorbilidad medida por el índice de Charlson. No se encontraron diferencias en los parámetros de diálisis, aunque todos los pacientes con  $AF < 4,5^\circ$  son rápidos transportadores.

Ninguno de los parámetros de laboratorio que evalúan el estado nutricional, tales como proteínas totales, albúmina, prealbúmina y colesterol total, o los parámetros vinculados a alteraciones del metabolismo mineral y óseo en la CKD-MBD fueron diferentes en los pacientes con  $AF \leq 4,5^\circ$ .

De todos los datos de composición corporal arrojados por las mediciones de BIE, solamente el LTI fue inferior en pacientes con  $AF \leq 4,5^\circ$  ( $p=0,04$ ).

	$\leq 4,5^\circ$ N=7 (23%)	$> 4,5^\circ$ N=24 (77%)	p
<b>Parámetros clínicos</b>			
Sexo (H/M) (n)	4/3	16/8	0,64
Edad (años) (media (SD))	65,2 ± 9,7	54,3 ± 14,07	<b>0,03</b>
Índice de Charlson (mediana [IQR])	7 (6 - 7)	4 (2,25 - 6)	<b>0,01</b>
Tiempo en diálisis (meses) (mediana [IQR])	19 (15 - 58)	15 (8,5 - 34,5)	0,12
DPCA/DPA (n)	4/3	9/15	0,35
PET R/MR/ML (n)	4/3/0	12/8/4	0,50
Kt/v (media (sd))	2,09 ± 0,35	2,34 ± 0,7	0,43
FRR (sí/no) (n)	5/2	19/5	0,67
<b>Parámetros de laboratorio</b>			
Proteínas totales (mg/dl) (media (SD))	62 ± 6	64 ± 7	0,49
Albumina (mg/dl) (media (SD))	34 ± 4	37 ± 4	0,09
Prealbumina (mg/dl) (media (SD))	29 ± 5	30 ± 6	0,69
Colesterol total (mg/dl) (mediana [IQR])	141 (121 - 168)	163 (141,25 - 213)	0,19
Colesterol HDL (mg/dl) (mediana [IQR])	56 (41 - 60)	54 (46,25 - 72,75)	0,54
Colesterol LDL (mg/dl) (mediana [IQR])	72 (35 - 109)	83 (63 - 116,75)	0,27
Triglicéridos (mg/dl) (mediana [IQR])	103 (98 - 165)	107,5 (62 - 164,5)	0,74
Calcio (mmol/l) (media (SD))	2,19 ± 0,22	2,16 ± 0,15	0,65
Fósforo (mmol/l) (media (SD))	1,75 ± 0,29	1,65 ± 0,41	0,59
Magnesio (mmol/l) (mediana [IQR])	0,81 (0,78 - 0,89)	0,83 (0,68 - 0,97)	0,91
PTH (pg/ml) (mediana [IQR])	336 (246 - 688)	332 (217 - 526)	0,81
25-hidroxivitamina D (ng/ml) (mediana [IQR])	8 (5,30 - 20,30)	9 (5,68 - 12,13)	0,78
Homocisteína ( $\mu$ mol/l) (mediana [IQR])	23,4 (14,68 - 38,13)	31,7 (23,23 - 38,43)	0,22
nPCR (g/kg/día) (media (SD))	0,99 ± 0,27	1,03 ± 0,24	0,18
<b>Composición corporal</b>			
OL (litros) (mediana [IQR])	1,7 (1 - 5,5)	1 (-0,5 - 2,2)	0,11
OH/ECW (%) (mediana [IQR])	9 (3 - 11)	6 (3,7 - 12)	0,59
LTM (Kg) (media (SD))	34,2 ± 10	42,6 ± 11,4	0,11
LTM (%) (media (SD))	49 ± 20,1	57,5 ± 17,5	0,28
ATM (Kg) (media (SD))	32,2 ± 12,7	33,5 ± 21,1	0,88
LTI (Kg/m <sup>2</sup> ) (mediana [IQR])	12,6 (10,9 - 15,4)	16,3 (13,33 - 18,83)	<b>0,04</b>
FTI (Kg/m <sup>2</sup> ) (media (SD))	12,1 ± 5,2	12,6 ± 8,4	0,90
Fat (%) (media (SD))	33,7 ± 12,3	30,1 ± 13,4	0,57
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) (media (SD))	26 ± 3,1	27,7 ± 7,6	0,59
<b>Parámetros inflamatorios</b>			
Fibrinógeno (mg/dl) (media (SD))	671,33 ± 44,83	563,62 ± 118,9	<b>0,04</b>
PCR (mg/dl) (mediana [IQR])	0,3 (0,10 - -0,80)	0,3 (0,10, -0,78)	0,62
IL-6 (pg/ml) (media (SD))	15,98 ± 11,08	9,72 ± 5,30	0,19
IL-10 (pg/ml) (mediana [IQR])	1,78 (1,57 - 7,47)	1,71 (1,36 - 2,3)	0,37
IL-2 (pg/ml) (mediana [IQR])	1,65 (1,28 - 1,85)	1,5 (1,26 - 2,11)	0,89
TNF $\alpha$ (pg/ml) (mediana [IQR])	8,13 (3,43 - 19,40)	8,5 (6,30 - 12,30)	0,76
IFN $\gamma$ (pg/ml) (mediana [IQR])	7,33 (2,93 - 8,07)	7,82 (5,88 - 14,53)	0,21
<b>Parámetros de daño vascular</b>			
VOP (m/s) (media (SD))	12,35 ± 2,69	8,34 ± 1,43	0,06
IK (mediana [IQR])	15 (14 - 24)	1 (0 - 4)	<b>&lt;0,01</b>
Neovasos (mediana [IQR]) (—)	2,5 (0 - 0)	1 (0 - 3)	0,82
GIMc (mm) (media (SD))	6,4 ± 3,78	2,08 ± 2,71	0,06
Placas carotídeas (Sí/No)	6/1	11/10	0,29
Placas femorales (Sí/No)	7/0	15/6	0,20
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>high</sup> (%CD4 <sup>+</sup> ) (media (SD))	20,73 ± 4,58	8,62 ± 4,27	<b>&lt;0,01</b>
LDG CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> (% CD15 <sup>+</sup> ) (mediana [IQR])	1,52 (0,36 - 2,68)	0,41 (0,21 - 0,71)	<b>0,04</b>

**Tabla 13.** Características clínicas, de composición corporal y de laboratorio en pacientes con ERC5-DP discriminados por AF  $\leq 4,5^\circ$  o  $> 4,5^\circ$ .

Las variables se expresan como media  $\pm$  SD. Las diferencias fueron analizadas mediante los test T Student o chi 2 o U de Mann-Whitney según la variable analizada.



En cuanto a los parámetros de daño vascular, los pacientes con  $AF \leq 4,5^\circ$  presentaron un IK muy superior ( $p=0,001$ ) al de individuos con  $AF > 4,5^\circ$ , con elevaciones significativas de los leucocitos determinantes de CV (LDG CD14-CD16-CD15+) e inmunosenescencia (CD4+CD28null), como así también elevaciones en el fibrinógeno circulante (11,9% superior).

Debido a que los pacientes con  $AF \leq 4,5^\circ$  son 10 años mayores, se utilizó un modelo de regresión logística para estudiar la asociación entre AF y CV incluyendo la edad como variable confusora, que demostró que los descensos de AF predicen el grado de calcificación de la aorta abdominal independientemente de la edad del paciente (OR 3,98; IC 95% 6,14-1,83;  $p < 0,001$ ).

La mortalidad a los 4 años fue de 4 pacientes, en 3 de los cuales, el AF fue  $\leq 4,5^\circ$  con ECV como causa de muerte. El cuarto paciente, con un  $AF > 4,5^\circ$  falleció por COVID19.







## DISCUSIÓN

El estudio intenta demostrar un nuevo mecanismo de CV en la ERC hiperfosfatémica y una intervención nutricional inocua para su prevención/atenuación sin efectos adversos sobre el metabolismo fosfocálcico. Además, provee de herramientas para monitorizar el impacto de la inflamación sobre la salud vascular y ósea.

El control de la inflamación es primordial en el enfermo renal ya que orquesta múltiples procesos que terminan acelerando el envejecimiento multiorgánico y la muerte. Entre ellos, la propia progresión de la ERC, la HTA, la malnutrición, la sarcopenia, la afectación ósea, el deterioro inmunitario y el daño vascular. Una de las causas endógenas de la inflamación urémica de más difícil control es CKD-MBD. El estudio OSERCE puso en evidencia la dificultad para conseguir niveles óptimos de PTH, Ca y P como recomiendan las guías, y solamente en el 2% de 634 pacientes se consiguió el objetivo (201). Tradicionalmente, la forma de control del HPTS con análogos de la vitamina D activa, y, de la hiperfosfatemia con captoreos cálcicos, con fallos en su implementación, han agravado la CV en lugar de controlarla (76).

El P genera inflamación con la consecuente CV, por varias vías, muchas aún desconocidas. Este trabajo dilucida una de ellas, consiste en el estímulo de la potente citoquina inflamatoria  $TNF\alpha$  que induce a las enzimas ADAM17 y nSMase2 generando un círculo vicioso de liberación de exosomas procalcificantes por parte de las CMLV, que inician la propagación de la calcificación de la media arterial a células normales del entorno. Este proceso de inflamación/calcificación podría prevenirse o atenuarse con una intervención nutricional antiinflamatoria inocua, como la ingesta diaria de  $\beta$ glucanos de cebada.

Una dosis de 3 g diarios de  $\beta$ glucanos sería capaz de atenuar la inflamación y el estrés oxidativo y de prevenir y controlar la aterosclerosis y el envejecimiento vascular determinado por la edad, en individuos sanos. Esto lo haría al actuar a distintos niveles como son la inhibición enzimática (ADAM17 y nSMase2), de citoquinas ( $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ ) y de una vía de señalización pro-inflamatoria y pro-senescente temprana como el sistema (cGAS/STING).

Impresiona la rapidez con la que se producen estos efectos. Así, al finalizar la primera semana de ingesta de  $\beta$ glucanos, se puede apreciar una disminución de la producción de superóxido en un 50%, ADAM17 y nSMase2 en un 60%, sin que se modifiquen los niveles circulantes de  $TNF\alpha$ , PCR ni otras citoquinas estudiadas. Esto quiere decir que los  $\beta$ glucanos conseguirían frenar la expresión génica de estas dos enzimas pese a que no se produjeran cambios en los niveles de  $TNF\alpha$ , su principal inductor, en los individuos normales. De igual forma, podemos objetivar lo ya conocido,

existen otros estímulos para ADAM17 y nSMase2 como es la edad, capaz de aumentar el grado de inflamación sistémica y que podríamos contrarrestar, en parte, con la ingesta de  $\beta$ glucanos (50). Estos podrían ser los primeros mecanismos de acción que ejercen los  $\beta$ glucanos en el organismo.

Al culminar la cuarta semana de su consumo, se genera una mayor inhibición de ADAM17 en un 80% y de nSMase2 en un 90%. Aquí ya se aprecia un descenso de los niveles de ARNm de TNF $\alpha$  pese a que se mantienen los niveles en suero de TNF $\alpha$  y a que no hay mayor disminución en la producción de superóxido que el 50% ocurrido tras una semana de ingesta. Esto se traduciría, en que los  $\beta$ glucanos conseguirían este objetivo por mecanismos adicionales al control del estrés oxidativo. Así mismo, se apreció la reducción de INF $\gamma$  circulante dentro del rango de los valores normales en suero. Esto llevó a analizar si los  $\beta$ glucanos también podrían ejercer una inhibición sobre la vía cGAS/STING. Esta hipótesis se confirmó al evidenciar una reducción de un 90% del ARNm de STING leucocitario. Además de ello, la disminución en los niveles de ARN mensajero de STING se correlacionó con una disminución significativa de los niveles circulantes de INF $\gamma$  soluble y también con reducciones en la expresión de nSMase2. En cuanto a esta última correlación, se observó un coeficiente de determinación ( $r^2=0,65$ ) del 65%, es decir que el 65% de los cambios en la expresión de la nSMase2 podrían ser atribuidos a la reducción de la vía cGAS/STING por parte de los  $\beta$ glucanos. Pese al pequeño tamaño muestral, la fuerte asociación de los dos sugiere que la supresión simultánea y progresiva de ambos podría atenuar la inflamación producida por la edad. Estos hechos son trascendentales porque STING podría ser considerado un nuevo biomarcador del envejecimiento de los leucocitos ya que su reducción precede a cualquier aumento por encima de lo normal en los niveles de citoquinas inflamatorias, incluido el INF $\gamma$ , y, que los  $\beta$ glucanos demostrarían una gran potencia antiinflamatoria y antisenescencia inmune muy temprana.

Por otra parte, los  $\beta$ glucanos tendrían la capacidad de mejorar la función renal y una manera de conseguirlo sería a través de la disminución de la concentración en el riñón de ADAM17. Este hecho es relevante ya que los aumentos de ADAM17 en la enfermedad renal de cualquier etiología contribuyen al deterioro renal progresivo de la misma. Lautrette y cols. demostraron que el daño renal causado por elevaciones en los niveles de angiotensina 2 (ANG II), se deben a aumentos de ADAM17 en la superficie de las células del túbulo proximal y a la liberación del factor transformador de crecimiento alfa (TGF $\alpha$ , por sus siglas en inglés) que estimula a su receptor, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) para inducir glomérulo-esclerosis, infiltración de células inflamatorias, fibrosis y proteinuria (202).

Además de mediar los efectos deletéreos de la ANG II en el riñón, los aumentos de ADAM17 empeoran el daño renal debido a la hipertensión, al cortar la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, por sus siglas en inglés) de la superficie celular impidiendo las acciones antihipertensivas,

antiinflamatorias y antifibróticas. La enzima ACE2 es un antagonista del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) porque convierte la ANG II en angiotensina 1-7 (ANG 1-7), que a diferencia de la ANG II, es conocida por sus acciones antifibróticas, antioxidantes, vasodilatadoras y normotensoras (43). Parte de sus acciones antihipertensivas se deben a que la ACE2 atenúa las elevaciones de ANG II circulantes. De hecho, el déficit de ACE2 exagera la proteinuria, un marcador establecido de ERC y de su progresión, así como también de daño cardiovascular (203). Estudios en pacientes con nefropatía diabética han demostrado que los aumentos de ACE2 en la circulación se asocian con mayor riesgo cardiovascular, lo cual ratifica el efecto antagónico de la acción de ADAM17 cortando el ACE2 de la membrana celular (202).

De igual forma, ADAM17 tiene un rol importante en la poliquistosis renal tanto en su forma autosómica dominante (ADPKD, por sus siglas en inglés) como recesiva (ARPKD, por sus siglas en inglés), en donde existe una sobreexpresión del EGFR y TGF $\alpha$  en el epitelio quístico (204). Dell y cols., observaron en un modelo murino bpk de ARPKD tratado con WTACE2, un inhibidor competitivo de TACE (ADAM17) que inhibe la secreción de TGF $\alpha$ , la reducción del tamaño renal en un 43% y BUN y creatinina en un 30% (205). Para estos pacientes existen escasas opciones terapéuticas por lo que la integración de  $\beta$ glucanos en su dieta, puede ser una intervención eficaz. En este trabajo se evidenció no solo una mejoría de las cifras de urea y creatinina sino un descenso de la proteinuria que atribuiríamos a la acción de los  $\beta$ glucanos sobre ADAM17.

Otro mecanismo nefroprotector de los  $\beta$ glucanos, sería la reducción de la expresión del gen de la nSMase2 renal. Bautista y cols., demostraron que la ANG II ejerce su efecto vasoconstrictor renal a través de la activación de nSMase (206). Se conoce que al producirse vasoconstricción de la arteriola eferente se desarrolla hipertensión glomerular e hiperfiltración favoreciendo a la proteinuria. Así, los  $\beta$ glucanos podrían ser considerados como una estrategia antiproteinúrica.

Los aumentos de ADAM17 podrían contribuir a la disminución del klotho de membrana en el túbulo renal. La inhibición de ADAM17 podría preservar el funcionamiento renal al mantener niveles más altos de  $\alpha$ -klotho renal en la membrana celular, un marcador de salud renal y cardiovascular, con acción fosfatúrica, antiinflamatoria y antioxidante (43). Sin embargo, su elevación fue insuficiente para mejorar la resistencia renal al FGF23 y eliminar el exceso de P circulante.

Por otra parte, al analizar las aortas de ratas con ERC se pudo observar que un tercio de ellas mostraban calcificación (al ser positivas a la tinción de Von Kossa) y que el contenido de Ca aórtico se correlacionó positivamente con nSMase2, corroborando lo que se conoce sobre la actividad de esta enzima que favorece la liberación de exosomas procalcificantes favoreciendo el depósito de Ca a nivel vascular (55). Las aortas inflamadas mostraron también un incremento del ARNm de

TNF $\alpha$  y de ADAM17, y, ambos se correlacionaron con el ARNm de nSMase2 y su actividad. Sin embargo, todas las aortas de ratas con ERC expuestas a  $\beta$ glucanos de cebada, fueron negativas a dicha tinción y presentaron escasos depósitos de Ca en relación a una disminución importante y significativa de más del 50%, de ARNm de TNF $\alpha$ , ADAM17 y nSMase2, así como de su actividad.

Se conoce que el estrés oxidativo ocurre desde estadios tempranos de ERC y que a medida que esta progresa, el estrés aumenta (207). Por otro lado, el estrés oxidativo forma parte de la fisiopatología de la aterosclerosis (208). Por todo ello se consideró importante evaluar el efecto de los  $\beta$ glucanos de cebada sobre el mismo, tanto en una línea celular de monocitos y macrófagos, RAW 264.7, como en un modelo de CMLV murino (A7r5) expuestos a LPS. Se vio que los Bglucanos previnieron completamente la producción de superóxido en los monocitos expuestos al estímulo de LPS y también disminuyó la producción basal del mismo a la mitad en células no expuestas a estímulos inflamatorios, efectos similares a los observados en los individuos sanos, lo que constituiría un hallazgo prometedor en prevención primaria. También se pudo apreciar que el estrés oxidativo aumenta la expresión génica de TNF $\alpha$ , ADAM17 y nSMase2 en células A7r5 expuestas y que estos cambios se correlacionan con pérdida del fenotipo contráctil vascular y aumentos en los marcadores de diferenciación osteogénica, es decir, disminución de  $\alpha$ -actina y aumento de Runx2 y Osterix. Al exponer simultáneamente a las células A7r5 a estrés oxidativo y a  $\beta$ glucanos, estos evitaron que aumente el ARN de nSMase2 de forma significativa y mantuvo los marcadores osteogénicos en niveles muy similares a los controles, aunque solo la prevención de elevaciones en Osterix fue estadísticamente significativa. Como se puede ver, el estrés oxidativo sería capaz de producir un cambio en el fenotipo de las CMLV de contráctil a osteogénico, el cual podría ser controlado por los  $\beta$ glucanos.

Estas mismas células, A7r5, al ser expuestas a suero urémico, mostraron elevación génica de TNF $\alpha$ , ADAM17 y Runx2. Los  $\beta$ glucanos evitaron todos estos cambios. El hecho de que no se hayan modificado la nSMase2 ni los otros marcadores osteogénicos lleva a pensar que existen varios factores que pueden influir en su fisiopatología. Uno de esos factores podría ser el estadio de ERC, ya que conforme progresa la enfermedad renal, la inflamación aumenta y disminuye el aclaramiento de dichas citoquinas, siendo esta situación más marcada en quienes realizan diálisis. Este hallazgo invita nuevamente a frenar la progresión de la ERC. Se ha descrito que la delección del gen murino Smpd3 que codifica la nSMase2 ocasiona una displasia esquelética grave (209). Es de destacar que la reducción de nSMase2 ejercida por los  $\beta$ glucanos, no alteró la mineralización ósea a juzgar por los valores de fosfatasa alcalina ósea.

Está descrito que la ingesta de  $\beta$ glucanos modifica la microbiota intestinal consiguiendo un cambio de proteolítico a fermentación sacarolítica que produce a su vez ácidos grasos de cadena corta a los



que se les ha atribuido propiedades antiinflamatorias y por tanto, la reducción del estrés oxidativo (184). Este estudio apoya esta descripción, sin embargo, se pudo constatar una acción directa de los  $\beta$ glucanos cuando realizamos el estudio ex vivo cultivando las CMLV. Se desconoce la manera en la que los  $\beta$ glucanos se internalizan en las células, aunque estudios aun no publicados corroboran la existencia de un aumento en el flujo autofágico inducido por los  $\beta$ glucanos. Este hecho no ha sido comunicado previamente, pero con este trabajo, se abriría el campo para futuras investigaciones en la contribución de la autofagia a las propiedades anticalcificantes de los  $\beta$ glucanos de cebada.

Durante el mes de ingesta diaria de  $\beta$ glucanos, sus niveles séricos se mantuvieron indetectables, aun cuando el consumo diario fuese efectivo para las acciones antiinflamatorias y de protección vasculorenal. De modo entonces que su eficacia no puede monitorizarse a través de sus niveles séricos, pero sí sería posible hacerlo mediante la evaluación de cambios en las distintas subpoblaciones leucocitarias asociadas independientemente a lesiones vasculares. Las células sanguíneas que estiman tempranamente daño vascular son: LDG, Tang y CD4+CD28null, todas ellas asociadas con alteraciones vasculares y, por ende, con RCV pero nunca antes analizadas en la ERC (102),(103),(104),(101).

Los LDG son un grupo celular complejo y no uniforme, cuya expresión está aumentada en enfermos renales en diálisis lo que corrobora un mayor grado de su condición inflamatoria sistémica. Se describen por primera vez, dos subpoblaciones de LDG, CD14<sup>low</sup>CD16+CD15+, que por sus características evidenciadas en la citometría de flujo y sus clusters de diferenciación, dilucidan a un fenotipo maduro y, CD14-CD16-CD15+, como un grupo de células inmaduras, con una fuerte correlación con la DEFA3, un marcador de granulopoyesis temprana, lo que sugiere la utilidad de la DEFA3 como un marcador de expansión de los LDG inmaduros circulantes, con un perfil inflamatorio más severo.

Los LDG y la DEFA3 guardan relación con disfunción endotelial y daño vascular (87). Por esta razón se analizó la asociación de ambos con el IK. El IK es una reconocida medida de CV cuyos valores por encima de 5, son considerados marcadores de CV con significado clínico (112). Se demuestra que la densidad de CD14-CD16-CD15+ circulantes, pero no la de CD14<sup>low</sup>CD16+CD15+, se asocia con CV en general y con un IK mayor a 5. Una contribución importante de este estudio es que la frecuencia de CD14-CD16-CD15+ circulantes no sólo predice CV de forma independiente, sino que aumenta la capacidad de predicción de CV tanto de la edad como la del tiempo en diálisis. Este hallazgo convertiría esta subpoblación de LDG en un biomarcador sensible del riesgo de CV.

Por otra parte, la correlación altamente significativa entre los niveles de mRNA de DEFA3 en PBMC con el IK, también sugiere que las mediciones del mRNA de DEFA3 en PBMC, una técnica

disponible en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos de rutina podrían utilizarse para estimar el riesgo de CV debida a incrementos de LDG, aun cuando no se disponga en el laboratorio clínico, de la alta metodología requerida para la cuantificación de los aumentos en la subpoblación de CD14-CD16-CD15+ de LDG por citometría de flujo.

Es relevante enfatizar que los mismos hallazgos ocurrieron en ambos tipos de TRS, HD y DP, lo que sugiere que el tipo de diálisis no tiene relación con este nuevo mecanismo inflamatorio en la ERC que incrementa el riesgo de CV.

La expansión de LDG inmaduros vinculados con propensión a CV se asociaron por primera vez con el "deterioro óseo" en pacientes de DP. Para ello, se analizaron las radiografías en búsqueda de fracturas y osteopenia y se agruparon a los pacientes según su presencia o ausencia. Se vio que la distribución por sexos es similar a la distribución general de los pacientes en diálisis (2/3 varones y 1/3 mujeres) (210). Como cabría esperar, el deterioro óseo, pese a ser una variable cualitativa, fue predominante en el sexo femenino, como así también la mayor prevalencia de fracturas.

El riesgo de fractura aumenta conforme avanza la ERC y el tipo de TRS influye en su comportamiento siendo menor en DP (189),(190). En este estudio, el 13% de pacientes en DP presentaron fracturas por fragilidad siendo mayoritariamente mujeres (75%). La misma influencia del sexo se vio al valorar osteopenia. Al agrupar fracturas y osteopenia bajo el término "deterioro óseo", vimos que éste fue tres veces mayor en mujeres, aunque representaran solamente un tercio de los participantes. Se sabe que el sexo femenino es un factor predictivo de fractura (191),(192).

Acompañando al sexo, la edad también fue diferente entre los pacientes con deterioro óseo, 10 años más, similar a los datos del estudio DOPPS (211).

En población general y en DP, se ha asociado la comorbilidad con el riesgo de fractura (212). Los pacientes que tuvieron deterioro óseo presentaron un mayor índice de Charlson, siendo estos hallazgos prevalentes en hombres.

En este trabajo, el IK elevado en los pacientes con deterioro óseo concuerda con el concepto que la "desmineralización ósea se asocia a mineralización vascular". Sin embargo, el IK no tuvo una contribución independiente de la edad y el sexo como posible factor determinante de deterioro óseo. Tampoco se evidenció una asociación entre deterioro óseo y los marcadores de actividad metabólica ósea, en consonancia con otros estudios donde solo la PTH se asoció débilmente al riesgo de fracturas en pacientes en diálisis (212),(213).

El status de vitamina D, claramente deficitario, y los niveles similares de 25-hidroxivitamina D entre los pacientes que tenían prescrito o no suplementación, respecto a los tratados con metabolitos activos, puede estar influenciado por el tiempo transcurrido entre la toma del fármaco y el análisis sanguíneo o errores en la toma.

La expansión exacerbada de LDG CD14-CD16-CD15+ se vinculó con el deterioro óseo. En el contexto de inflamación sistémica, se ha demostrado que los LDG CD14-CD16-CD15+ son liberados tempranamente desde la médula ósea a través de vasos transcorticales cuando hay aumentos en la resorción ósea mediada por osteoclastos (89). Aunque los LDG CD14-CD16-CD15+ son una fracción minoritaria de los neutrófilos, en un estudio en 2586 hombres, los individuos con menor densidad mineral ósea (DMO) presentaban un mayor recuento de neutrófilos, lo que sugiere una asociación inversa entre salud ósea y tasa de granulopoyesis (214). De hecho, Terraciano y colaboradores encontraron que mujeres postmenopáusicas con una DMO baja, presentaron concentraciones altas en saliva, de un tipo de defensina liberada por neutrófilos llamada DEFA1 (215).

Pese a que previamente se demostró la utilidad de mediciones de los niveles de RNA mensajero de la defensina 3 (DEFA3) en leucocitos mononucleares circulantes como un marcador certero de granulopoyesis temprana con expansión de los LDG inmaduros, LDG CD14-CD16-CD15+, en esta corte de pacientes, los niveles génicos de defensina 3 no se asociaron a mayor deterioro óseo.

Importante destacar además que, aunque el estudio se realizó en un estadio tardío de ERC, y que estos pacientes no solo llevaban en TRS un tiempo muy variable, de entre pocos meses a años, sino que también difieren de su función renal residual, tal y como evidencian sus distintos promedios de aclaramiento de urea y creatinina, estos resultados sugieren que la expansión de LDG es un fenómeno que ocurre de forma precoz y no conforme avanza el daño renal. Sin embargo, esta afirmación no ha sido adecuadamente validada aún, lo que constituye una limitante en nuestro estudio. Tal validación requeriría la reevaluación de estos hallazgos tanto en los aumentos en la subpoblación de LDG como en los niveles de mRNA de DEFA3 en pacientes en estadios más tempranos de ERC.

Con respecto a los linfocitos, se estudiaron por primera vez en la ERC, dos subconjuntos de linfocitos T (Tang y CD4+CD28null) correlacionándolos con varios métodos de evaluación de daño vascular. Los linfocitos CD4+CD28null se mostraron incrementados en la ERC y se asociaron fuertemente con la CV. Estas células se englobarían dentro del término SASP (del inglés, senescence-associated secretory phenotype) por ser células con fenotipo secretor asociado a senescencia debido a su capacidad para producir grandes cantidades de INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  que amplifican la inflamación participando en la destrucción de células endoteliales (96). Así, una inhibición de la actividad

funcional de TNF $\alpha$  resulta en una disminución de células CD4+CD28null, lo que constituye una diana terapéutica muy prometedora para controlar envejecimiento vascular en nuestros pacientes cuyos niveles de TNF $\alpha$  son superiores al límite normal (216).

Las células Tang, por su lado, se encuentran disminuidas en el paciente con ERC. Se conoce que esta subpoblación linfocitaria interviene en la salud del endotelio vascular y son fundamentales en la respuesta inmune a la aterosclerosis, por lo tanto, su depleción se asocia con resultados cardiovasculares adversos en enfermedades inmunomediadas según se ha documentado previamente (217),(103),(104),(218). Este estudio demuestra que los linfocitos Tang no solo descienden en el contexto de patologías autoinmunes sino en presencia de un síndrome inflamatorio crónico incluso, de bajo grado como el que acompaña a la ERC.

Además, se ha establecido en este estudio una correlación entre estas células inmunes con parámetros clínicos de daño cardiovascular. Se observa que, en este grupo poblacional, el descenso de Tang se asocia a niveles incrementados de troponina, un factor de riesgo CV establecido (219). Por otro lado, se conoce que el SCORE, una reconocida escala que agrupa múltiples factores de RCV tradicionales, predice enfermedad cardiovascular mortal a los 10 años y es una herramienta de fácil uso; sin embargo, una de sus limitaciones es que no predice riesgo de enfermedad no fatal (220). Este estudio muestra que las células Tang podrían predecir RCV mejor que el SCORE.

Se evidencia igualmente que su descenso se relaciona con marcadores de disfunción vascular precoces, sustitutos de ECV subclínica como son VOP y VVa.

Se conoce que, en la fisiopatología de la aterosclerosis, participan importantes moléculas tanto pro como antiangiogénicas siendo predominantes las primeras. Entre ellas tenemos principalmente a) el factor inducible por hipoxia (HIF) que estimula la neoformación de vasos, b) el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula la proliferación endotelial e hiperpermeabilidad capilar, c) el factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGF-1) que parece potenciar la acción de VEGF, d) la endotelina-1 (ET-1) que induce la expresión de VEGF en las CMLV, d) metaloproteasas (MMP) 2 y 9 que degradan la membrana basal facilitando la acción de VEGF, e) FGF-2 cuya presencia se ha hecho manifiesta en CMLV, células espumosas, microvasos de las placas y en las zonas de neovascularización; entre otros (221). Estas moléculas también se vinculan a la movilización de Tang (102).

Los resultados de este estudio concuerdan con el conocimiento científico actual que sugiere una asociación entre el aumento de densidad del VVa tanto carotídeo como femoral y la acumulación de células T en la adventicia (222),(102),(223). En vista de la sensibilidad de Tang para estimar daño

vascular, y a que no disponemos de modelos de estratificación de riesgo en la ERC, se podrían considerar estas células para reclasificar a estos pacientes en una categoría adecuada.

Se ve así, como las células T son heterogéneas y con un comportamiento distinto. Mientras que las células Tang se asociaron de forma independiente con aterosclerosis subclínica y funcionalidad vascular, los linfocitos CD4+CD28null lo hicieron con engrosamiento y CV.

La propuesta ecográfica realizada en este estudio, SMI, permite analizar la microvasculatura adventicial que es el paso previo al engrosamiento íntima-media y a la consiguiente aterosclerosis (224),(123). Se conoce por los estudios PESA y AWHS desarrollados en población sana, que el territorio donde aparece inicialmente la aterosclerosis subclínica es frecuentemente a nivel de las arterias femorales y este hallazgo tiene una alta sensibilidad para predecir calcificación coronaria (225),(111). En el año 2014, el estudio NEFRONA evaluó de forma prospectiva la prevalencia y progresión de aterosclerosis en una cohorte de pacientes con ERC, arrojando varios hallazgos, entre ellos, 1) los pacientes tienen mayor presencia de aterosclerosis en comparación con población sana, 2) no existe diferencia al analizarla en los distintos estadios de ERC, 3) los pacientes en DP curiosamente tienen un GIMc bajo por lo que este parámetro no nos sería de utilidad en este grupo poblacional, 4) aproximadamente el 50% de la población estudiada tenían afectación carotídea y femoral, y, 5) hasta el 17% presentó placas solamente en el territorio femoral (226),(227).

Todo ello llevó a analizar por primera vez la neovascularización de la capa adventicial de las arterias carotídea y femoral izquierdas apreciando una fuerte asociación entre el aumento de la densidad del VVa carotídeo y marcadores subrogados de daño vascular como son IK, VOP y cambios en subpoblaciones específicas de células inmunológicas. Con respecto al tramo femoral, los pacientes presentaban mayor densidad adventicial en comparación con los controles, aunque no se alcanzó significación estadística. Sin embargo, se vio una fuerte correlación negativa con Tang que, como se determinó en el estudio, predeciría CV subclínica.

Así, se consolidaría el concepto de que Tang parece ser un marcador aún más temprano que LDG y CD4+CD28null ya que se asocia a aumentos de la neovascularización de la adventicia, un fenómeno que precede al aumento del GIMc, cuya valoración en pacientes de alto RCV está recomendado por la AHA.

Este trabajo ha demostrado que el diagnóstico ecográfico del grado de neovascularización adventicial se puede realizar sin utilizar contraste, mediante SMI. Es un método inocuo y no invasivo, es económico, ahorra tiempo al compararlo con CEUS, y su principal ventaja es su sensibilidad en evaluar la microvasculatura, por lo que se podría realizar de forma rutinaria a todos los pacientes

sin exclusión alguna. Es decir, se podría implementar un rastreo ecográfico tanto a nivel carotídeo como femoral en enfermos renales desde estadios tempranos para establecer RCV valorando no solo placas o GIMc, sino también la neovascularización de la adventicia. Además, serviría como una medida de control, conforme abordamos los FRCV en el afán de frenar su progresión. El hecho de estudiar a pacientes catalogados de alto RCV y que hayan llegado a recibir una TRS sin haber tenido ECV previamente, nos obliga a adelantarnos en la evaluación de la afectación CV con métodos que están a nuestro alcance como es la ecografía.

Este trabajo también muestra por primera vez la utilidad del AF para predecir CV independientemente de la edad en pacientes en DP, y como marcador no solo de desnutrición sino también de inflamación y senescencia inmunológica.

La BIE es una herramienta utilizada en las unidades de diálisis para valorar primordialmente el estado de hidratación, por lo que ayudaría a establecer la dosis de diálisis (228),(229),(230). Menos frecuente es su uso en estimar cambios en el estado nutricional o su asociación con los componentes de síndrome MIA (135),(134).

El AF es considerado un marcador de supervivencia y son varios los FRCV que se han asociado a descensos en el AF por debajo de un determinado valor. En población sana, la causa principal de descensos en el AF es la edad, debido a cambios en la composición corporal a partir de los 50 años (231). Este estudio corrobora los descensos del AF con la edad y con el índice de comorbilidad de Charlson, un marcador clínico de envejecimiento y uno de los mejores predictores de mortalidad (232). El estudio de Abad y cols., en 164 enfermos renales en diálisis (127 en HD y 37 en DP) con un seguimiento de 6 años demostró que solo el AF y la comorbilidad ajustada por edad constituyen factores independientes de riesgo de mortalidad (233). El tiempo en diálisis es otro factor que condiciona la supervivencia del paciente incluso después de haber recibido un trasplante renal y también se asocia al AF (234),(235).

La malnutrición, altamente prevalente en DP, se presenta en el 68% de los pacientes estudiados. Las medidas de BIE guardan una estrecha correlación con los parámetros nutricionales, siendo el AF el predictor más potente de desnutrición (236). A su vez, la malnutrición se asocia con un riesgo cuatro veces mayor de desarrollar sarcopenia (237). En este trabajo, la masa magra estimada por LTI se correlacionó positivamente con el AF. El LTI medio en hombres fue de 16,2 [14,2, 17,9], y en las mujeres, de 12,8 [10,9, 16,8] sugestivo de sarcopenia según los criterios de la ESPEN. En los pacientes en DP la sarcopenia se asocia al sedentarismo y su principal determinante es el binomio desnutrición-inflamación, como sucede en las enfermedades crónicas (238),(237).

De los criterios analíticos de desnutrición, solamente las proteínas totales y la albúmina se correlacionaron con el AF. Es de tener en cuenta que la hipoalbuminemia es el reflejo no solo del estado nutricional sino también de la pérdida de proteínas por el efuente peritoneal y/o por un estado de sobrehidratación o inflamación (239),(240),(241). El rápido transporte peritoneal, presente en el 87% de los pacientes, podría justificar los niveles bajos de albúmina (242).

El estado de hidratación en litros, pero no el porcentaje de sobrehidratación medido por el índice OH/ECW se asoció al AF. Aunque es frecuente la sobrecarga de volumen (OH/ECW >15%) en pacientes en diálisis, solamente se vio en el 16% de los pacientes y puede deberse a que la gran mayoría, el 75%, conservaban una abundante diuresis residual ( $1.200 \pm 950$  ml/24 h) (243). Este trabajo señala también los principales marcadores del estado nutricional asociados significativamente a cambios en el AF.

En población general y en enfermos renales se ha establecido la relación entre el grado de inflamación y una disminución del AF (139). Este estudio muestra por primera vez la asociación del AF con dos poblaciones leucocitarias inflamatorias, los LDG CD14-CD16-CD15+ y los linfocitos CD4+CD28null vinculadas a CV. Ambos, secretan TNF $\alpha$  que también contribuye al catabolismo proteico causando la pérdida de masa muscular en estos pacientes (244).

También se encontró en estos pacientes una correlación inversa entre el AF y los niveles circulantes de IL-6 (R -0.44, p 0.01), similar a lo objetivado por Bebarashvili y cols., en una cohorte de pacientes en HD (245). Este trabajo apoya la utilidad de los descensos en el AF como predictores clínicos de inflamación. La inflamación a su vez se relaciona con la expansión de volumen extracelular con retención de agua y sodio, como demostraron Gangji y cols., al describir que los niveles de IL-6 en el líquido peritoneal se asocian con un estado de hiperhidratación por un incremento en la permeabilidad de la membrana peritoneal (246).

El binomio desnutrición-inflamación, medido por el AF, afecta al árbol vascular de los enfermos renales. Este nexo se demuestra en el estudio en DP de Sarmiento-Dias y cols., en 61 pacientes, en los que los aumentos en el AF se correlacionaron con aumentos en los niveles de fetuina A, un inhibidor de la CV, y con disminuciones de la PCR, de la velocidad de onda de pulso que indica rigidez arterial y también de la CV (141). Así mismo, en 131 pacientes en HD, Huang y cols. describieron que un peor estado nutricional se asociaba a mayor calcificación tanto aórtica como coronaria (140). En este estudio, el AF también mantuvo una correlación inversa con el daño vascular medido por el grado de rigidez arterial y de CV propiamente dicha, estimada con el IK y con los aumentos en las poblaciones de granulocitos LDG CD14-CD16-CD15+ y de linfocitos senescentes, ambos asociados a mayor RCV.

El síndrome MIA fue estudiado en más profundidad discriminando a los pacientes por  $AF \leq 4,5^\circ$  como lo hizo Huang y cols., al investigar supervivencia en 760 pacientes en DP (247). Se demuestra en este estudio que los pacientes con un  $AF \leq 4,5^\circ$  presentaban mayor grado de inflamación sistémica medida a través de aumentos tanto en los granulocitos LDG CD14-CD16-CD15+ como en los linfocitos senescentes, como así también en los niveles de fibrinógeno, un marcador de ECV y mortalidad comúnmente elevado en los pacientes con ERC sobre todo en DP y que, en este estudio está más asociado a los descensos de AF por debajo de  $4,5^\circ$  que otros marcadores de inflamación como la PCR o la IL-6 (248),(249),(250),(251).

Un hallazgo relevante es que en los pacientes con  $AF \leq 4,5^\circ$  los valores de IK son muy superiores al de los pacientes con  $AF > 4,5^\circ$ . Sin embargo, estos pacientes más calcificados son 10 años mayores. Para analizar la contribución independiente de los descensos de AF al grado de calcificación de la aorta abdominal, se efectuó un análisis de regresión logística ajustado por edad que corroboró los resultados del estudio de Sarmiento-Días y cols., en el que el AF predice CV en pacientes en DP, pero un aporte adicional muy importante como es la demostración de que esa estimación de riesgo vascular es independiente de la edad del paciente (141). Dado que el AF es un marcador de integridad celular, es posible que las disminuciones de AF reflejen el daño progresivo de las células del endotelio o de músculo liso vascular y, por tanto, su propensión a senescencia y calcificación.

En síntesis, en pacientes en DP, valores de  $AF \leq 4,5^\circ$  proveerían de un biomarcador no solo de desnutrición, sino también de inflamación sistémica y senescencia inmunológica, capaz de estimar el riesgo de CV independientemente de la edad, y, por tanto, las tasas de morbimortalidad, sobre todo en relación con eventos cardiovasculares graves como sucedió en 3 de los 4 fallecidos de este estudio. La evaluación del AF desde estadios tempranos de ERC podría proveer de una herramienta no invasiva, inocua, sencilla y accesible en las unidades de diálisis para evaluar cambios adversos en los FRCV en pacientes en DP.

Los inhibidores de  $TNF\alpha$  han mostrado reducir el RCV en enfermedades inmunomediadas como LES, psoriasis y AR, donde la primera causa de muerte es la ECV (252),(253),(254). Se trata de anticuerpos monoclonales (infliximab, adalimumab, golimumab y certolizumab) y una proteína de fusión (etanercept) aprobados para uso clínico, sin embargo, no están exentos de reacciones adversas. Se sabe que la terapia anti $TNF\alpha$  disminuye los linfocitos senescentes por lo que es posible postular que la ingesta de  $\beta$ glucanos también podría inhibir los aumentos en los linfocitos CD4+CD28null, cuya prevención podría ser monitorizada con mediciones del AF. De igual forma se podría valorar si son capaces de frenar y reducir los incrementos en LDG, productores de  $TNF\alpha$ . El AF es muy sensible al sufrimiento celular, por lo que su evaluación repetida nos alertaría sobre la situación basal de las células vasculares del paciente y la eficacia de su respuesta a la intervención destinada a la protección vascular.



Las guías KDIGO catalogan a los pacientes con ERC 3A-5D y CV, de “mayor RCV” y para llegar a dicho diagnóstico, sugieren realizar una radiografía abdominal lateral (65). Sin embargo, interesa implementar otras medidas como la ecografía ultrasensible sin contraste y la BIE que son más sensibles al daño vascular y de fácil uso, a manera de tamizaje y de control del RCV.

Este trabajo demuestra que marcadores de enfermedades inmunomediadas se encuentran elevados en los enfermos renales dejando entrever la importante afectación tanto del sistema innato como adquirido en estos pacientes, que contribuye a agravar el daño vascular y óseo. Además, propone nuevos marcadores para evaluar las acciones antiinflamatorias y anticalcificantes de los  $\beta$ glucanos, prescindiendo de sus niveles en circulación. Indudablemente, estos biomarcadores son a su vez sensibles para la detección de RCV precoz y deterioro óseo en el curso de la enfermedad renal.



# 6. CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. En la enfermedad renal experimental hiperfosfatémica, el alto grado de CV podría estar causado por aumentos en los niveles aórticos de dos componentes inflamatorios (TNF $\alpha$  y ADAM17) que estimulan la expresión y actividad de la nSMase2 responsable de la liberación de exosomas procalcificantes.
2. La ingesta diaria de  $\beta$ glucanos de cebada sería capaz de atenuar en un mes la CV al controlar los mecanismos de acción antes descritos. Esta acción se produce sin elevaciones detectables en los niveles de  $\beta$ glucanos de cebada circulantes, por lo que se requiere la identificación de biomarcadores alternativos de su eficacia antiinflamatoria.
3. En adultos con función renal normal, la ingesta diaria de  $\beta$ glucanos de cebada, a la dosis recomendada por la FDA y la EFSA (3 g) reduciría en una semana el grado de inflamación sistémica medido por a) la producción leucocitaria de radicales libres de oxígeno, b) la expresión de moléculas inflamatorias como TNF $\alpha$  y STING (un marcador de inflamación estéril, en respuesta a INF $\gamma$  y daño celular) y c) los niveles leucocitarios de nSMase2 asociada a envejecimiento y a propensión a CV. Las mediciones en leucocitos periféricos de cambios en la expresión génica de TNF $\alpha$ , ADAM17, STING y nSMase2 constituirían nuevos marcadores sensibles que permitirían personalizar la terapia con  $\beta$ glucanos de cebada para alcanzar la disminución deseada en el grado de inflamación sistémica y de envejecimiento inmunológico, responsables de la propensión a daño vascular en la población general y en el enfermo renal.
4. De las subpoblaciones leucocitarias podemos concluir que:
  - 4.1 Aumentos en la densidad de LDG CD14-CD16-CD15+, altamente inflamatorios en el enfermo renal, se correlacionan con el grado de CV de manera independiente a cambios en otros marcadores de inflamación sistémica, y, con el deterioro óseo independientemente de la edad y el sexo del paciente. Tal expansión no es aguda sino persistente en el tiempo. Además, los aumentos paralelos de LDG y en los niveles de RNA mensajero de defensina 3 en leucocitos circulantes constituirían un marcador subrogado de la expansión de LDG prescindiendo del uso de citometría de flujo compleja, no disponible en todos los hospitales.
  - 4.2 Aumentos en las células T senescentes CD4+CD28null constituirían un marcador de CV en ERC.
  - 4.3 La reducción de las células Tang circulantes podría ser considerado un marcador más sensible que el SCORE para estimar la propensión a aterosclerosis subclínica.

5. La detección de aumentos en la neovascularización de la adventicia carotídea, con la puesta a punto de la técnica de ecografía ultrasensible sin contraste, podría ser un método más sensible que el GIMc para predecir el grado de aterosclerosis subclínica. Su uso precoz, serviría como cribado de afectación vascular subclínica en estadios tempranos de ERC y también como medida de control frente al avance de FRCV y su progresión. Una limitación en la aplicación de esta técnica es que no está disponible en todas las unidades de diálisis.

6. En pacientes en DP, un valor de  $AF < 4,5^\circ$  podría ser considerado un biomarcador no solo de desnutrición, sino también de inflamación sistémica y senescencia inmunológica, capaz de estimar el riesgo de CV independientemente de la edad. Su evaluación desde estadios tempranos de ERC resulta en una herramienta no invasiva, inocua, sencilla y de fácil manejo en las unidades de diálisis y que permitiría el seguimiento de FRCV en el paciente.

7.  
LIMITACIONES Y  
FORTALEZAS DEL ESTUDIO,  
RETOS PARA  
EL FUTURO





# LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO, RETOS PARA EL FUTURO

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El pequeño tamaño muestral, tanto de individuos sanos como de pacientes en DP, debido a los criterios de exclusión, si bien es apropiado para determinar efectos precoces y no las interferencias debidas a otros procesos que alteren la inmunidad, pueden limitar la cuantificación real de la influencia de otras variables.

La contraindicación de cereales en la ERC por ser ricos en P y K podrían limitar la recomendación de  $\beta$ glucanos, sin embargo, se sabe que la cebada tiene una menor concentración de P y de K si la comparamos con la avena, y podríamos seguir las mismas recomendaciones de cocción de las verduras y legumbres para reducir aún más el contenido de estos electrolitos. En cuanto a su recomendación en población general, se debe tener presente su contraindicación en pacientes con enfermedad celíaca.

Los pacientes estudiados tenían un estadio tardío de ERC por lo que la validación de los hallazgos presentados debería realizarse en estadios más tempranos.

No hubo validación de las mediciones de neovascularización adventicial con SIM utilizando CEUS, el método actual de referencia.

Se empleó el algoritmo SCORE validado en población europea por lo que está limitado en otros grupos étnicos.

El deterioro óseo no fue evaluado con el patrón de oro, DXA, sino con la presencia de osteopenia radiológica y/o fracturas por fragilidad, siendo la resultante una variable categórica, con menor capacidad de mostrar una gradación de efectos.

## FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Se describe probable un nuevo mecanismo de CV en la ERC hiperfosfatémica y se demuestra que los  $\beta$ glucanos pueden contrarrestarlo.

Se muestra por primera vez un nuevo hallazgo en la farmacodinamia de los  $\beta$ glucanos, se trata de su acción directa en CMLV durante el estudio ex vivo.

Las células leucocitarias LDG, Tang y CD4+CD28null no han sido caracterizadas previamente en la ERC. Sus alteraciones contribuyen al conocimiento de la fisiopatología del sistema inmune en el enfermo renal.

Hasta el momento de la publicación del estudio, no se encontraron trabajos que evalúen la neovascularización de la adventicia con el método SMI. La ausencia de riesgos y su carácter inocuo lo convierte en un método innovador para la evaluación de daño vascular temprano en toda la población, incluida la ERC.

### RETOS PARA EL FUTURO

Evaluar si los  $\beta$ glucanos son capaces de reducir los niveles de TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , ADAM17, nSMase2 y STING en pacientes con ERC.

Evaluar si los  $\beta$ glucanos son capaces de reducir los niveles de LDG inmaduros y linfocitos CD4+CD28null en la ERC. De igual forma, se puede valorar si consiguesen reducir los linfocitos CD4+CD28null, marcadores de envejecimiento, en población general.

Estudiar si los  $\beta$ glucanos tuvieran un efecto positivo en las interferonopatías como el LES donde la nefropatía lúpica se presenta hasta en la mitad de los pacientes y hasta un 25% de ellos precisa de una TRS (255).

Monitorizar el efecto de los  $\beta$ glucanos mediante SMI y AF.

Determinar si la suplementación con extractos solubles de  $\beta$ glucanos (sin pan) tiene el mismo efecto que el contenido en la harina de granos de cebada. El efecto de los  $\beta$ glucanos depende de la dosis, los tipos de enlaces, el número de ramificaciones, el peso molecular, la viscosidad y la solubilidad. Los  $\beta$ glucanos de cebada tienen un alto peso molecular y baja solubilidad y precisamente son los  $\beta$ glucanos insolubles los que tienen un gran efecto en la respuesta inmune (256),(257).

Validar el SMI para valoración de la neovascularización adventicial. Una vez conseguido este objetivo, se podría estudiar el efecto y hacer el seguimiento de terapias antiangiogénicas para combatir la aterosclerosis.

Validar la asociación entre LDG CD14-CD16-CD15+ y deterioro óseo en enfermos renales mediante DXA.

8.  
REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS



## BIBLIOGRAFÍA

1. KDIGO\_2012\_CKD\_GL.pdf [Internet]. [cited 2022 Jan 20]. Available from: [https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO\\_2012\\_CKD\\_GL.pdf](https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf)
2. Zarraga S, García G, Teruel JL, Fernández Lucas M, Marcén R, Torrente J, et al. Elección de la modalidad de diálisis en la insuficiencia renal avanzada del paciente trasplantado renal. *Nefrología*. 2009 Mar 1;29:44–8.
3. García-Maset R, Bover J, Segura de la Morena J, Goicoechea Diezhandino M, Cebollada del Hoyo J, Escalada San Martín J, et al. Documento de información y consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2022 May 1;42(3):233–64.
4. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;17(7):2034–47.
5. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Circulation*. 2021 Mar 16;143(11):1157–72.
6. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11):e596–646.
7. Menon V, Gul A, Sarnak MJ. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Kidney International*. 2005 Oct 1;68(4):1413–8.
8. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 2011 Nov;121(11):4393–408.
9. Craver L, Dusso A, Martinez-Alonso M, Sarro F, Valdivielso JM, Fernández E. A low fractional excretion of Phosphate/Fgf23 ratio is associated with severe abdominal Aortic calcification in stage 3 and 4 kidney disease patients. *BMC Nephrology*. 2013 Oct 12;14(1):221.
10. Centeno PP, Herberger A, Mun HC, Tu C, Nemeth EF, Chang W, et al. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat Commun*. 2019 Oct 16;10(1):4693.
11. Brown AJ, Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA. Decreased calcium-sensing receptor expression in hyperplastic parathyroid glands of uremic rats: role of dietary phosphate. *Kidney Int*. 1999 Apr;55(4):1284–92.
12. Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Secondary hyperparathyroidism is associated with higher mortality in men with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney International*. 2008 Jun 1;73(11):1296–302.
13. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Díaz-Lopez JB, Díaz-Corte C, Cannata-Andía JB, et al. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Jan;24(1):239–46.

14. Duque EJ, Elias RM, Moysés RMA. Parathyroid Hormone: A Uremic Toxin. *Toxins (Basel)*. 2020 Mar 17;12(3):E189.
15. Neves KR, Gracioli FG, dos Reis LM, Gracioli RG, Neves CL, Magalhães AO, et al. Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. 2007 Jun;71(12):1262–70.
16. Dusso AS, Bauerle KT, Bernal-Mizrachi C. Non-classical Vitamin D Actions for Renal Protection. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 7;8:790513.
17. Shroff R, Egerton M, Bridel M, Shah V, Donald AE, Cole TJ, et al. A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jun;19(6):1239–46.
18. Cipriani C, Pepe J, Colangelo L, Minisola S. Vitamin D and Secondary Hyperparathyroid States. *Front Horm Res*. 2018;50:138–48.
19. Naves-Díaz M, Cabezas-Rodríguez I, Barrio-Vázquez S, Fernández E, Díaz-López JB, Cannata-Andía JB. Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporos Int*. 2012 Mar;23(3):1177–82.
20. Rodríguez García M, Gómez Alonso C, Naves Díaz M, Díaz López JB, Megido J, Gago E, et al. [Prevalence of vertebral fractures and aortic calcifications in hemodialysis patients: comparison with a population of the same age and sex]. *Nefrología*. 2003;23 Suppl 2:106–11.
21. Nakano C, Hamano T, Fujii N, Matsui I, Tomida K, Mikami S, et al. Combined use of vitamin D status and FGF23 for risk stratification of renal outcome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 May;7(5):810–9.
22. Santamaría R, Díaz-Tocados JM, Pendón-Ruiz de Mier MV, Robles A, Salmerón-Rodríguez MD, Ruiz E, et al. Increased Phosphaturia Accelerates The Decline in Renal Function: A Search for Mechanisms. *Sci Rep*. 2018 Sep 12;8(1):13701.
23. Ketteler M, Giachelli C. Novel insights into vascular calcification. *Kidney Int Suppl*. 2006 Dec;(105):S5-9.
24. E. FERNÁNDEZ GIRÁLDEZ. El «asesino silencioso» actúa temprano. *Nefrología*. 2003 Oct 1;23(5):377–80.
25. Górriz JL, Molina P, Cerverón MJ, Vila R, Bover J, Nieto J, et al. Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Apr 7;10(4):654–66.
26. Yamada S, Giachelli CM. Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone*. 2017 Jul;100:87–93.
27. Bose S, French S, Evans FJ, Joubert F, Balaban RS. Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):39155–65.
28. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2001 Apr 20;495(1–2):12–5.

29. Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Oca AM de, Estepa JC, Canalejo R, et al. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ $\beta$ -catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Oct 15;303(8):F1136-1144.
30. Voelkl J, Lang F, Eckardt KU, Amann K, Kuro-o M, Pasch A, et al. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(11):2077–91.
31. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jun;294(6):F1381-1387.
32. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros M, Herrera H, García J. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Oct;4(10):1646–54.
33. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):168–75.
34. Valdivielso JM, Rodríguez-Puyol D, Pascual J, Barrios C, Bermúdez-López M, Sánchez-Niño MD, et al. Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease: More, Less, or Just Different? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 Oct;39(10):1938–66.
35. Mulligan-Kehoe MJ. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Feb;298(2):H295-305.
36. Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J*. 2012 Feb 15;31(4):842–55.
37. McCullough PA, Agrawal V, Danielewicz E, Abela GS. Accelerated Atherosclerotic Calcification and Mönckeberg's Sclerosis: A Continuum of Advanced Vascular Pathology in Chronic Kidney Disease. *CJASN*. 2008 Nov 1;3(6):1585–98.
38. Chen NX, Kiattisunthorn K, O'Neill KD, Chen X, Moorthi RN, Gattone VH, et al. Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD). *PLoS One*. 2013;8(5):e64558.
39. Guo Y, He X, Zhang M, Qu Y, Gu C, Ren M, et al. Reciprocal control of ADAM17/EGFR/Akt signaling and miR-145 drives GBM invasiveness. *J Neurooncol*. 2020 Apr;147(2):327–37.
40. Ay R, E MM, V MLM, L H, Ms D, J B, et al. Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS one* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jun 6];7(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23094093/>
41. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009 Aug 6;460(7256):705–10.

42. Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, M'Baya-Moutoula E, Djelouat M seif el I, Louvet L, Bugnicourt JM, et al. Possible involvement of microRNAs in vascular damage in experimental chronic kidney disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1842(1):88–98.
43. Dusso AS, Bauerle KT, Bernal-Mizrachi C. Non-classical Vitamin D Actions for Renal Protection. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:790513.
44. Schumacher N, Rose-John S. ADAM17 Activity and IL-6 Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 5;11(11):1736.
45. Sommer A, Düppe M, Baumecker L, Kordowski F, Büch J, Chico JF, et al. Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF- $\alpha$ -induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding. *Oncotarget*. 2017 Aug 7;8(42):72584–96.
46. Yu Z, Seya K, Daitoku K, Motomura S, Fukuda I, Furukawa KI. Tumor necrosis factor- $\alpha$  accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Apr;337(1):16–23.
47. Palau V, Riera M, Duran X, Valdivielso JM, Betriu A, Fernández E, et al. Circulating ADAMs are associated with renal and cardiovascular outcomes in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2020 Jan 1;35(1):130–8.
48. Filosto S, Fry W, Knowlton AA, Goldkorn T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B). *J Biol Chem*. 2010 Apr 2;285(14):10213–22.
49. Nikolova-Karakashian M, Karakashian A, Rutkute K. Role of neutral sphingomyelinases in aging and inflammation. *Subcell Biochem*. 2008;49:469–86.
50. Lallemand T, Rouahi M, Swiader A, Grazide MH, Geoffre N, Alayrac P, et al. nSMase2 (Type 2-Neutral Sphingomyelinase) Deficiency or Inhibition by GW4869 Reduces Inflammation and Atherosclerosis in Apoe $^{-/-}$  Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Jul;38(7):1479–92.
51. Bardeesi ASA, Gao J, Zhang K, Yu S, Wei M, Liu P, et al. A novel role of cellular interactions in vascular calcification. *J Transl Med*. 2017 May 3;15:95.
52. Clarke CJ, Truong TG, Hannun YA. Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1384–96.
53. Lallemand T, Rouahi M, Swiader A, Grazide MH, Geoffre N, Alayrac P, et al. nSMase2 (Neutral Sphingomyelinase-2) Deficiency or Inhibition by GW4869 Reduces Inflammation and Atherosclerosis in Apoe $^{-/-}$  Mice. :31.



54. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*. 2015 Apr 10;116(8):1312–23.
55. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*. 2015 Apr 10;116(8):1312–23.
56. Pham PT, Fukuda D, Nishimoto S, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Takahashi Y, et al. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases. *Eur Heart J*. 2021 Nov 7;42(42):4336–48.
57. Cai D, Liu H, Wang J, Hou Y, Pang T, Lin H, et al. Balasubramide derivative 3C attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: role of AMPK-STAT1-STING signaling pathway. *Aging (Albany NY)*. 2021 Apr 26;13(8):12160–78.
58. Fernández-Martín JL, Martínez-Cambor P, Dionisi MP, Floege J, Ketteler M, London G, et al. Improvement of mineral and bone metabolism markers is associated with better survival in haemodialysis patients: the COSMOS study. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Sep;30(9):1542–51.
59. Shinaberger CS, Greenland S, Kopple JD, Van Wyck D, Mehrotra R, Kovesdy CP, et al. Is controlling phosphorus by decreasing dietary protein intake beneficial or harmful in persons with chronic kidney disease? *Am J Clin Nutr*. 2008 Dec;88(6):1511–8.
60. Ruospo M, Palmer SC, Natale P, Craig JC, Vecchio M, Elder GJ, et al. Phosphate binders for preventing and treating chronic kidney disease mineral and bone disorder (CKD MBD). *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Aug 22;2018(8):CD006023.
61. Bover Sanjuán J, Navarro-González JF, Arenas MD, Torregrosa JV, Tamargo Menéndez J, de Francisco ALM, et al. Pharmacological interactions of phosphate binders. *Nefrología (English Edition)*. 2018 Nov 1;38(6):573–8.
62. Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL, Locatelli F, London G, Gorris JL, Floege J, et al. Use of phosphate-binding agents is associated with a lower risk of mortality. *Kidney Int*. 2013 Nov;84(5):998–1008.
63. Hauser AB, Azevedo IRF, Gonçalves S, Stinghen A, Aita C, Pecoits-Filho R. Sevelamer carbonate reduces inflammation and endotoxemia in an animal model of uremia. *Blood Purif*. 2010;30(3):153–8.
64. Zhou Z, Ji Y, Ju H, Chen H, Sun M. Circulating Fetuin-A and Risk of All-Cause Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol*. 2019;10:966.
65. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) - PubMed [Internet]. [cited 2022 Aug 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30675420/>
66. Sharma S, Gupta A. Adynamic bone disease: Revisited. *Nefrología*. 2022 Jan 1;42(1):8–14.

67. Asci G, Ok E, Savas R, Ozkahya M, Duman S, Toz H, et al. The link between bone and coronary calcifications in CKD-5 patients on haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011 Mar 1;26(3):1010–5.
68. Barreto DV, Barreto FC, Carvalho AB, Cuppari L, Cendoroglo M, Draibe SA, et al. Coronary calcification in hemodialysis patients: The contribution of traditional and uremia-related risk factors. *Kidney International*. 2005 Apr 1;67(4):1576–82.
69. Westerberg PA, Sterner G, Ljunggren Ö, Isaksson E, Elvarson F, Dezfoolian H, et al. High doses of cholecalciferol alleviate the progression of hyperparathyroidism in patients with CKD Stages 3-4: results of a 12-week double-blind, randomized, controlled study. *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Mar 1;33(3):466–71.
70. Vieth R. Vitamin D supplementation: cholecalciferol, calcifediol, and calcitriol. *Eur J Clin Nutr*. 2020 Nov;74(11):1493–7.
71. Górriz JL, Molina P, Bover J, Barril G, Martín-de Francisco AL, Caravaca F, et al. Characteristics of bone mineral metabolism in patients with stage 3-5 chronic kidney disease not on dialysis: results of the OSERCE study. *Nefrología*. 2013 Jan 18;33(1):46–60.
72. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1911–30.
73. Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, et al. Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018 Jan;175:125–35.
74. Heaney RP, Armas LAG, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am J Clin Nutr*. 2008 Jun;87(6):1738–42.
75. F D, Me RO, Y D, M R, Jp D, A A. Vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *American journal of nephrology [Internet]*. 2013 [cited 2022 Jun 6];37(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23467111/>
76. Moe SM, Chertow GM, Parfrey PS, Kubo Y, Block GA, Correa-Rotter R, et al. Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. *Circulation*. 2015 Jul 7;132(1):27–39.
77. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of Patients Undergoing Hemodialysis with Paricalcitol or Calcitriol Therapy. *N Engl J Med*. 2003 Jul 31;349(5):446–56.
78. Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Battle D. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2003 Apr;63(4):1483–90.
79. Guerrero F, Montes de Oca A, Aguilera-Tejero E, Zafra R, Rodríguez M, López I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated with inflammation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012 Jun 1;27(6):2206–12.

80. Palmer SC, Hayen A, Macaskill P, Pellegrini F, Craig JC, Elder GJ, et al. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011 Mar 16;305(11):1119–27.
81. Hénaut L, Boudot C, Massy ZA, Lopez-Fernandez I, Dupont S, Mary A, et al. Calcimimetics increase CaSR expression and reduce mineralization in vascular smooth muscle cells: mechanisms of action. *Cardiovasc Res*. 2014 Feb 1;101(2):256–65.
82. Cunningham J, Danese M, Olson K, Klassen P, Chertow GM. Effects of the calcimimetic cinacalcet HCl on cardiovascular disease, fracture, and health-related quality of life in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1793–800.
83. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 2008 Feb;73(3):300–7.
84. Floege J, Kubo Y, Floege A, Chertow GM, Parfrey PS. The Effect of Cinacalcet on Calcific Uremic Arteriolopathy Events in Patients Receiving Hemodialysis: The EVOLVE Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 May 7;10(5):800–7.
85. Lau WL, Obi Y, Kalantar-Zadeh K. Parathyroidectomy in the Management of Secondary Hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018 Jun 7;13(6):952–61.
86. Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum*. 1986 Nov;29(11):1334–42.
87. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2013 Jul;35(4):455–63.
88. Willeke P, Schlüter B, Schotte H, Erren M, Mickholz E, Domschke W, et al. Increased frequency of GM-CSF secreting PBMC in patients with active systemic lupus erythematosus can be reduced by immunoadsorption. *Lupus*. 2004;13(4):257–62.
89. Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, et al. A network of transcortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nat Metab*. 2019 Feb;1(2):236–50.
90. Teague HL, Varghese NJ, Tsoi LC, Dey AK, Garshick MS, Silverman JI, et al. Neutrophil Subsets, Platelets, and Vascular Disease in Psoriasis. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Feb;4(1):1–14.
91. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):3284–97.
92. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2011 Jul 1;187(1):538–52.

93. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003 Mar 17;197(6):711–23.
94. Cowland JB, Borregaard N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol*. 1999 Dec;66(6):989–95.
95. Liuzzo G, Biasucci LM, Trota G, Brugaletta S, Pinnelli M, Digianuario G, et al. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 9;50(15):1450–8.
96. Dumitriu IE. The life (and death) of CD4+ CD28(null) T cells in inflammatory diseases. *Immunology*. 2015 Oct;146(2):185–93.
97. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002 Feb 5;105(5):570–5.
98. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol*. 2007 Nov 15;179(10):6514–23.
99. Yadav AK, Jha V. CD4+CD28null cells are expanded and exhibit a cytolytic profile in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011 May 1;26(5):1689–94.
100. Betjes MGH, de Wit EEA, Weimar W, Litjens NHR. Circulating pro-inflammatory CD4posCD28null T cells are independently associated with cardiovascular disease in ESRD patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Nov;25(11):3640–6.
101. de Boer SA, Reijrink M, Abdulhad WH, Hoekstra ES, Slart RHJA, Heerspink HJL, et al. Angiogenic T cells are decreased in people with type 2 diabetes mellitus and recruited by the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor Linagliptin: A subanalysis from a randomized, placebo controlled trial (RELEASE study). *Diabetes Obes Metab*. 2020 Jul;22(7):1220–5.
102. Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, et al. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies. *Circulation*. 2007 Oct 9;116(15):1671–82.
103. López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Caminal-Montero L, Suarez A. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Leukoc Biol*. 2016 Mar;99(3):405–12.
104. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Ballina-García FJ, Suárez A. Angiogenic T cells are decreased in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2015 May;74(5):921–7.
105. Estándares SEA 2022 para el control global del riesgo cardiovascular [Internet]. [cited 2022 Sep 26]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-pdf-S0214916821001571>

106. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of Carotid Ultrasound to Identify Subclinical Vascular Disease and Evaluate Cardiovascular Disease Risk: A Consensus Statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2008 Feb 1;21(2):93–111.
107. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986 Dec;74(6):1399–406.
108. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34(4):290–6.
109. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt B):2935–59.
110. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press*. 2014 Feb;23(1):3–16.
111. Laclaustra M, Casasnovas JA, Fernández-Ortiz A, Fuster V, León-Latre M, Jiménez-Borreguero LJ, et al. Femoral and Carotid Subclinical Atherosclerosis Association With Risk Factors and Coronary Calcium: The AWHs Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 22;67(11):1263–74.
112. Verbeke F, Van Biesen W, Honkanen E, Wikström B, Jensen PB, Krzesinski JM, et al. Prognostic value of aortic stiffness and calcification for cardiovascular events and mortality in dialysis patients: outcome of the calcification outcome in renal disease (CORD) study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Jan;6(1):153–9.
113. Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2012 Jan 1;65(1):80–90.
114. Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, et al. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Feb 25;63(7):636–46.
115. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2018 Oct;36(10):1953–2041.
116. Briet M, Boutouyrie P, Laurent S, London GM. Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD. *Kidney Int*. 2012 Aug;82(4):388–400.

117. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values.' *Eur Heart J.* 2010 Oct;31(19):2338–50.
118. Burns PN, Wilson SR, Simpson DH. Pulse inversion imaging of liver blood flow: improved method for characterizing focal masses with microbubble contrast. *Invest Radiol.* 2000 Jan;35(1):58–71.
119. Piscaglia F, Nolsøe C, Dietrich CF, Cosgrove DO, Gilja OH, Nielsen MB, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): Update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall Med.* 2012 Feb;33(1):33–59.
120. Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, Marrocco-Trischitta MM, Melisurgo G, Mauriello A, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries: correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jul 15;52(3):223–30.
121. Giannoni MF, Vicenzini E, Citone M, Ricciardi MC, Irace L, Laurito A, et al. Contrast carotid ultrasound for the detection of unstable plaques with neoangiogenesis: a pilot study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009 Jun;37(6):722–7.
122. Pereira T, Muguruza J, Mária V, Vilaprinyo E, Sorribas A, Fernandez E, et al. Automatic Methods for Carotid Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging Quantification of Adventitial Vasa Vasorum. *Ultrasound Med Biol.* 2018 Dec;44(12):2780–92.
123. Arcidiacono MV, Rubinat E, Borrás M, Betriu A, Trujillano J, Vidal T, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors. *Cardiovascular Ultrasound [Internet].* 2015 [cited 2022 Jan 30];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404263/>
124. Fu Z, Zhang J, Lu Y, Wang S, Mo X, He Y, et al. Clinical Applications of Superb Microvascular Imaging in the Superficial Tissues and Organs: A Systematic Review. *Acad Radiol.* 2021 May;28(5):694–703.
125. Sato W, Suto Y, Yamanaka T, Watanabe H. An advanced ultrasound application used to assess peripheral vascular diseases: superb microvascular imaging. *J Echocardiogr.* 2021 Sep;19(3):150–7.
126. Jiang ZZ, Huang YH, Shen HL, Liu XT. Clinical Applications of Superb Microvascular Imaging in the Liver, Breast, Thyroid, Skeletal Muscle, and Carotid Plaques. *J Ultrasound Med.* 2019 Nov;38(11):2811–20.
127. Zhang H, Du J, Wang H, Wang H, Jiang J, Zhao J, et al. Comparison of diagnostic values of ultrasound micro-flow imaging and contrast-enhanced ultrasound for neovascularization in carotid plaques. *Exp Ther Med.* 2017 Jul;14(1):680–8.
128. Jasionyte G, Seskute G, Ruginė R, Butrimienė I. The Promising Role of a Superb Microvascular Imaging Technique in the Evaluation of Raynaud's Syndrome in Systemic Sclerosis: Theory and Practical Challenges. *Diagnosics.* 2021 Oct;11(10):1743.

129. Soeters PB, Reijnen PLM, van Bokhorst-de van der Schueren MAE, Schols JMGA, Halfens RJG, Meijers JMM, et al. A rational approach to nutritional assessment. *Clin Nutr.* 2008 Oct;27(5):706–16.

130. Heimbürger O, Qureshi AR, Blarer WS, Berglund L, Stenvinkel P. Hand-grip muscle strength, lean body mass, and plasma proteins as markers of nutritional status in patients with chronic renal failure close to start of dialysis therapy. *Am J Kidney Dis.* 2000 Dec;36(6):1213–25.

131. Carrero JJ, Thomas F, Nagy K, Arogundade F, Avesani CM, Chan M, et al. Global Prevalence of Protein-Energy Wasting in Kidney Disease: A Meta-analysis of Contemporary Observational Studies From the International Society of Renal Nutrition and Metabolism. *J Ren Nutr.* 2018 Nov;28(6):380–92.

132. Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, Cano N, Chauveau P, Cuppari L, et al. A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008 Feb;73(4):391–8.

133. Gracia-Iguacel C, González-Parra E, Barril-Cuadrado G, Sánchez R, Egido J, Ortiz-Ardúan A, et al. Definiendo el síndrome de desgaste proteico energético en la enfermedad renal crónica: prevalencia e implicaciones clínicas. *Nefrología.* 2014 Jul 1;34(4):507–19.

134. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Jul;15(7):953–60.

135. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 May;55(5):1899–911.

136. Leal-Alegre G, Lerma C, Leal-Escobar G, Moguel-González B, Martínez-Vázquez KB, Cano-Escobar KB. Relationship between Vascular Calcification, Protein-Energy Wasting Syndrome, and Sarcopenia in Maintenance Automated Peritoneal Dialysis. *Life (Basel).* 2021 Jul 7;11(7):666.

137. Do JY, Kim AY, Kang SH. Association Between Phase Angle and Sarcopenia in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Front Nutr.* 2021 Sep 24;8:742081.

138. Tomeleri CM, Cavaglieri CR, de Souza MF, Cavalcante EF, Antunes M, Nabucco HCG, et al. Phase angle is related with inflammatory and oxidative stress biomarkers in older women. *Experimental Gerontology.* 2018 Feb 1;102:12–8.

139. Barrea L, Muscogiuri G, Pugliese G, Laudisio D, de Alteriis G, Graziadio C, et al. Phase Angle as an Easy Diagnostic Tool of Meta-Inflammation for the Nutritionist. *Nutrients.* 2021 Apr 24;13(5):1446.

140. Huang Y, Ge Y, Li F, Zhang C, Zhang Z, Xu N, et al. Elucidating the relationship between nutrition indices and coronary artery calcification in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Ther Apher Dial.* 2022 Feb;26(1):71–84.

141. Sarmiento-Dias M, Santos-Araújo C, Poínhos R, Oliveira B, Sousa M, Simões-Silva L, et al. Phase Angle Predicts Arterial Stiffness and Vascular Calcification in Peritoneal Dialysis Patients. *Perit Dial Int.* 2017 Aug;37(4):451–7.
142. Piccoli A. Identification of operational clues to dry weight prescription in hemodialysis using bioimpedance vector analysis. The Italian Hemodialysis-Bioelectrical Impedance Analysis (HD-BIA) Study Group. *Kidney Int.* 1998 Apr;53(4):1036–43.
143. Lee SY, Lee YJ, Yang JH, Kim CM, Choi WS. The Association between Phase Angle of Bioelectrical Impedance Analysis and Survival Time in Advanced Cancer Patients: Preliminary Study. *Korean J Fam Med.* 2014 Sep;35(5):251–6.
144. Wi JH, Heo CH, Gwak H, Jung C, Kim SY. Probing Physical Properties of the Cellular Membrane in Senescent Cells by Fluorescence Imaging. *J Phys Chem B.* 2021 Sep 16;125(36):10182–94.
145. Tchkonina T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013 Mar 1;123(3):966–72.
146. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev.* 2019 Apr 1;99(2):1047–78.
147. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003 Jun;24(11):987–1003.
148. Kelly JT, Su G, Zhang L, Qin X, Marshall S, González-Ortiz A, et al. Modifiable Lifestyle Factors for Primary Prevention of CKD: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Soc Nephrol.* 2021 Jan;32(1):239–53.
149. Food Labeling: Health Claims; Oats and Coronary Heart Disease [Internet]. Federal Register. 1997 [cited 2022 Sep 28]. Available from: <https://www.federalregister.gov/documents/1997/01/23/97-1598/food-labeling-health-claims-oats-and-coronary-heart-disease>
150. Skendi A, Biliaderis CG, Papageorgiou M, Izydorczyk MS. Effects of two barley -glucan isolates on wheat flour dough and bread properties. *Food Chemistry.* 2010 Apr 1;119(3):1159–67.
151. Kao PF, Wang SH, Hung WT, Liao YH, Lin CM, Yang WB. Structural Characterization and Antioxidative Activity of Low-Molecular-Weights Beta-1,3-Glucan from the Residue of Extracted *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:673764.
152. Pushkareva M, Obeid LM, Hannun YA. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol Today.* 1995 Jun;16(6):294–7.
153. Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis.* 2003 Feb 15;187(4):710–3.



154. No H, Kim J, Seo CR, Lee DE, Kim JH, Kuge T, et al. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -1,3-1,6-glucan derived from black yeast *Aureobasidium pullulans* in RAW264.7 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021 Dec 15;193:592–600.
155. Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen FE. Oral and systemic administration of  $\beta$ -glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr;148(1):168–77.
156. Iraz M, Bilgic S, Samdanci E, Ozerol E, Tanbek K, Iraz M. Preventive and early therapeutic effects of  $\beta$ -glucan on the bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Apr;19(8):1505–16.
157. Mosikanon K, Arthan D, Kettawan A, Tungtrongchitr R, Prangthip P. Yeast  $\beta$ -Glucan Modulates Inflammation and Waist Circumference in Overweight and Obese Subjects. *J Diet Suppl*. 2017 Mar 4;14(2):173–85.
158. Zabriskie HA, Blumkaitis JC, Moon JM, Currier BS, Stefan R, Ratliff K, et al. Yeast Beta-Glucan Supplementation Downregulates Markers of Systemic Inflammation after Heated Treadmill Exercise. *Nutrients*. 2020 Apr 19;12(4):1144.
159. Aarsæther E, Rydningen M, Einar Engstad R, Busund R. Cardioprotective effect of pretreatment with  $\beta$ -glucan in coronary artery bypass grafting. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 2006 Jan 1;40(5):298–304.
160. Férrez Santander SM, Márquez MF, Peña Duque MA, Ocaranza Sánchez R, de la Peña Almaguer E, Eid Lidt G. Daño miocárdico por reperusión. *Rev Esp Cardiol*. 2004 Oct 2;57:9–21.
161. Brill A, Chauhan AK, Canault M, Walsh MT, Bergmeier W, Wagner DD. Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovasc Res*. 2009 Oct 1;84(1):137–44.
162. Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, et al. Cutting edge: TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol*. 2007 Sep 1;179(5):2686–9.
163. Ebrahim Z, Proost S, Tito RY, Raes J, Glorieux G, Moosa MR, et al. The Effect of  $\beta$ -Glucan Prebiotic on Kidney Function, Uremic Toxins and Gut Microbiome in Stage 3 to 5 Chronic Kidney Disease (CKD) Predialysis Participants: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*. 2022 Feb 14;14(4):805.
164. Hill E, Sapa H, Negrea L, Bame K, Hostetter T, Barkoukis H, et al. Effect of Oat  $\beta$ -Glucan Supplementation on Chronic Kidney Disease: A Feasibility Study. *Journal of Renal Nutrition*. 2020 May 1;30(3):208–15.
165. Cosola C, De Angelis M, Rocchetti MT, Montemurno E, Maranzano V, Dalfino G, et al. Beta-Glucans Supplementation Associates with Reduction in P-Cresyl Sulfate Levels and Improved Endothelial Vascular Reactivity in Healthy Individuals. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0169635.
166. Joyce SA, Kamil A, Fleige L, Gahan CGM. The Cholesterol-Lowering Effect of Oats and Oat Beta Glucan: Modes of Action and Potential Role of Bile Acids and the Microbiome. *Frontiers in Nutrition [Internet]*. 2019 [cited 2022 Feb 14];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2019.00171>

167. Alteraciones Lipídicas en la ERC | Nefrología al día [Internet]. [cited 2022 Feb 14]. Available from: <http://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-alteraciones-lipidicas-erc-275>
168. Pelisek J, Hahntow IN, Eckstein HH, Ockert S, Reeps C, Heider P, et al. Impact of chronic kidney disease on carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg*. 2011 Dec;54(6):1643–9.
169. Saremi A, Bahn G, Reaven PD. Progression of Vascular Calcification Is Increased With Statin Use in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes Care*. 2012 Nov;35(11):2390–2.
170. Rivner H, Denis R, Tang F, Marzouka GR. Abstract 17248: Statin Therapy Increases Coronary Artery Calcification Scores. *Circulation*. 2018 Nov 6;138(Suppl\_1):A17248–A17248.
171. Chen Z, Qureshi AR, Parini P, Hurt-Camejo E, Ripsweden J, Brismar TB, et al. Does statins promote vascular calcification in chronic kidney disease? *Eur J Clin Invest*. 2017 Feb;47(2):137–48.
172. Earnshaw SR, McDade CL, Chu Y, Fleige LE, Sievenpiper JL. Cost-effectiveness of Maintaining Daily Intake of Oat -Glucan for Coronary Heart Disease Primary Prevention. *Clinical Therapeutics*. 2017 Apr 1;39(4):804-818.e3.
173. Enfermedad Renal Diabética: Albuminuria y Progresión | Nefrología al día [Internet]. [cited 2022 Feb 14]. Available from: <http://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-enfermedad-diabetica-renal-albuminuria-progresion-292>
174. Zurbau A, Noronha JC, Khan TA, Sievenpiper JL, Wolever TMS. The effect of oat -glucan on postprandial blood glucose and insulin responses: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2021;75(11):1540–54.
175. Bayrak O, Turgut F, Karatas OF, Cimentepe E, Bayrak R, Catal F, et al. Oral beta-glucan protects kidney against ischemia/reperfusion injury in rats. *Am J Nephrol*. 2008;28(2):190–6.
176. Esrefoglu M, Tok OE, Aydin MS, Iraz M, Ozer OF, Selek S, et al. Effects of beta-glucan on protection of young and aged rats from renal ischemia and reperfusion injury. *BLL*. 2016;117(09):530–8.
177. Koc E, Reis KA, Ebinc FA, Pasaoglu H, Demirtas C, Omeroglu S, et al. Protective effect of beta-glucan on contrast induced-nephropathy and a comparison of beta-glucan with nebivolol and N-acetylcysteine in rats. *Clin Exp Nephrol*. 2011 Oct 1;15(5):658–65.
178. Turunen K, Tsouvelakidou E, Nomikos T, Mountzouris KC, Karamanolis D, Triantafyllidis J, et al. Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: a pilot study. *Anaerobe*. 2011 Dec;17(6):403–6.
179. Lucas S, Omata Y, Hofmann J, Böttcher M, Iljazovic A, Sarter K, et al. Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss. *Nat Commun*. 2018 Jan 4;9(1):55.

180. Wang S, Lv D, Jiang S, Jiang J, Liang M, Hou F, et al. Quantitative reduction in short-chain fatty acids, especially butyrate, contributes to the progression of chronic kidney disease. *Clinical Science*. 2019 Sep 10;133(17):1857–70.
181. Aizawa M, Watanabe K, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Grundler FMW, et al. Low Molecular-Weight Curdlan, (1-3)- $\beta$ -Glucan Suppresses TLR2-Induced RANKL-Dependent Bone Resorption. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(8):1282–5.
182. Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N, et al. A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet*. 2005 Aug;37(8):803–5.
183. Silva GC, Costa ED, Lemos VS, Queiroz-Junior CM, Pereira LJ. Experimental Periodontal Disease Triggers Coronary Endothelial Dysfunction in Middle-Aged Rats: Preventive Effect of a Prebiotic -Glucan. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021 Jul 13;76(8):1398–406.
184. Chan GCF, Chan WK, Sze DMY. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*. 2009 Jun 10;2:25.
185. Lehne G, Haneberg B, Gaustad P, Johansen PW, Preus H, Abrahamsen TG. Oral administration of a new soluble branched  $\beta$ -1,3-D-glucan is well tolerated and can lead to increased salivary concentrations of immunoglobulin A in healthy volunteers. *Clin Exp Immunol*. 2006 Jan;143(1):65–9.
186. Hoenigl M, Lin J, Finkelman M, Zhang Y, Karris MY, Letendre SL, et al. Glucan rich nutrition does not increase gut translocation of beta-glucan. *Mycoses*. 2021 Jan;64(1):24–9.
187. Sunamura EI, Iwasaki M, Shiina S, Kitahara SI, Yotani T, Manabe M, et al. A novel enzyme immunoassay for the measurement of plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels. *J Immunol Methods*. 2020 Dec;487:112872.
188. Moe SM, Nickolas TL. Fractures in Patients with CKD: Time for Action. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Nov 7;11(11):1929–31.
189. Dey V, Farrah TE, Traynor JP, Spalding EM, Robertson SE, Geddes CC. Symptomatic fracture risk in the renal replacement therapy population. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jul 1;32(7):1211–6.
190. Boonpheng B, Thongprayoon C, Mao MA, Wijarnpreecha K, Bathini T, Kaewput W, et al. Risk of hip fracture in patients on hemodialysis versus peritoneal dialysis: A meta-analysis of observational studies. *J Evid Based Med*. 2019 May;12(2):98–104.
191. Maravic M, Ostertag A, Torres PU, Cohen-Solal M. Incidence and risk factors for hip fractures in dialysis patients. *Osteoporos Int*. 2014 Jan;25(1):159–65.
192. Naylor KL, McArthur E, Leslie WD, Fraser LA, Jamal SA, Cadarette SM, et al. The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014 Oct;86(4):810–8.

193. Kazama JJ, Iwasaki Y, Fukagawa M. Uremic osteoporosis. *Kidney Int Suppl* (2011). 2013 Dec;3(5):446–50.
194. Szulc P. Vascular calcification and fracture risk. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2015 Aug;12(2):139–41.
195. Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med*. 2017 Sep;23(9):1072–9.
196. Bover J, Ureña-Torres P, Górriz JL, Lloret MJ, da Silva I, Ruiz-García C, et al. Calcificaciones cardiovasculares en la enfermedad renal crónica: Potenciales implicaciones terapéuticas. *Nefrología*. 2016 Nov 1;36(6):597–608.
197. Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y. Coronary Calcification in Patients with Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease. *CJASN*. 2009 Dec 1;4(12):1892–900.
198. López P, Rodríguez-Carrio J, Caminal-Montero L, Suárez A. Relationship Between T-Cell Exosomes and Cellular Subsets in SLE According to Type I IFN-Signaling. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Nov 30;7:604098.
199. Zhou H, Yao W, Pan D, Sun G. Predictational ability of phase angle on protein energy wasting in kidney disease patients with renal replacement therapy: A cross sectional study. *Food Sci Nutr*. 2021 May 7;9(7):3573–9.
200. una osteopenia radiológica | *Medicina Integral* [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-estadisticas-12959>
201. Oserce E nombre de los investigadores del estudio, Górriz JL, Molina P, Bover J, Barril G, Martín-de Francisco AL, et al. Características del metabolismo óseo y mineral en pacientes con enfermedad renal crónica en estadios 3-5 no en diálisis: resultados del estudio OSERCE. *Nefrología*. 2013 Jan 1;33(1):46–60.
202. Palau V, Pascual J, Soler MJ, Riera M. Role of ADAM17 in kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019 Aug 1;317(2):F333–42.
203. Filha R da Silva, Pinheiro SVB, Macedo e Cordeiro T, Feracin V, Vieira ÉLM, Miranda AS, et al. Evidence for a role of angiotensin converting enzyme 2 in proteinuria of idiopathic nephrotic syndrome. *Biosci Rep*. 2019 Jan 3;39(1):BSR20181361.
204. Klingel R, Dippold W, Störkel S, Meyer zum Büschenfelde KH, Köhler H. Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney, autosomal dominant polycystic kidney disease, and renal cell carcinoma. *Am J Kidney Dis*. 1992 Jan;19(1):22–30.
205. Dell KM, Nemo R, Sweeney WE, Levin JI, Frost P, Avner ED. A novel inhibitor of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme ameliorates polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2001 Oct;60(4):1240–8.
206. Bautista-Pérez R, del Valle-Mondragón L, Cano-Martínez A, Pérez-Méndez O, Escalante B, Franco M. Involvement of neutral sphingomyelinase in the angiotensin II signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 May 15;308(10):F1178–1187.

207. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1009–16.
208. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017 Sep 18;19(11):42.
209. Khavandgar Z, Poirier C, Clarke CJ, Li J, Wang N, McKee MD, et al. A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *J Cell Biol.* 2011 Jul 25;194(2):277–89.
210. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, et al. Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología.* 2018 Nov 1;38(6):606–15.
211. Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD, Bradbury BD, Robinson BM, Kerr PG, et al. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2014 Jan;85(1):166–73.
212. Ma MKM, Yap DYH, Yip TPS, Lui SL, Lo WK. Charlson co-morbidity index and albumin significantly associated with fracture risk in peritoneal dialysis patients. *Nephrology (Carlton).* 2013 May;18(5):365–8.
213. Danese MD, Kim J, Doan QV, Dylan M, Griffiths R, Chertow GM. PTH and the Risks for Hip, Vertebral, and Pelvic Fractures Among Patients on Dialysis. *American Journal of Kidney Diseases.* 2006 Jan 1;47(1):149–56.
214. Valderrábano RJ, Lui LY, Lee J, Cummings SR, Orwoll ES, Hoffman AR, et al. Bone Density Loss Is Associated with Blood Cell Counts. *J Bone Miner Res.* 2017 Feb;32(2):212–20.
215. Terracciano R, Migliaccio V, Savino R, Pujia A, Montalcini T. Association between low bone mineral density and increased  $\alpha$ -defensin in salivary fluid among postmenopausal women. *Menopause.* 2013 Dec;20(12):1275–9.
216. Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I, Brzosko M, Masiuk M, Machalinski B, et al. Therapy with infliximab decreases the CD4+CD28- T cell compartment in peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2004 Nov;24(6):351–4.
217. Cavazzana I, Piantoni S, Sciatti E, Fredi M, Taraborelli M, Bonadei I, et al. Relationship between endothelial dysfunction, videocapillaroscopy and circulating CD3+CD31+CXCR4+ lymphocytes in systemic lupus erythematosus without cardiovascular risk factors. *Lupus.* 2019 Feb;28(2):210–6.
218. Groyer E, Nicoletti A, Ait-Oufella H, Khallou-Laschet J, Varthaman A, Gaston AT, et al. Atheroprotective effect of CD31 receptor globulin through enrichment of circulating regulatory T-cells. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jul 24;50(4):344–50.
219. Saunders JT, Nambi V, de Lemos JA, Chambless LE, Virani SS, Boerwinkle E, et al. Cardiac Troponin T Measured by a Highly Sensitive Assay Predicts Coronary Heart Disease, Heart Failure, and Mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation.* 2011 Apr 5;123(13):1367–76.

220. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk | *European Heart Journal* | Oxford Academic [Internet]. [cited 2022 Feb 14]. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/41/1/111/5556353>
221. Ziegler T, Abdel Rahman F, Jurisch V, Kupatt C. Atherosclerosis and the Capillary Network; Pathophysiology and Potential Therapeutic Strategies. *Cells*. 2019 Dec 24;9(1):50.
222. Zorc-Pleskovi R, Pleskovi A, Vraspir-Porenta O, Zorc M, Milutinovi A. Immune cells and vasa vasorum in the tunica media of atherosclerotic coronary arteries. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018 Aug;18(3):240–5.
223. Díaz-Flores L, Madrid JF, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Díaz-Flores L. Cell contribution of vasa-vasorum to early arterial intimal thickening formation. *Histol Histopathol*. 2007 Dec;22(12):1379–86.
224. Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A, et al. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front Immunol*. 2018;9:706.
225. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, et al. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort. *Circulation*. 2015 Jun 16;131(24):2104–13.
226. Borràs M, Cambray S, Crespo-Masip M, Pérez-Fontán M, Bozic M, Bermudez-López M, et al. Peritoneal Dialysis Is an Independent Factor Associated to Lower Intima Media Thickness in Dialysis Patients Free From Previous Cardiovascular Disease. *Front Physiol*. 2018;9:1743.
227. Arroyo D, Betriu A, Martínez-Alonso M, Vidal T, Valdivielso JM, Fernández E. Observational multicenter study to evaluate the prevalence and prognosis of subclinical atheromatosis in a Spanish chronic kidney disease cohort: baseline data from the NEFRONA study. *BMC Nephrol*. 2014 Oct 18;15:168.
228. Ng JKC, Li PKT. Fluid management and bioimpedance study in peritoneal dialysis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2019 Jan;28(1):58–64.
229. Park JH, Jo YI, Lee JH. Clinical usefulness of bioimpedance analysis for assessing volume status in patients receiving maintenance dialysis. *Korean J Intern Med*. 2018 Jul;33(4):660–9.
230. Crepaldi C, Lamas EI, Martino FK, Rodighiero MP, Scalzotto E, Wojewodzka-Zeleznikowicz M, et al. Bioimpedance and brain natriuretic peptide in peritoneal dialysis patients. *Contrib Nephrol*. 2012;178:174–81.
231. Cederholm TE, Bauer JM, Boirie Y, Schneider SM, Sieber CC, Rolland Y. Toward a definition of sarcopenia. *Clin Geriatr Med*. 2011 Aug;27(3):341–53.
232. Bannay A, Chagnot C, Blotière PO, Basson M, Weill A, Ricordeau P, et al. The Best Use of the Charlson Comorbidity Index With Electronic Health Care Database to Predict Mortality. *Med Care*. 2016 Feb;54(2):188–94.

233. Abad S, Sotomayor G, Vega A, Pérez de José A, Verdalles U, Jofré R, et al. The phase angle of the electrical impedance is a predictor of long-term survival in dialysis patients. *Nefrología*. 2011;31(6):670–6.
234. Cosio FG, Alamir A, Yim S, Pesavento TE, Falkenhain ME, Henry ML, et al. Patient survival after renal transplantation: I. The impact of dialysis pre-transplant. *Kidney Int*. 1998 Mar;53(3):767–72.
235. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: A Paired Donor Kidney Analysis: 1. *Transplantation*. 2002 Nov 27;74(10):1377–81.
236. Rimsevicius L, Gincaite A, Vicka V, Sukackiene D, Pavinic J, Miglinas M. Malnutrition Assessment in Hemodialysis Patients: Role of Bioelectrical Impedance Analysis Phase Angle. *Journal of Renal Nutrition*. 2016 Nov 1;26(6):391–5.
237. Beaudart C, Sanchez-Rodriguez D, Locquet M, Reginster JY, Lengelé L, Bruyère O. Malnutrition as a Strong Predictor of the Onset of Sarcopenia. *Nutrients*. 2019 Nov 27;11(12):2883.
238. Cupisti A, D'Alessandro C, Finato V, Del Corso C, Catania B, Caselli GM, et al. Assessment of physical activity, capacity and nutritional status in elderly peritoneal dialysis patients. *BMC Nephrol*. 2017 May 30;18(1):180.
239. Blumenkrantz MJ, Gahl GM, Kopple JD, Kamdar AV, Jones MR, Kessel M, et al. Protein losses during peritoneal dialysis. *Kidney Int*. 1981 Apr;19(4):593–602.
240. Cigarran S, Barril G, Cirugeda A, Bernis C, Aguilera A, Sanz P, et al. Hypoalbuminemia is also a marker of fluid excess determined by bioelectrical impedance parameters in dialysis patients. *Ther Apher Dial*. 2007 Apr;11(2):114–20.
241. Carrero JJ, Stenvinkel P, Cuppari L, Ikizler TA, Kalantar-Zadeh K, Kaysen G, et al. Etiology of the protein-energy wasting syndrome in chronic kidney disease: a consensus statement from the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM). *J Ren Nutr*. 2013 Mar;23(2):77–90.
242. Asghar RB, Davies SJ. Pathways of fluid transport and reabsorption across the peritoneal membrane. *Kidney International*. 2008 May 1;73(9):1048–53.
243. Alexandrou ME, Balafa O, Sarafidis P. Assessment of Hydration Status in Peritoneal Dialysis Patients: Validity, Prognostic Value, Strengths, and Limitations of Available Techniques. *Am J Nephrol*. 2020;51(8):589–612.
244. Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, et al. Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J*. 2011 May;25(5):1653–63.
245. Beberashvili I, Azar A, Sinuani I, Kadoshi H, Shapiro G, Feldman L, et al. Longitudinal changes in bioimpedance phase angle reflect inverse changes in serum IL-6 levels in maintenance hemodialysis patients. *Nutrition*. 2014 Mar;30(3):297–304.

246. Gangji AS, Brimble KS, Margetts PJ. Association between markers of inflammation, fibrosis and hypervolemia in peritoneal dialysis patients. *Blood Purif.* 2009;28(4):354–8.
247. Huang R, Wu M, Wu H, Ye H, Peng Y, Yi C, et al. Lower Phase Angle Measured by Bioelectrical Impedance Analysis Is a Marker for Increased Mortality in Incident Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Journal of Renal Nutrition.* 2020 Mar 1;30(2):119–25.
248. Maple-Brown LJ, Cunningham J, Nandi N, Hodge A, O’Dea K. Fibrinogen and associated risk factors in a high-risk population: urban indigenous australians, the druid Study. *Cardiovascular Diabetology.* 2010 Oct 29;9(1):69.
249. Schuett K, Savvaidis A, Maxeiner S, Lysaja K, Jankowski V, Schirmer SH, et al. Clot Structure: A Potent Mortality Risk Factor in Patients on Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2017 May;28(5):1622–30.
250. Yu J, Lin T, Huang N, Xia X, Li J, Qiu Y, et al. Plasma fibrinogen and mortality in patients undergoing peritoneal dialysis: a prospective cohort study. *BMC Nephrol.* 2020 Aug 17;21:349.
251. Brophy DF, Carl DE, Mohammed BM, Song J, Martin EJ, Bostic JL, et al. Differences in coagulation between hemodialysis and peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2014 Feb;34(1):33–40.
252. Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Jun;34(6):819–36.
253. Booth AD, Jayne DRW, Kharbanda RK, McEniery CM, Mackenzie IS, Brown J, et al. Infliximab improves endothelial dysfunction in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation. *Circulation.* 2004 Apr 13;109(14):1718–23.
254. Dulai R, Perry M, Twycross-Lewis R, Morrissey D, Atzeni F, Greenwald S. The effect of tumor necrosis factor- antagonists on arterial stiffness in rheumatoid arthritis: a literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2012 Aug;42(1):1–8.
255. Diagnóstico y tratamiento de la nefritis lúpica. Documento de consenso del Grupo de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (GEAS) de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) y de la Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.) | *Nefrología [Internet].* [cited 2022 Aug 27]. Available from: <https://www.revistanefrologia.com/es-diagnostico-tratamiento-nefritis-lupica-documento-articulo-X0211699512000647>
256. Mikkelsen MS, Jespersen BM, Larsen FH, Blennow A, Engelsen SB. Molecular structure of large-scale extracted -glucan from barley and oat: Identification of a significantly changed block structure in a high -glucan barley mutant. *Food Chemistry.* 2013 Jan 1;136(1):130–8.
257. Wu L, Zhao J, Zhang X, Liu S, Zhao C. Antitumor effect of soluble -glucan as an immune stimulant. *Int J Biol Macromol.* 2021 May 15;179:116–24.







## PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

Comunicación tipo póster aceptado para su presentación en el LII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología que se celebrará en Granada del 12 al 14 de noviembre de 2022.

## LII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología

### EL ÁNGULO DE FASE: UN MARCADOR CERTERO DE INFLAMACIÓN, INMUNOSENESCENCIA Y CALCIFICACIÓN VASCULAR EN EL ENFERMO RENAL

**Catalina Ulloa-Clavijo<sup>1,2</sup>, Natalia Carrillo-López<sup>2,3</sup>, Javier Rodríguez-Carrio<sup>4</sup>, Beatriz Martín-Carro<sup>2,3</sup>, Lucía Sobrino<sup>5</sup>, Secundino Cigarrán<sup>6</sup>, Belinda Fernández-Mariño<sup>7</sup>, Ana Suarez<sup>2</sup>, Carmen Rodríguez<sup>8</sup>, Minerva Rodríguez<sup>2,3,6</sup>.**

<sup>1</sup>Unidad de Hemodiálisis, Fundación Hospital de Jove, Gijón. <sup>2</sup>Metabolismo Óseo, Vascular y enfermedades Inflamatorias Crónicas, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo. <sup>3</sup>Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS); RICORS030 (Kidney Disease). <sup>4</sup>Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. <sup>5</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo. <sup>6</sup>Área de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo. <sup>7</sup>Servicio de Nefrología, Hospital da Costa, Burela, Lugo. <sup>8</sup>Servicio de Radiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.



## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La detección precoz del desgaste proteico energético en el enfermo renal es esencial para disminuir el riesgo cardiovascular (RCV) mediante la reducción de la inflamación y la calcificación vascular (CV). La bioimpedancia eléctrica (BIA) constituye una herramienta esencial en su diagnóstico. El objetivo del estudio es evaluar parámetros de BIA como marcadores de inflamación, RCV y CV en una población de diálisis peritoneal (DP).

## MÉTODOS

En 31 pacientes no diabéticos con más de 6 meses en DP, se recogen datos epidemiológicos, de daño vascular, inflamación y composición corporal (análizador BCM, Fresenius) incluyendo el ángulo de fase (AF) a 50 Hz, cuyos valores  $4,5^\circ$  se asocian a mayor mortalidad.

## RESULTADOS

En estos pacientes, (20 varones; edad media= 57.3 años, el AF se correlacionó inversamente con la edad, la comorbilidad de Charlson, mayor daño vascular (índice de Kauppila, velocidad de la onda de pulso, neovascularización de la adventicia carotídea), mayor inflamación (linfocitos senescentes -CD4+CD28null-, granulocitos de baja densidad -LDG-, IL-6 y fibrinógeno), sobrehidratación, y, positivamente, con proteínas totales y albúmina circulantes y masa magra. Pacientes con  $AF < 4,5^\circ$  presentan un grado de CV muy superior ( $p=0.001$ ), elevaciones significativas en las subpoblaciones de LDG determinantes de CV ( $p=0.040$ ) e inmunosenescencia ( $p=0.001$ ), mayor sobrehidratación y niveles de fibrinógeno circulante (11.9% superior,  $p=0.04$ ) y son 10 años mayores. Sin embargo, un modelo multivariante incluyendo la edad como variable confusora ha demostrado que los descensos de  $AF < 4,5^\circ$  predicen CV independientemente de la edad ( $t=4.0$ ; IC 95%: 6.1-1.8;  $p < 0.001$ ).

Tabla 1. Asociación entre AF y marcadores de RCV, estado nutricional e inflamación en pacientes con ERC5-DP.

	R	p
<b>Características epidemiológicas</b>		
Edad	-0.49	<b>&lt;0,01*</b>
Índice de Charlson	-0.63	<b>0,01*</b>
<b>Parámetros de daño vascular</b>		
Índice de Kauppila	-0.68	<b>&lt;0,01*</b>
Velocidad de onda de pulso	-0.49	<b>0,03*</b>
Neovascularización adventicial carotídea izquierda	-0.50	<b>0,03*</b>
CD4+CD28null	-0.37	<b>0,04*</b>
LDG	-0.46	<b>0,01*</b>
<b>Parámetros nutricionales</b>		
Proteínas	0.50	<b>&lt;0,01*</b>
Albúmina	0.40	<b>0,02*</b>
Prealbúmina	0.10	0,55
Tasa de Catabolismo proteico	0.031	0,85
Índice de tejido magro	0.62	<b>&lt;0,01*</b>
Sobrehidratación	-0.49	<b>0,006*</b>
<b>Parámetros de inflamación</b>		
PCR	-0.28	0,10
IL-6	-0.44	<b>0,01*</b>
Fibrinógeno	-0.22	0,23

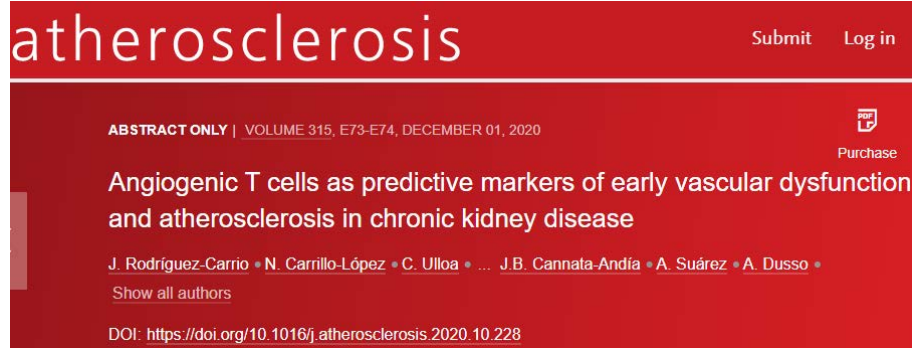
## CONCLUSIÓN

En pacientes en DP, valores de  $AF < 4,5^\circ$  proveen de un biomarcador no solo de desnutrición, sino también de inflamación sistémica y senescencia inmunológica, capaz de estimar el riesgo de CV independientemente de la edad.



Comunicación tipo póster presentado en el 88 Congreso Europeo de Aterosclerosis, celebrado en Austria en mayo de 2020.

88th EAS CONGRESS



The image shows a digital abstract page for the journal 'atherosclerosis'. The page has a dark red background with white text. At the top left, the journal title 'atherosclerosis' is written in a large, lowercase, sans-serif font. To the right of the title are the words 'Submit' and 'Log in'. Below the title, on the left, it says 'ABSTRACT ONLY | VOLUME 315, E73-E74, DECEMBER 01, 2020'. On the right, there is a PDF icon and the word 'Purchase'. The main title of the abstract is 'Angiogenic T cells as predictive markers of early vascular dysfunction and atherosclerosis in chronic kidney disease'. Below this, the authors are listed: 'J. Rodríguez-Carrio • N. Carrillo-López • C. Ulloa • ... J.B. Cannata-Andía • A. Suárez • A. Dusso •'. There is a link 'Show all authors' below the author list. At the bottom, the DOI is given as 'https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.228'.

atherosclerosis

Submit Log in

ABSTRACT ONLY | VOLUME 315, E73-E74, DECEMBER 01, 2020

Purchase

Angiogenic T cells as predictive markers of early vascular dysfunction and atherosclerosis in chronic kidney disease

J. Rodríguez-Carrio • N. Carrillo-López • C. Ulloa • ... J.B. Cannata-Andía • A. Suárez • A. Dusso •

Show all authors

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.228>

Comunicaciones tipo póster presentados en el XLIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología, celebrado en A Coruña del 5 al 8 de octubre de 2019.

## XLIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología

### 526 EXPRESIÓN GÉNICA DE LA ESFINGOMIELINASA NEUTRA 2 LEUCOCITARIA: UN BIOMARCADOR NUEVO DEL GRADO DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y DE PROPENSIÓN A CALCIFICACIÓN VASCULAR

N. CARRILLO-LÓPEZ, C. GILLOM-CLAUDIO, S. PANZO, L. MARTINEZ-ARLAS, B. MARTÍN-CARRIO, J. MARTÍN-VIRGALIA, A. LOPEZ-ARANGO, C. RODRIGUEZ-SUAREZ, JB. CANNATA-ANDIA, A. DUSO\*

\*UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE METABOLISMO ÓSEO, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (ISPA), REDINREN-ISCHII (OVIEDO/ESPAÑA), ÁREA DE GESTIÓN CLÍNICA DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (OVIEDO/ESPAÑA), UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE METABOLISMO ÓSEO, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (ISPA), REDINREN-ISCHII, DEPARTAMENTO DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (OVIEDO/ESPAÑA)

**Introducción:** La inflamación sistémica es un factor de riesgo de aterosclerosis y calcificación vascular tanto en la población general sana como en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Basándonos en la identificación reciente del papel crítico de la inhibición de los aumentos en la esfingomielinasa neutra 2 (n5Masa2) en atenuar la inflamación asociada al envejecimiento, la severidad de la aterosclerosis en el ratón ApoE<sup>-/-</sup>, y el inicio de la calcificación de la media arterial, este estudio evaluó la sensibilidad de la expresión génica de TNF $\alpha$  y n5Masa2 en leucocitos circulantes como reflejo de propensión a calcificación vascular en población con y sin ERC.

**Material y Método:** Utilizando gradiente de ficol, se obtuvieron células mononucleares y granulocitos circulantes de 28 pacientes no diabéticos en diálisis peritoneal (DP) y de 16 individuos con función renal normal, apareados por edad y sexo, para mediciones de expresión génica de TNF $\alpha$  y n5Masa2 por qPCR. Una radiografía de columna lumbar evaluó el grado de calcificación de la aorta abdominal (Índice de Kauppila -IK-) como marcador de riesgo subclínico (IK-C5) y clínico (IK-S5) de calcificación vascular.

**Resultados:** En adultos mayores de 40 años con función renal normal, los niveles de ARNm de TNF $\alpha$  en las células mononucleares circulantes se correlacionaron directamente con la edad ( $r=0.61$ ,  $p<0.05$ ,  $n=10$ ). Además, los niveles de ARNm de n5Masa2 aumentaron significativamente con los incrementos en su inductor, el TNF $\alpha$ , tanto en individuos normales ( $r=0.57$ ;  $p<0.02$ ,  $n=16$ ) como en pacientes en DP ( $r=0.56$ ,  $p<0.01$ ;  $n=28$ ), avalando la contribución de aumentos en la n5Masa2 leucocitaria al grado de inflamación asociado a la edad. Más importante aún, la n5Masa2 de los granulocitos circulantes, que no se correlaciona con el TNF $\alpha$  granulocítico, a pesar de los aumentos significativos en los pacientes de DP con respecto a los controles normales ( $p<0.05$ ), se correlacionó con IK-S5 ( $r=0.65$ ,  $p<0.05$ ,  $n=11$ ).

**Conclusión:** La expresión génica de TNF $\alpha$  y n5Masa2 en células mononucleares y granulocitos circulantes podrían considerarse biomarcadores tanto del grado de inflamación sistémica como del riesgo de calcificación vascular.

### 519 AUMENTO Y HETEROGENEIDAD DE LOS GRANULOCITOS DE BAJA DENSIDAD EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA: ASOCIACIÓN CON CALCIFICACIÓN VASCULAR

J. RODRIGUEZ-CARRIO, N. CARRILLO-LÓPEZ, E. LILLO, M. SEJO, M. RODRIGUEZ-GARCÍA, C. RODRIGUEZ-SUAREZ, C. DIAZ-CORTE, JB. CANNATA-ANDIA, A. SUAREZ, A. DUSO\*

\*ÁREA DE INMUNOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL, UNIVERSIDAD DE OVIEDO, UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE METABOLISMO ÓSEO, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (ISPA), REDINREN-ISCHII (OVIEDO/ESPAÑA), ÁREA DE GESTIÓN CLÍNICA DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (OVIEDO/ESPAÑA), ÁREA DE GESTIÓN CLÍNICA DE METABOLISMO ÓSEO, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (ISPA), REDINREN-ISCHII (OVIEDO/ESPAÑA), ÁREA DE GESTIÓN CLÍNICA DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, REDINREN-ISCHII (OVIEDO/ESPAÑA), UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE METABOLISMO ÓSEO, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (ISPA), REDINREN-ISCHII, DEPARTAMENTO DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (OVIEDO/ESPAÑA), ÁREA DE INMUNOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (OVIEDO/ESPAÑA)

**Introducción:** Aunque la inflamación tiene un papel central en la patogénesis de la enfermedad renal crónica (ERC) y sus desenlaces clínicos, los mediadores inmunitarios involucrados en este fenómeno a nivel celular no están del todo claros. Estudios recientes en enfermedades inmuno-mediadas muestran un papel relevante de los granulocitos de baja densidad (low density granulocytes, LDG) como mediadores clave de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, su papel en la ERC no ha sido estudiado hasta el momento. El objetivo de este estudio es caracterizar la población de LDG en la ERC y su potencial relevancia clínica.

**Material y Método:** Se cuantificaron los niveles de LDG en células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) mediante citometría de flujo en 33 pacientes con ERC en diálisis peritoneal y 15 controles sanos. Un subgrupo de 8 pacientes fue re-evaluado tras 6 meses. Además, se estudió una cohorte de replicación (con 16 pacientes en hemodiálisis y 6 controles). La expresión de DEF3A (Defensin 3a, marcador de granulopoesis temprana) en PBMC se cuantificó por qPCR.

**Resultados:** En la ERC, los niveles de LDG totales (CD15+) y las subpoblaciones CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>CD16</sup> estaban incrementados en sangre periférica ( $p<0.050$ ,  $p<0.010$  y  $p<0.010$ , respectivamente), así como la frecuencia relativa de la subpoblación CD14<sup>CD16</sup> (respecto a la población total CD15+) ( $p=0.012$ ). Estas alteraciones fueron estables en el tiempo. Los niveles de LDG CD14<sup>CD16</sup>CD15+ se asociaron positivamente con el índice de Kauppila ( $r=0.500$ ,  $p=0.003$ ) y la expresión de DEF3A ( $r=0.730$ ,  $p<0.001$ ). No se observaron asociaciones con otros parámetros clínicos, tratamientos o modalidad de diálisis. Estos hallazgos se confirmaron en la cohorte de replicación. Las subpoblaciones CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>CD16</sup> mostraron diferencias en la expresión de CD11b, CD31, CD62L, iNRA1 y CD68, así como en los parámetros de tamaño (PSC) y granulosidad (SSC), sugiriendo diferentes orígenes y estados de maduración.

**Conclusiones:** Los LDG se encuentran aumentados en la ERC, mostrando una notable heterogeneidad. Se observa un aumento relativo especialmente en la subpoblación CD14<sup>CD16</sup>CD15+, asociado a mayor calcificación vascular. La expresión de DEF3A en PBMC podría ser un marcador de los incrementos de LDG. Estos resultados apoyan un papel de los LDG en la ERC.

J Am Soc Nephrol 30: 2019

TH-PO526

**Increases in Circulating Granulocyte Neutral Sphingomyelinase 2 Expression in Dialysis Patients Correlate Directly with the Propensity for Vascular Calcification**

Natalia Carrillo-Lopez,<sup>1</sup> Catalina Ulloa,<sup>2</sup> Javier Rodriguez-Carrio,<sup>4,5</sup> Sara Panizo,<sup>1</sup> Laura Martínez-Arias,<sup>1</sup> Beatriz Martín-Carro,<sup>1</sup> Julia Martín-Virgala,<sup>1</sup> Carmen Rodríguez-Suárez,<sup>3</sup> Jorge B. Carruta-Ardia,<sup>1,2</sup> Adrián S. Dusso,<sup>1</sup> <sup>1</sup>Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), REDinREN-ISCIII, Oviedo, Spain; <sup>2</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>3</sup>Division of Nephrology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>4</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>5</sup>Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain.

**Background:** Systemic inflammation is a risk factor for atherosclerosis and vascular calcification in the general population and in chronic kidney disease (CKD) patients. Because increases in neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) are essential for the severity of age-induced inflammation in health and atherosclerosis in the ApoE null mouse and contribute to matrix medial calcification in uremia, this study evaluated whether leukocyte gene expression of nSMase2 and its inducer in the vasculature, TNF $\alpha$ , could estimate the propensity for vascular calcification.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and granulocytes, from 28 peritoneal dialysis (PD) patients and 16 normal adults, matched for age and gender, were obtained from fresh blood using Fyocoll gradient. A lumbar X-ray measured Knopp's index (KI) to estimate subclinical (KI-5) or clinical (KI-5) risk for vascular calcification (VC).

**Results:** In adults older than 40 with normal renal function, PBMC TNF $\alpha$  mRNA levels correlated directly with age ( $r=0.61$ ;  $p<0.05$ ;  $n=10$ ), a risk factor for vascular damage. Furthermore, PBMC TNF $\alpha$  increased by 52% in peritoneal dialysis patients ( $p<0.03$ ) compared to controls and, similar to the vasculature, PBMC nSMase2 gene expression increased in parallel with the elevations in TNF $\alpha$  in both healthy adults ( $r=0.57$ ,  $p<0.02$ ,  $n=19$ ) and PD patients ( $r=0.56$ ,  $p<0.01$ ,  $n=28$ ). In circulating granulocytes, TNF $\alpha$  was also 2-fold higher in PD patients, but with levels 2.2-fold lower than those in PBMC, even in normal controls. Significantly, the increases in granulocyte nSMase2 correlated directly with KI-5 ( $r=0.65$ ;  $p<0.05$ ;  $n=11$ ), a recognized biomarker of the clinical risk for vascular calcification, but not with TNF $\alpha$ .

**Conclusions:** While in PBMC, the higher TNF $\alpha$  mRNA levels correlating with increases in nSMase2 may estimate the degree of systemic inflammation, the increased granulocyte nSMase2 gene expression appear sufficient to reflect VC risk.

**Funding:** Government Support - Non U.S.

TH-PO529

**Increased Subset of Low-Density Granulocytes in Dialysis Patients Associated with the Degree of Abdominal Aorta Calcification**

Javier Rodríguez-Carrio,<sup>4,5</sup> Natalia Carrillo-Lopez,<sup>2</sup> Catalina Ulloa,<sup>5</sup> Mariana Sejo,<sup>1,6</sup> Miriela Rodríguez,<sup>5,7</sup> Carmen Rodríguez-Suárez,<sup>3</sup> Jorge B. Carruta-Ardia,<sup>2,8</sup> Ana Suárez,<sup>2</sup> Adriana S. Dusso,<sup>2</sup> <sup>1</sup>Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain; <sup>2</sup>Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), REDinREN-ISCIII, Oviedo, Spain; <sup>3</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>4</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>5</sup>Division of Nephrology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>6</sup>Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Hospital de Clínicas, Instituto de Immunología, Genética y Metabolismo (INGEM) CONIC-UBA, Buenos Aires, Argentina; <sup>7</sup>REDinREN-ISCIII, Oviedo, Spain.

**Background:** Although systemic inflammation increases the risk for adverse vascular outcomes in chronic kidney disease (CKD), the exact players remain unclear. The emerging evidence of the relevance of low density granulocytes (LDGs) in inflammatory conditions led us to evaluate whether LDGs may be associated with inflammatory procalcifying features in CKD.

**Methods:** LDGs subsets were identified by flow cytometry in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 33 CKD patients undergoing peritoneal dialysis and 15 healthy controls (HC). An additional cohort of 16 CKD patients undergoing hemodialysis and 6 HC was recruited for replication. Deferoxamine (DEFa), a marker of early granulopoiesis gene expression on PBMCs was quantified by qPCR.

**Results:** Total LDGs (CD15<sup>+</sup>) and both CD14-lowCD15<sup>+</sup> and CD14CD16<sup>+</sup> subsets were increased in CKD. The relative frequency of the CD14-CD16 subpopulation among the total CD15<sup>+</sup> pool was increased in CKD. Both LDG subsets differed in origin and maturation status as demonstrated by their CD11b, CD31, CD62L, Interferon receptor 1 (IFNAR1) and CD68 expression and size/granularity (FSC-SSC) features. LDGs subsets were not associated with parameters of bone and mineral metabolism, time on dialysis, serum cytokines or treatments. The increased CD14CD16CD15<sup>+</sup> correlated directly with Knopp's scores and DEFa expression in PBMCs, whereas no association was found with CD14-lowCD16-CD15<sup>+</sup>.

**Conclusions:** CKD is associated with elevated LDGs, showing a skewed distribution towards a CD14CD16-CD15<sup>+</sup> enrichment in blood which correlated with vascular calcification. DEFa expression in PBMC could be a marker of LDG expansion. These findings support an unprecedented role for LDGs in CKD immunopathogenesis.

**Funding:** Government Support - Non-U.S.

Comunicaciones tipo póster presentados en el XLVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología / IX Congreso Iberoamericano de Nefrología, celebrado en Madrid del 16 al 19 de noviembre de 2018.

## XLVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología

**497 LA REDUCCIÓN DEL CONTENIDO VASCULAR DE MICROARN-145 CONTRIBUYE AL ESTABLECIMIENTO Y PROGRESIÓN DE CALCIFICACION VASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y PUEDE PREVENIRSE CON SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA D NUTRICIONAL Y ACTIVA**

•• H. CARRILLO-LÓPEZ, S. RANZÓ, M.V. ARDIZACÓN, S. DE LA FUENTE, L. SORRINO, C. ULLÓRA, M. NAVES-DÍAZ, I. RODRÍGUEZ, JR. CANNATA-ANDÍA, A. DUSOJO

**USO DE METABOLISMO ÓSEO:** RENOVIN DEL ICSH, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (I+D+D+ESPAÑA), DEPARTAMENT DE MORFOLÒGIA, SURGERY AND EXPERIMENTAL MEDICINE, UTA, CENTRE, UNIVERSITY OF FERRARA (FERRARA/ITALIA), DIVISION OF EXPERIMENTAL NEPHROLOGY, IRB LLEIDA (LLEIDA/ESPAÑA), SERVICIO DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (I+D+ESPAÑA)

**Introducción:** En la insuficiencia renal crónica (IRC), el desarrollo de calcificación vascular y la deficiencia de vitamina D, muy frecuentes en estos pacientes, se asocian a incrementos del riesgo de mortalidad cardiovascular. La vitamina D induce la expresión del microARN-145 (miR-145), el microARN predominante en las células de músculo liso vascular (CMV) y responsable del mantenimiento de su fenotipo contractil. Debido a que en osteoblastos, las reducciones de miR-145 estimulan directamente al gen de Osteix, indispensable para la mineralización ósea, este estudio examinó: 1) El impacto del silenciamiento de miR-145 en la diferenciación osteogénica de CMV; 2) Cambios en el contenido ácido de miR-145 inducidos por la IRC y 3) La eficacia de la administración de vitamina D nutricional y activa en el mantenimiento del miR-145 ácido y del fenotipo contractil vascular en la IRC.

**Materia y Método:** Calcio (Ca) ácido, expresión del miR-145, niveles de ARNm de marcadores de fenotipo contractil (alfa-actina) y diferenciación osteogénica (Osterix) se midieron en el CMV de rata con y sin silenciamiento del miR-145 expuestas a medio calcificante (2mM Ca, 3mM fosforo (P)) y no calcificante (1mM Ca, 1mM P) durante 4 días y 4) Aortas de ratones sometidos a reducción del 75% de masa renal (RD), alimentados con una dieta normofosfórica durante 14 semanas, con o sin tratamiento con vitamina D nutricional y activa iniciado 8 semanas post RD.

**Resultados:** Estudios in vitro en CMV demostraron que el silenciamiento del miR-145 fue suficiente para: a) Comprometer el fenotipo contractil vascular y aumentar el depósito Ca en células expuestas a condiciones no calcificantes, y b) Agravar los incrementos de diferenciación osteogénica (Osterix) en alfa-actina y aumentos en Osterix) y de calcificación inducidos por condiciones calcificantes. In vivo, tras 14 semanas de uremia, el contenido de miR-145 ácido se redujo en un 85%, con un descenso concomitante de alfa-actina ácida (80%), y con ligeros incrementos no significativos de Osterix o del contenido ácido de Ca. La administración de vitamina D nutricional y activa a partir de la semana 9, previno totalmente las reducciones ácidas de miR-145 y atenuó los descensos de alfa-actina, así como también los ligeros aumentos en Osterix inducidos por la uremia.

**Conclusiones:** La IRC induce reducciones del contenido ácido de miR-145 que promueven la diferenciación osteogénica de CMV, reducciones que pueden prevenirse con la administración de vitamina D nutricional y activa.

**498 NIVELES SÉRICOS ELEVADOS DE FOSFORO Y PTH REGULAN DE MODO DIFERENCIAL EL EJERCICIO HUESO-VASO Y LA PRODUCCIÓN RENAL DE CALCITRIOL EN LA UREMIA**

•• H. CARRILLO-LÓPEZ, S. RANZÓ, C. ALONSO-MONTES, L. MARTÍNEZ-ARAU, J. MARTÍN-VISGA-LA, C. ULLÓRA, L. SORRINO, A. DUSOJO, JR. CANNATA-ANDÍA, M. NAVES-DÍAZ

**USO DE METABOLISMO ÓSEO:** RENOVIN DEL ICSH, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (I+D+D+ESPAÑA), SERVICIO DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (I+D+D+ESPAÑA), SERVICIO NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (I+D+D+ESPAÑA)

**Introducción:** En enfermedad renal crónica, los aumentos en fosforo sérico (P) y PTH agravan la calcificación vascular (CV) y la pérdida de masa ósea. Los objetivos del presente trabajo son identificar la contribución individual de P y PTH en el desarrollo de CV y pérdida de masa ósea, así como investigar si el eje P/PTH/1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> comprome el envejecimiento renal, vascular y esquelético en la insuficiencia renal crónica (IRC).

**Materia y método:** Se utilizaron ratas con IRC (nephrectomía 7/8) alimentadas con una dieta hiperfosfórica. A un grupo de animales se les realizó paratireoidectomía (PTX) con suplementos de PTH 1-34 para normalizar la PTH sérica.

**Resultados:** In vivo: El grupo sin PTX desarrolló hiperparatiroidismo secundario (HPTS) severo con sus complicaciones incluidas pérdida de hueso cortical y calcificación aórtica. En ratas uremias alimentadas con dieta hiperfosfórica, la PTX redujo un 80% el calcio (Ca) aórtico a pesar de un grado de hiperfosfitemia y de IRC similar al del HPTS. Los mecanismos involucrados en esta prevención de CV por PTX incluyen: 1) Inhibición de la diferenciación osteogénica ácida (mantenimiento de niveles normales de alfa-actina y atenuación de aumentos en Runx2 y BMP2); 2) Aumentos en los niveles ácidos de escleratina, potente inhibidor de la vía de Wnt; 3) Disminución de la reacción ósea (Catepsina K) y de aumentos en inhibidores de Wnt (Gsp 1 y 4), hallazgos que explican la prevención de pérdida de masa ósea y 4) Reducción de niveles tóxicos de calcitriol (a pesar de descensos de FGF23 sérico y de expresión de 24-hidroxiolasa renal) contribuyendo a disminuir el Ca sérico y a prevenir aumentos en Kticho soluble.

In vitro: En células de músculo liso vascular (CMV) de rata expuestas a condiciones calcificantes (2mM Ca, 3mM P) y a dosis crecientes de PTH 1-34 (entre 10-12M y 10-6M) se observó que concentraciones de PTH superiores a 10<sup>-12</sup>M promovieron diferenciación osteogénica y calcificación. Por el contrario, concentraciones de PTH inferiores a 10<sup>-8</sup>M atenuaron la calcificación. La promoción y protección de CV fueron mediadas por el receptor 1 de PTH (PTH1R).

**Conclusiones:** En IRC hiperfosfémica la normalización de PTH sérica atenua la CV, la diferenciación osteogénica de CMV mediada por P, incrementa los niveles ácidos vasculares de escleratina y previene la pérdida de masa ósea, demostrando la importante contribución del incremento de PTH en estos procesos. Además, los resultados cuestionan el papel atribuido a FGF23 elevada en el descenso renal de calcitriol durante la progresión de la IRC.

**499 LA EFICACIA DE LOS SGLUCANOS DE CEBADA EN REDUCIR CALCIFICACION VASCULAR EN LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA CON HIPERFOSFATEMIA REVOLUCIONARIA LA INHIBICIÓN DE LA ESFINGOMIELINA SINTETASA 2 A NIVEL VASCULAR**

•• S. RANZÓ, M.V. ARDIZACÓN, H. CARRILLO-LÓPEZ, A. CASTRO-GRAFFON, R. VALCÁRCEL, C. ULLÓRA, M. MOTILVA, I. RODRÍGUEZ, JR. CANNATA-ANDÍA, A. DUSOJO

**USO DE METABOLISMO ÓSEO:** RENOVIN DEL ICSH, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (I+D+D+ESPAÑA), DEPARTAMENT DE MORFOLÒGIA, SURGERY AND EXPERIMENTAL MEDICINE, UTA, CENTRE, UNIVERSITY OF FERRARA (FERRARA/ITALIA), DIVISION OF EXPERIMENTAL NEPHROLOGY, IRB LLEIDA (LLEIDA, ESPAÑA), SERVICIO DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (I+D+D+ESPAÑA), DEPARTAMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, AGRICULTURE RESEARCH CENTER, LLEIDA UNIVERSITY (LLEIDA, ESPAÑA)

**Introducción:** En la insuficiencia renal crónica (IRC), la hiperfosfitemia agrava la calcificación vascular (CV) induciendo hiperparatiroidismo secundario (HPTS), pérdida de masa ósea e inflamación sistémica. Basándonos en a) La demostración reciente que la inflamación aumenta la actividad de esfingomielina reductasa 2 (SGM2) en células de músculo liso vascular (CMV) promoviendo la liberación de exomas procalcificantes, y b) Las propiedades anti-inflamatorias de los β-glucanos de cebada (βGLC), examinamos si las acciones anticalcificantes de la administración oral de βGLC en la IRC con hiperfosfitemia involucran la supresión de la nSM2 ácida.

**Métodos y Resultados:** En ratas uremias alimentadas con dieta hiperfosfórica, la ingesta diaria de 40 mg de βGLC, redujo un 43% la calcificación aórtica y también el ARNm y la actividad de la nSM2 ácida (82 y 56%, respectivamente) a pesar de hiperfosfitemia e HPTS similares. Estudios in vitro demostraron que los βGLC inhiben la nSM2 vascular de forma directa e independiente de estímulos unimicos o inflamatorios. En CMV expuestas solo a condiciones calcificantes (2mM calcio, 3mM fosforo) durante 4 días, la adición de βGLC (100µg/mL) redujo: a) La calcificación inducida por las condiciones calcificantes (72%), b) Los aumentos de actividad de nSM2 (86%), c) La liberación de exomas anualmente cargados de microARN-145 (69%), el microARN predominante en CMV e indispensable para mantener su fenotipo contractil, y d) Las disminuciones en el contenido intracelular de microARN-145. Dado que, los βGLC también inhiben en un 65% la calcificación de CMV con microARN-145 silenciado, inhibir la nSM2 parece ser más importante para sus acciones anticalcificantes que prevenir reducciones de microARN-145.

En un intento de maximizar la eficacia de la ingesta de βGLC, recomendada por la FDA (3g/día) en inhibir la nSM2, medimos el ARNm de nSM2 en leucocitos circulantes de ratas sanas. La expresión génica de nSM2 se correlacionó con la edad (r=0,97, p<0,01). Un reconocido factor de riesgo de CV. Además, la ingesta diaria de pan de cebada conteniendo 3 g de βGLC durante una semana redujo el ARNm de nSM2 en un 75%.

**Conclusiones:** La eficacia de los βGLC en reducir CV en la IRC hiperfosfémica involucra la inhibición de la nSM2 ácida. Medidas de expresión génica de nSM2 en leucocitos humanos podrían ser un buen biomarcador para evaluar la eficacia de la ingesta de βGLC en suprimir la expresión de la nSM2 vascular en pacientes.

**500 DEFICIENCIA DE VITAMINA D Y ALTERACIONES DE POBLACIONES INMUNITARIAS EN PACIENTES EN HEMODIALISIS: IMPORTANCIA EN INMUNOSENESCENCIA E INFLAMACION**

•• I. RODRÍGUEZ-CARRIO, H. CARRILLO-LÓPEZ, M. SUDÓ, C. ULLÓRA, L. SORRINO, M. RODRÍGUEZ-GARCÍA, JR. CANNATA-ANDÍA, A. SUIÑEZ, A. DUSOJO

**USO DE METABOLISMO ÓSEO Y ÁREA DE INMUNOLOGÍA:** RENOVIN DEL ICSH, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (I+D+D+ESPAÑA), USO DE METABOLISMO ÓSEO, RENOVIN DEL ICSH, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (I+D+D+ESPAÑA), SERVICIO DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS (I+D+D+ESPAÑA), SERVICIO DE INMUNOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE OVIEDO (I+D+D+ESPAÑA)

**Introducción:** La vitamina D juega un papel central en la inmunidad, regulando la función de diferentes subpoblaciones linfoides y mieloides. Como en la enfermedad renal crónica (ERC) la inflamación sistémica acelera el envejecimiento multigénico, el objetivo de este estudio fue analizar si la deficiencia de vitamina D en pacientes en hemodiálisis (HD) podría asociarse con un perfil alterado de poblaciones celulares inmunitarias relacionadas con estos procesos.

**Materia y Método:** Se reclutaron 17 pacientes no diabéticos en HD y 6 controles sanos comparables en edad y sexo. Se analizaron diferentes poblaciones celulares inmunitarias en sangre periférica (citometría de flujo). Se cuantificaron los niveles séricos de (Inmunotactos) y la expresión génica en células mononucleares (qPCR) de diversos mediadores inflamatorios.

**Resultados:** Los pacientes mostraron una deficiencia severa de vitamina D nutricional (25(OH)D sérico: 8.4±5.8 ng/mL), niveles que se correlacionan inversamente con la frecuencia de linfocitos T auxiliares (CD4+CD28null; r=-0.6, p<0.03), elevados en pacientes vs. controles (p=0.03), especialmente en aquellos con calcificaciones vasculares (p<0.01). La frecuencia de esta subpoblación se asoció negativamente con la expresión génica de KLOTNO (r=-0.48, p<0.05). También observamos en los pacientes una menor frecuencia de células T angiogénicas (Tang, CD3+CD31+CXCR4+), protectoras de la homeostasia vascular, respecto a controles. La frecuencia de Tang se asoció positivamente con el Kticho sérico (r=0.7, p<0.003). Se observó un aumento notable de monocitos intramedulares (CD14+CD16+) respecto a controles (p<0.001), a expensas de una reducción de monocitos clásicos (p<0.05), un perfil más diferenciado y proinflamatorio. La frecuencia de monocitos intermedios se correlacionó inversamente con los niveles séricos de vitamina D (r=-0.4, p<0.013) y directamente con la expresión génica de dos marcadores de inflamación, TNFα e IFNγ (r=0.6, p<0.01 y r=0.5, p<0.04, respectivamente), con la esperada asociación negativa entre niveles de vitamina D y expresión génica de IFNγ (r=-0.5, p<0.05). También se detectó en pacientes un aumento de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), un marcador de inflamación y propensión a daño vascular, en monocitos intermedios tanto a nivel proteico como génico (p=0.02 y p<0.05), aumentos que correlacionaron positivamente con los niveles séricos de IFNγ (r=0.6, p<0.009) y negativamente con los de vitamina D (r=-0.5, p<0.06). Finalmente, observamos en pacientes un aumento de granulocitos de baja densidad (CD15+LDG) (p<0.001), marcadores emergentes de daño endotelial, correlacionados con la expresión génica de DEF3 (r=0.5, p=0.008).

**Conclusiones:** La deficiencia de vitamina D en pacientes en HD se asocia a alteraciones de diferentes subpoblaciones inmunitarias relacionadas con inmunosenescencia e inflamación.





# Granulocitos de baja densidad: Un nuevo marcador de deterioro óseo en pacientes en diálisis peritoneal

Ulloa-Clavijo C<sup>1,2</sup>, Martín-Vírgala J<sup>2,3\*</sup>, Gómez-Alonso C<sup>2,4\*</sup>, Fernández-Mariño B<sup>5\*</sup>, Rodríguez-Carrio J<sup>6\*</sup>, Carrillo-López N<sup>2,3</sup>, Sobrino-Díaz L<sup>7</sup>, Rodríguez C<sup>7</sup>, Rodríguez-García M<sup>2,3,7</sup>, Suarez A<sup>6</sup>, Dusso A<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Hemodíalisis, Fundación Hospital de Jove, Gijón (España)

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Ósea y Mineral, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo (España)

<sup>3</sup> Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS), RICORS2040 (Kidney Disease) (España)

<sup>4</sup> Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo y Mineral, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo (España)

<sup>5</sup> Servicio de Radiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo (España)

<sup>6</sup> Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo; Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo (España)

<sup>7</sup> Área de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo (España)

<sup>8</sup> Division of Endocrinology, Metabolism and Lipid Research, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri (EEUU)

\* Igual contribución como segundos autores

Fecha de recepción: 29/05/2022 - Fecha de aceptación: 31/07/2022

## Resumen

**Objetivo:** En enfermos renales, la enfermedad ósea-metabólica, la inflamación sistémica y la malnutrición exacerbaban el riesgo de calcificación vascular (CV) y la morbilidad. Dada la fuerte asociación entre CV y fracturas por fragilidad, el objetivo de este estudio es evaluar la contribución de los mayores determinantes de CV al deterioro óseo en pacientes en diálisis peritoneal (DP).

**Métodos:** En 31 pacientes no diabéticos en DP (>6 meses), se estudiaron marcadores de alteraciones del metabolismo óseo, daño vascular, inflamación y desnutrición, y su impacto en el deterioro óseo (osteopenia radiológica y/o antecedentes de fractura por fragilidad).

**Resultados:** En estos pacientes, (20 varones y 11 mujeres; edad=54±15 y 60±11 años respectivamente (p=0,24)), la prevalencia de fracturas por fragilidad fue de 5% en hombres y del 27% en mujeres. El deterioro óseo fue mayor en personas de edad avanzada, sexo femenino, índices de Charlson y Kauppila elevados, menor masa muscular y con expansión de una subpoblación altamente inflamatoria de granulocitos inmaduros de baja densidad (LDGi). Un análisis de regresión logística demostró que el riesgo de deterioro óseo está más influenciado por el sexo femenino que por la edad y que, de los múltiples factores asociados a mayor deterioro óseo estudiados, sólo la expansión de LDGi estima el riesgo de alteraciones óseas en estos pacientes independientemente de su edad y sexo.

**Conclusión:** La expansión de LDGi provee de un biomarcador certero para el diagnóstico de deterioro óseo y para monitorizar estrategias que atenúen su progresión en pacientes en DP de cualquier edad y sexo.

**Palabras clave:** Fracturas por fragilidad, metabolismo óseo, calcificación vascular, inflamación, riesgo cardiovascular, desnutrición.

## INTRODUCCIÓN

El concepto de enfermedad metabólica ósea asociada a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD, Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder) para referirse a las anomalías óseas (osteodistrofia), de laboratorio (calcio, P, vitamina D, paratohormona -PTH-, factor de crecimiento fibroblástico 23 -FGF23- y Klotho) y de calcificación vascular (CV) o de tejidos blandos que acontecen en el enfermo renal está asentado desde 2007 y convergen en un

incremento de riesgo cardiovascular (RCV), riesgo de fractura y, en definitiva un exceso de morbi-mortalidad<sup>1,2</sup>.

La inflamación crónica juega un papel muy importante en el desarrollo de las alteraciones vasculares en pacientes renales y en estudios previos se identificó la importancia de los granulocitos de baja densidad (LDG) en el desarrollo de calcificaciones vasculares en pacientes en diálisis respecto a población control<sup>3</sup>, así como en RCV de pacientes con lupus<sup>4</sup>.



Correspondencia: Catalina Beatriz Ulloa Clavijo (catalinaulloac@hotmail.com)

La asociación entre calcificaciones vasculares y fracturas por fragilidad está establecida tanto en población general como en pacientes renales. La calcificación aórtica grave se asocia a mayor número y gravedad de fracturas<sup>5</sup>. Es un hecho preocupante ya que la enfermedad cardiovascular (ECV) es la primera causa de muerte en pacientes con ERC, siendo ésta, de 15 a 30 veces mayor a la de la población general al ajustar por edad<sup>6</sup>. La fisiopatología del llamado "eje hueso-vaso" es compleja e interviene varios factores entre los que destacan la edad, la desnutrición y la inflamación sistémica, un factor de RCV no tradicional agravado en el enfermo renal por el envejecimiento acelerado, con incremento de células senescentes que promueve un estado inflamatorio que "sincroniza" el deterioro de múltiples órganos y sistemas, condicionando el agrupamiento de diversas enfermedades degenerativas<sup>7</sup>.

En enfermos en diálisis peritoneal y hemodiálisis, se producen cambios en subpoblaciones leucocitarias tales como descensos en las células T angiogénicas (Tang), protectoras de la homeostasis vascular, aumentos de células inmuno-senescentes (CD4+ CD28null)<sup>8</sup>, como así también una expansión aberrante de una subpoblación de granulocitos inmaduros de baja densidad (LDG CD14-, CD16-, CD15+) relacionados con una mayor propensión a CV en la ERC avanzada<sup>3</sup>.

El incremento de la fragilidad ósea observada con la edad (osteoporosis senil/postmenopáusica) se desarrolla de forma independiente de la ERC. Así, puede estar presente en pacientes con ERC, con función renal normal o levemente reducida, e incluso coexistir con la CKD-MBD después de estar instaurada. A esto se aúna el efecto de la propia ERC en la calidad y la microestructura ósea, ya definida previamente como osteodistrofia renal, junto con factores asociados a la uremia que algunos autores describen como osteoporosis urémica<sup>9</sup>. Además, a los factores de riesgo habituales de osteoporosis de la población general, en la ERC se añaden desórdenes en el estado nutricional, de actividad física, la propia enfermedad de base y la toma de fármacos que interfieren con el metabolismo óseo<sup>10</sup>.

En el enfermo renal es frecuente la coexistencia de tres factores: malnutrición, estado inflamatorio y aterosclerosis, conocida como síndrome MIA, con un gran impacto negativo en la supervivencia<sup>11</sup>. La evidencia sugiere que la disminución de la ingesta alimentaria y el incremento de los reactantes de fase aguda y citoquinas inflamatorias pueden apreciarse desde estadios tempranos de ERC<sup>12</sup>. De igual manera sucede con la aterosclerosis<sup>13</sup>. Esta combinación resulta en un marcado daño cardiovascular que condiciona ingresos hospitalarios y mortalidad.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la contribución de cambios en algunas poblaciones celulares del sistema inmunitario involucradas en la homeostasis vascular y en otros factores de riesgo CV, como la desnutrición, al deterioro óseo en una cohorte de pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### Participantes

Se reclutaron 31 pacientes con ERC estadio 5 mayores de 18 años, sometidos a diálisis peritoneal (CKD5-PD) en la Unidad de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), España) que otorgaron su consentimiento informado. Se excluyeron pacientes diabéticos y con antecedentes de eventos cardiovasculares (aneurisma abdominal, claudicación intermitente y cirugía carotídea previa), tratamiento inmunosupresor; embarazo, diagnós-

tico de enfermedad inmunomediada, cáncer; diabetes mellitus, infecciones recientes menores de 3 meses o actuales. Estos criterios de exclusión limitaron la capacidad de reclutamiento de pacientes, pero se eligieron con el objetivo de identificar mediadores inflamatorios precoces del daño vascular asociados a la DP y su posible impacto en la salud ósea.

### Pruebas de laboratorio

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción. Parámetros bioquímicos séricos automatizados, análisis de lípidos y hemogramas completos se realizaron en el Laboratorio de Medicina (HUCA) con métodos de laboratorio de rutina. Los niveles de Klotho circulante se determinaron usando un ensayo ELISA (Ref. 27998, human soluble a-Klotho; IBL Immuno-Biological Laboratories Co, JAPAN). Para otras determinaciones, las muestras de suero o plasma se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Se evaluó también la función renal residual (FRR) definida como un promedio del aclaramiento de urea y creatinina ((CCr + CU)/2) en orina de 24 h >1 ml/min).

### Análisis de poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se procesaron inmediatamente para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) mediante centrifugación (1900 rpm, 20 minutos) en gradientes de densidad de Ficoll TM (Lymphosep, Biowest, Alemania) para la identificación de LDG. La población CD4+ CD28null se analizó en muestras de sangre periférica directamente.

Las PBMC se trataron con reactivo de bloqueo FeR (Milteny Biotech, Alemania) durante 20 minutos a 4°C para evitar la unión inespecífica de anticuerpos a los receptores Fc, seguidas de incubación con CD14 FITC (Immunostep, España), CD15 PE-Cy7 (Milteny Biotech), CD16 APC-Cy7 (BioLegend, Alemania), CD4 PE (Immunostep) y CD28 APC-Cy7 (Thermo Fischer, Alemania) o anticuerpos de control isotipo correspondientes durante 30 minutos a 4°C. Después de un lavado con PBS. Los tipos celulares se analizaron por citometría de flujo en un Citómetro de flujo Canto II (BD Biosciences) equipado con un software FACS Diva 6.5. La identificación de subpoblaciones celulares leucocitarias se realizó mediante la expresión de sus marcadores específicos. Los LDG inmaduros se detectaron por su fenotipo LDG CD14-, CD16-, CD15+ y sus valores se expresan como % de CD15+. Los linfocitos CD4+ senescentes se identificaron por su fenotipo CD4+ CD28null y sus valores se expresan como % de CD4+, según el método descrito por Rodríguez-Carrio et al.<sup>3</sup>.

### Cuantificación de citocinas circulantes

Los niveles circulantes de IL-10, IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se midieron en muestras de suero utilizando un ensayo multiplex (BiolegendPlex, BioLegend), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los límites de detección fueron 1,2 pg/ml (IL-10 e IL-2) o 2,4 pg/ml (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

### Deterioro óseo

Si bien sólo la densitometría ósea permite cuantificar de forma precisa la masa ósea, se estratificó a los pacientes considerando el deterioro óseo en virtud de la presencia de osteopenia radiológica y/o los antecedentes de fractura por fragilidad. Se evaluaron las radiografías simples de columna dorsal y lumbar en proyección lateral y se

definió como osteopenia a la disminución de la densidad del cuerpo vertebral del hueso esponjoso central y de las trabéculas horizontales, ya que las vertebrales están afectadas en osteopenias más severas, con el consiguiente resquebrajamiento de las corticales. Las fracturas vertebrales se identificaron siguiendo los criterios de Genant. Las fracturas periféricas se constataron mediante informe médico o revisión de las radiografías. La lectura radiográfica fue realizada por una radióloga experimentada.

#### Composición corporal

La composición corporal se evaluó mediante bioimpedancia eléctrica (BIE) multifrecuencia utilizando BCM®, Body Composition Monitor, de Fresenius Medical Care. Las mediciones se obtuvieron a una frecuencia de 50 Hz, con el paciente en decúbito supino y después del drenaje del líquido de DP. El software arrojó los datos de resistencia<sup>®</sup>, reactancia (Xc), agua corporal total (TBW), agua intracelular (ICW), agua extracelular (ECW), ECW/TBW, litros (OH), masa de tejido magro (LTM Kg), índice de tejido magro (LTI Kg/m<sup>2</sup>), masa de tejido adiposo (ATM, Kg), índice de tejido graso (FTI Kg/m<sup>2</sup>), índice de masa corporal (BMI Kg/m<sup>2</sup>) y ángulo de fase (AF) a 50 Hz.

El AF es una medida bioeléctrica de la salud celular que se calcula tomando en cuenta el estado de hidratación y el grado de celularidad tisular; y, constituye un marcador de sarcopenia, estrés oxidativo, inflamación y de calcificación vascular en pacientes en diálisis, y es el parámetro de la BIE que mejor predice supervivencia en la ERC<sup>14-19</sup>.

#### Declaraciones éticas

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Revisión Institucional (Comité de Ética Regional de Investigación Clínica, referencia PI17/02181), en cumplimiento de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

#### Análisis estadístico

El análisis descriptivo se muestra en forma de porcentajes (%), medias (X) y desviaciones estándar (DE). Para el análisis de las diferencias entre los parámetros clínicos y bioquímicos, y la asociación de los mismos con la calcificación vascular, se utilizaron las pruebas estadísticas de T-Student, test de Chi-cuadrado, análisis de regresión logística múltiple y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney) cuando fueron necesarias, con un intervalo de confianza (IC) de 95% y considerando un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS 26.0 para Windows.

#### RESULTADOS

Se incluyeron 31 pacientes, 20 hombres y 11 mujeres, con una edad de  $54 \pm 15$  y de  $60 \pm 11$  años respectivamente ( $p = 0,24$ ). La prevalencia de fracturas por fragilidad fue del 5% en los hombres y del 27% en mujeres, todos ellos con fracturas vertebrales y, en una de las pacientes, además con dos fracturas periféricas.

En la tabla 1 se recogen los parámetros clínicos, determinaciones analíticas del metabolismo óseo relacionados con la ERC, así como los parámetros nutricionales e inflamatorios estudiados, la etiología de la ERC, los tratamientos médicos con repercusión metabólica-ósea y las diferencias entre los pacientes con o sin deterioro óseo. Como cabría esperar, los pacientes con deterioro óseo fueron de mayor

edad, con un predominio significativo de las mujeres [26,32% de hombres y 77,78% de mujeres ( $p = 0,01$ )], con índice de Charlson discretamente superior y con un LTI menor. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con o sin deterioro óseo en los parámetros analíticos vinculados a CKD-MBD, incluyendo los niveles de PTH, a excepción del Klotho sistemática, más elevado en pacientes con deterioro óseo ( $p = 0,03$ ). Esta ausencia de vinculación puede ser debida a la estimación categórica y poco precisa del deterioro óseo como, sobre todo, al tamaño muestral. Además, hasta 2017 no se recoge la relevancia de la DXA en la evaluación sistemática, de pacientes con CKD-MBD y no formaba parte de la rutina de parámetros clínicos, al contrario de la evaluación radiológica<sup>2</sup>.

Es destacable la deficiencia/insuficiencia de vitamina D en ambos grupos. Los valores medios de 25-hidroxi-vitamina D en pacientes suplementados con vitamina D nutricional (38,7%) fueron de 8,4 [6,8, 18,3] ng/ml, frente a 9,3 [5,4, 15] ng/ml en los no suplementados, ambos niveles en el rango de deficiencia de vitamina D ( $< 20$  ng/ml). En el 48,4% de los pacientes que recibían vitamina D activa (calcitriol o paricalcitol), los valores medios de vitamina D fueron de 9,3 [5,4, 12,4] ng/ml, similar al del grupo de pacientes suplementados con vitamina D nutricional.

Respecto a la cuantificación de las calcificaciones vasculares, el índice de Kauppila fue 6 veces superior en los pacientes con deterioro óseo ( $p < 0,01$ ).

En cuanto a los parámetros nutricionales, no se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas totales, albúmina, FTI, ángulo de fase ni IMC. Solo el LTI fue menor en los pacientes con deterioro óseo.

De todas las subpoblaciones celulares leucocitarias estudiadas, solo se observó una elevación significativa en la población de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ en el grupo de pacientes con deterioro óseo y, si bien hubo una tendencia a valores superiores en linfocitos CD4+ CD28null, no alcanzó significación estadística.

Con respecto a la etiología de la ERC y los tratamientos médicos que estaban recibiendo en el momento del estudio, no se encontraron diferencias entre los pacientes asociados al deterioro óseo.

En el análisis de regresión logística analizando el deterioro óseo como variable dependiente respecto a la edad y el sexo, fue el sexo femenino (OR 10,41; IC 95%: 1,52-119,30;  $p = 0,03$ ) la variable con mayor peso, mientras que la edad estuvo en el límite de la significación (OR 1,09; IC 95%: 1,01-1,22;  $p = 0,05$ ).

Cuando se analizó la contribución independiente de cada uno de los parámetros de riesgo identificados al deterioro óseo, ajustando por edad y sexo, únicamente los LDG inmaduros (LDG CD14-, CD16-, CD15+) resultaron ser predictores independientes tanto en datos crudos como ajustados por edad, por sexo y por ambos en conjunto (tabla 2). Cabe resaltar que no se observaron diferencias en los neutrófilos circulantes entre pacientes con o sin deterioro óseo. El subconjunto de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ tampoco se correlacionó con los recuentos absolutos de neutrófilos ( $p > 0,05$ , datos no mostrados).

Importante destacar también que todos los cambios en los parámetros diferencialmente expresados en pacientes con deterioro óseo, como los aumentos en los índices de Charlson o Kauppila y en la densidad de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+, así como el LTI se correlacionan significativamente con la edad ( $r = 0,68$ ,  $p = 0,00$ ;  $r = 0,48$ ,  $p = 0,01$ ;  $r = 0,36$ ,  $p = 0,04$ ;  $r = -0,40$ ,  $p = 0,02$ ) (figura 1).

**Tabla 1. Características clínicas, CKD-MBD, nutricionales e inmunológicas en pacientes con ERC5-DP discriminados por presencia o ausencia de deterioro óseo**

	Sí N=14 (45,2%)	No N=17 (54,8%)	p valor
<b>Parámetros clínicos</b>			
Sexo (H/M)	5/9	15/2	<b>0,02</b>
Edad (años) (media (SD))	62,6 (9,5)	51,9 (15,3)	<b>0,02</b>
Índice de Charlson (mediana [IQR])	6 [3, 7]	4 [2, 6]	ns
Tiempo en diálisis (meses) (mediana [IQR])	18 [11, 32]	15 [9, 48]	ns
Función renal residual (Sí/No)	12/2	12/5	ns
<b>CKD-MBD</b>			
Calcio, mmol/l (media (SD))	2,18 (0,18)	2,18 (0,17)	ns
Fósforo, mmol/l (media (SD))	1,69 (0,35)	1,64 (0,42)	ns
Magnesio, mmol/l (mediana [IQR])	0,81 [0,77, 0,95]	0,87 [0,67, 1,01]	ns
PTH, pg/ml (mediana [IQR])	386 [230, 453]	300 [214, 600]	ns
Vitamina D 25 OH, ng/ml (mediana [IQR])	10,1 [5,1, 18,6]	8 [6, 13]	ns
Fosfatasa alcalina, U/L (mediana [IQR])	106 [81, 143]	89 [71, 127]	ns
Klotho, pg/mL (mediana [IQR])	1,79 [0,82, 2,83]	0,79 [0,64, 1,20]	<b>0,03</b>
Índice de Kauppila (mediana [IQR])	6 [1, 16]	0 [0, 4]	<b>&lt;0,01</b>
<b>Parámetros nutricionales</b>			
Proteínas totales, mg/dl (media (SD))	63 (6)	63 (7)	ns
Albumina, mg/dl (media (SD))	37 (3)	36 (5)	ns
LTI, Kg/m <sup>2</sup> (mediana [IQR])	13,1 [11,4, 17]	16,3 [14,5, 18,5]	<b>0,04</b>
FTI, Kg/m <sup>2</sup> (media (SD))	14,8 (8,3)	10,1 (6,7)	ns
Ángulo de fase, ° (media (SD))	4,9 (1,1)	5,6 (1,1)	ns
IMC Kg/m <sup>2</sup> , (media (SD))	28,6 (7,1)	27,1 (5,4)	ns
<b>Parámetros inflamatorios</b>			
PCR, mg/dl (mediana [IQR])	0,3 [0,1, 1,7]	0,3 [0,1, 0,7]	ns
IFN γ, pg/ml (mediana [IQR])	7,33 [3,80, 15,50]	7,82 [5,88, 11,19]	ns
TNFα, pg/ml (mediana [IQR])	8,13 [4,13, 13,07]	8,50 [7,76, 12,48]	ns
IL-2, pg/ml (mediana [IQR])	1,60 [1,32, 2,30]	1,52 [1,26, 1,91]	ns
IL-6, pg/ml (media (SD))	11,26 (5,09)	11,31 (9,01)	ns
IL-10, pg/ml (mediana [IQR])	1,71 [1,36, 2,30]	1,91 [1,36, 4,78]	ns
CD4+ CD28null, % CD4+ (media (SD))	10,88 (4,53)	8,02 (2,97)	ns
Tang, % de linfocitos (media (SD))	1,65 (0,69)	1,96 (0,71)	ns
LDG inmaduros[log], % CD15+ (media (SD))	-0,44 (0,4)	-0,12 (0,4)	<b>&lt;0,01</b>
DEFA3 [log] (media (SD))	0,07 (0,41)	-0,12 (0,67)	ns
<b>Etiología</b>			
Glomerular, %	50%	23,5%	ns
Nefritis intersticial, %	0%	5,9%	ns
No filiada, %	14,29%	35,29%	ns
Otras, %	0%	11,76%	ns
Pielonefritis, %	0%	5,88%	ns
PQHR, %	14,29%	11,76%	ns
Nefroangioesclerosis, %	21,43%	5,88%	ns
<b>Tratamientos</b>			
Vitamina D nutricional	38%	41,1%	ns
Vitamina D activa	50%	47%	ns
Cinacalcet	35,7%	29,4%	ns
Captores de fósforo	64,28%	47%	ns
Corticoides	17,6%	18,75%	ns

Las variables se expresan como promedio±DS, %. Las diferencias fueron analizadas mediante los test T Student, U de Mann-Whitney o chi 2 según la distribución normal o no normal en la variable analizada. PTH: paratohormona; LTI: índice de tejido magro; FTI: índice de tejido graso; IMC: índice de masa corporal; IFN γ: interferón gamma; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleuquinas; CD4+ CD28null: células senescentes; Tang: células T angiogénicas; LDG inmaduros [log]: granulocitos de baja densidad inmaduros; transformación logarítmica; DEFA3[log]: defensasina 3; transformación logarítmica; PQHR: Poliquistosis hepatorenal. Remarcamos con negrita los valores significativos.

Tabla 2. Factores de riesgo de deterioro óseo ajustados por edad y sexo en pacientes con ERC5-DP

	Análisis crudo		Ajustado por edad		Ajustado por sexo		Ajustado por edad y sexo	
	Odds ratio [95% IC]	P	Odds ratio [95% IC]	P	Odds ratio [95% IC]	P	Odds ratio [95% IC]	P
I. Charlson	1,4 [0,97-2,01]	0,07	1,13 [0,71-1,82]	0,60	1,52 [0,96-2,41]	0,07	1,22 [0,68-2,21]	0,50
I. Kauppila	1,52 [0,96-2,41]	0,07	1,05 [0,93-1,17]	0,44	1,11 [0,98-1,25]	0,10	1,06 [0,93-1,21]	0,39
LTI	1 [0,93-1,07]	0,92	1 [0,93-1,07]	0,94	0,99 [0,91-1,07]	0,78	0,99 [0,91-1,07]	0,78
LDGi [log]	8,57 [2,58-52,39]	<b>0,00</b>	10,5 [2,5-92,5]	<b>0,01</b>	13,21 [2,71-179,6]	<b>0,01</b>	15,6 [2,6-300,2]	<b>0,02</b>
CD4+ CD28null	1,27 [0,97-1,68]	0,08	1,14 [0,84-1,54]	0,39	1,31 [0,96-1,79]	0,09	1,18 [0,84-1,66]	0,33
Sexo	13,5 [2,15-84,69]	<b>0,00</b>	15,63 [2,01-121,47]	<b>0,01</b>				
Edad	1,07 [1-1,15]	<b>0,04</b>			1,09 [0,99-1,19]	0,07		

Análisis de regresión logística entre cada uno de los factores de riesgo de daño óseo sin ajuste o ajustados por edad, sexo o edad y sexo. IC: intervalo de confianza; p: significación estadística; LTI: índice de tejido magro; LDG [log]: granulocitos de baja densidad inmaduros CD14+, CD16-, CD15+; transformación logarítmica; CD4+ CD28null: linfocitos T senescentes. Remarcamos con negrita los valores significativos.

**DISCUSIÓN**

Este trabajo muestra por primera vez la asociación entre la expansión de una subpoblación de LDG inmaduros LDG CD14+, CD16-, CD15+ y el deterioro óseo en pacientes de diálisis peritoneal, aumentos previamente vinculados a una mayor propensión a calcificación vascular.

El número de pacientes incluidos, aunque pueda parecer escaso, estuvo muy condicionado por los criterios de exclusión encaminados a seleccionar pacientes en los que se pudieran determinar marcadores precoces de inflamación y su papel en la patogénesis de la CV y deterioro óseo, sin interferencias de otros procesos o en estadios avanzados.

Respecto a las características generales de la población a estudio, la distribución por sexos es similar a la distribución general de los pacientes en diálisis (2/3 varones y 1/3 mujeres)<sup>20</sup>. Como cabría esperar, el deterioro óseo, pese a ser una variable cualitativa, fue predominante en el sexo femenino, como así también la mayor prevalencia de fracturas.

El riesgo de fractura aumenta conforme avanza la enfermedad renal crónica (ERC) y el tipo de terapia renal sustitutiva (TRS) influye en su comportamiento. Los pacientes con ERC G3-G5, aquellos en diálisis (G5D) y quienes son portadores de trasplante renal, tienen una incidencia de fractura de 2 a 100 veces mayor que la población general de la misma edad y sexo<sup>2</sup>. Así, la incidencia de fracturas se triplica en hemodiálisis (HD) y se duplica en diálisis peritoneal (DP) al comparar con el trasplante renal<sup>21</sup>. De hecho, se ha visto que las fracturas vertebrales son prevalentes hasta en la cuarta parte de pacientes en HD<sup>22</sup> y un metaanálisis demostró que la HD aumenta en un 60% el riesgo de fractura de cadera al comparar con la DP<sup>23</sup>.

En nuestro estudio, el 13% de pacientes en DP presentaron fracturas por fragilidad siendo mayoritariamente mujeres (75%). La misma influencia del sexo se vio al valorar osteopenia. Al agrupar fracturas y osteopenia bajo el término "deterioro óseo", vimos que éste fue tres veces mayor en mujeres, aunque representaran solamente un tercio de los participantes. Se sabe que el sexo femenino es un factor predictivo de fractura<sup>24</sup>. En el estudio realizado por Naylor et al. durante 3 años de seguimiento, se vio que hasta el 10% de mujeres y el 5% de hombres con ERC estadio 5 tuvieron al menos una fractura<sup>25</sup>.

Acompañando al sexo, la edad también fue diferente entre los pacientes con deterioro óseo, 10 años más, similar a los datos del estudio DOPPS<sup>26</sup>. Sin embargo, Maravic et al. demostraron que las mujeres en diálisis que presentan fractura de cadera son más jóvenes con respecto a la población general<sup>24</sup>. Este hecho refuerza el concepto de que la ERC es un condicionante para desarrollar un envejecimiento temprano que incluye el esqueleto.

En población general y en DP, se ha asociado la comorbilidad con el riesgo de fractura<sup>27</sup>. Los pacientes que tuvieron deterioro óseo presentaron un mayor índice de Charlson, siendo estos hallazgos prevalentes en hombres.

Por otro lado, la prevalencia de malnutrición en los pacientes en DP es hasta del 56%<sup>28</sup>. Se ha visto que en ellos predomina la malnutrición proteica como consecuencia de la baja ingesta, la pérdida de proteínas a través del líquido de diálisis y el aumento del catabolismo proteico<sup>29</sup>, condicionando a su vez a una enfermedad ósea adinámica.

En las unidades de diálisis cada vez es más frecuente el uso de BIE para evaluar el estado nutricional de nuestros pacientes. Interesa principalmente la masa magra, ya que es conocida la asociación entre sarcopenia y osteoporosis, llamada "sarco-osteoporosis"<sup>30</sup>. El riesgo de fracturas es mayor por el riesgo de caídas que condiciona la debilidad inducida por la sarcopenia<sup>31,32</sup>. Nuestro estudio concuerda con las investigaciones demostrando que a menor índice de tejido magro, mayor deterioro óseo, primordialmente en hombres. Verschuere et al. estudiaron a 679 hombres, entre quienes el 11,9% presentaban sarcopenia y un riesgo 3 veces superior de desarrollar osteoporosis<sup>33</sup>. Por ello, sería conveniente incentivar al uso más generalizado de mediciones de BIE en las consultas de Nefrología desde estadios tempranos de ERC.

En nuestro estudio, el índice de Kauppila elevado en los pacientes con deterioro óseo concuerda con el concepto que la "desmineralización ósea se asocia a mineralización vascular". Sin embargo, el índice de Kauppila no tuvo una contribución independiente de la edad y el sexo como posible factor determinante de deterioro óseo. Tampoco se evidenció una asociación entre deterioro óseo y los marcadores de actividad metabólica

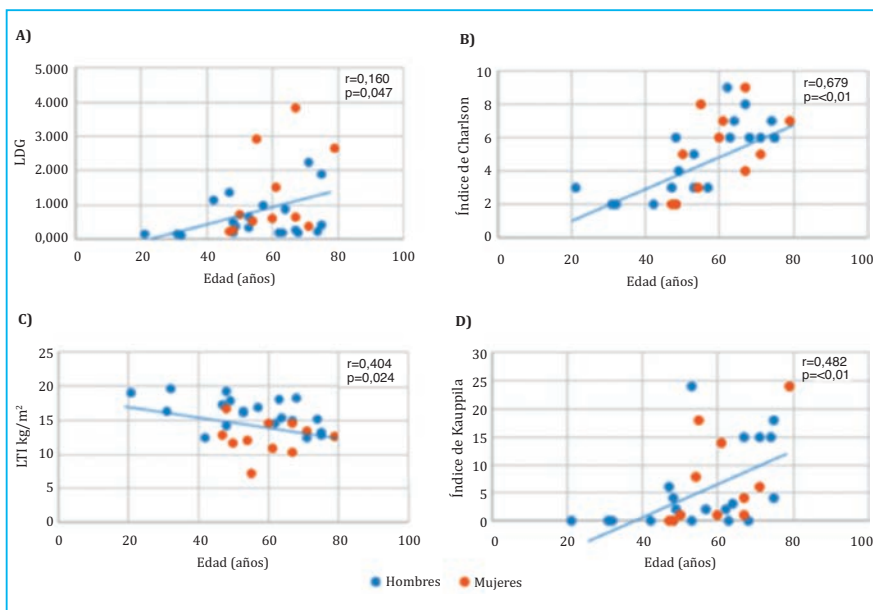
**Figura 1. Asociación de edad y el sexo con factores de riesgo de deterioro óseo en pacientes con ERC5-DP**

Gráfico de dispersión. Se muestra la correlación de la edad y el sexo con A) LDG: granulocitos de baja densidad inmaduros, B) índice de Charlson, C) LTI, índice de tejido magro, y, D) índice de Kauppila. Cada círculo representa un sujeto de estudio.

ósea, en consonancia con otros estudios donde solo la PTH se asoció débilmente al riesgo de fracturas en pacientes en diálisis<sup>27,34</sup>. Curiosamente el Klotho soluble fue más alto en quienes tienen deterioro óseo. Aunque se desconoce con precisión el efecto del Klotho en el hueso, se sabe que la delección del gen Klotho exclusivamente en los osteocitos, aumenta en lugar de disminuir, la tasa de formación ósea<sup>35,36</sup>. El impacto de acciones locales del Klotho soluble es un área de gran interés en nefrología, pero aun con muchas limitaciones debido a la variabilidad entre los ensayos comerciales disponibles para cuantificar los niveles circulantes de Klotho. Dadas las acciones antiinflamatorias y antienviejimiento del Klotho circulante, sería importante corroborar si los cambios en los niveles en sangre, influyen favorablemente en atenuar acciones leucocitarias que afectan la propensión a deterioro óseo y CV. En este momento, el impacto favorable de aumentos en el Klotho soluble en cuanto a protección inmunológica, renal y vascular se ha demostrado solo a nivel experimental.

El status de vitamina D, claramente deficitario, y los niveles similares de 25-hidroxi-vitamina D entre los pacientes que recibían o no suplementación, respecto a los tratados con metabolitos activos, refleja la escasa preocupación de los nefrólogos respecto a la importancia de corregir la deficiencia de vitamina D en el enfermo renal, corrección imposible de alcanzar con la administración de vitamina D activa. Los niveles de 25-hidroxi-vitamina D en los pacientes bajo estos tratamientos, descartan una posible inducción de la degradación de la vitamina D nu-

tricional debida a dosis excesivas de la forma activa<sup>37</sup> (tabla 1).

De las subpoblaciones de células inmunes más comúnmente usados para valorar daño vascular, únicamente la expansión exacerbada de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ se vinculó con el deterioro óseo. En el contexto de inflamación sistémica, se ha demostrado que los LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ son liberados tempranamente desde la médula ósea a través de vasos transcorticales cuando hay aumentos en la resorción ósea mediada por osteoclastos<sup>38</sup>. Aunque los LDG inmaduros CD14-, CD16-, CD15+ son una fracción minoritaria de los neutrófilos, en un estudio en 2.586 hombres, los individuos con menor densidad mineral ósea (DMO) presentaban un mayor recuento de neutrófilos<sup>39</sup>, lo que sugiere una asociación inversa entre salud ósea y tasa de granulopoyesis. De hecho, Terraciano y colaboradores encontraron que mujeres postmenopáusicas con una DMO baja, presentaron concentraciones altas en saliva, de un tipo de defensina liberada por neutrófilos llamada DEFA1<sup>40</sup>.

La contribución de aumentos de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ circulantes al grado de calcificación vascular en pacientes en diálisis peritoneal y hemodiálisis, demostró también la utilidad de mediciones de los niveles de RNA mensajero de la defensina 3 (DEFA3) en leucocitos mononucleares circulantes, como un marcador certero de granulopoyesis temprana con expansión de los LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+3. Sin embargo, en éste, los niveles de RNA mensajero de defensina 3 no se asocian a mayor deterioro óseo.

### LIMITACIONES

La mayor limitación de este estudio es que el deterioro óseo no fue evaluado con el patrón de oro, DXA, sino con la presencia de osteopenia radiológica y/o fracturas por fragilidad, siendo la resultante una variable categórica, con menor capacidad de mostrar una gradación de efectos.

Además, el pequeño tamaño muestral debido a los criterios de exclusión, si bien es apropiado para determinar efectos precoces y no las interferencias debidas a otros procesos que alteren la inmunidad, pueden limitar la cuantificación real de la influencia de otras variables.

### CONCLUSIONES

La contribución más importante de este estudio es la demostración la utilidad de mediciones de la densidad circulante de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ en estimar el deterioro óseo independientemente de la edad y el sexo del paciente. Esto convierte a los LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ circulantes en un marcador temprano de alteraciones en el hueso del enfermo renal que podrían permitir tomar una actitud proactiva tanto en el diagnóstico como en la toma de decisiones para atenuar su progresión.

Nuestro estudio guarda sincronía con el conocimiento actual en el que, el deterioro óseo es mayor en personas de edad avanzada, de sexo femenino, con un índice de Charlson elevado y en quienes tienen menor masa muscular. Por otra parte, entendemos que puede abrir nuevas vías para profundizar la investigación de los mecanismos patogéni-

cos de CKD-MBD en estadios más tempranos de ERC, con una muestra mayor de pacientes y utilizando DXA para una adecuada validación de estos hallazgos.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/01452, PI17/02181 y PI19/00532), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080), Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Retic REDinREN de ISCIII (RD16/0009/0017) y RICORS2040 (Kidney Disease). Julia Martín-Vírgala ha sido financiada por una beca de posgrado del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (programa FPU) y por una beca de movilidad FEIOMM 2022. Natalia Carrillo-López ha sido financiada por IDI-2018-000152 y IDI-2021-000080.

**Agradecimientos:** Un reconocimiento especial a los doctores Esmeralda Castelblanco, Washington University School of Medicine. St. Louis, Missouri, USA; y, José Luis Fernández-Martín, Unidad de Investigación de Metabolismo Óseo, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, España, por su contribución al análisis estadístico de los datos de este estudio.



**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006 Jun;69(11):1945-53.
- Moe SM, Nickolas TL. Fractures in Patients with CKD: Time for Action. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016 Nov 7;11(11):1929-31.
- Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N, Ulloa C, Seijo M, Rodríguez-García M, Rodríguez-Suárez C, et al. A subset of low density granulocytes is associated with vascular calcification in chronic kidney disease patients. *Sci Rep.* 2019 Sep 13;9(1):13230.
- López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Pérez-Álvarez ÁI, Suárez-Díaz S, Mozo L, et al. Low-density granulocytes and monocytes as biomarkers of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2020 Jul 1;59(7):1752-64.
- Zulc P. Vascular calcification and fracture risk. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015 Aug;12(2):139-41.
- Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;17(7):2034-47.
- Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med.* 2017 Sep;23(9):1072-9.
- Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N, Ulloa C, Martín-Carro B, Rodríguez-Suárez C, Naves-Díaz M, et al. Novel Immune Cell Subsets Exhibit Different Associations With Vascular Outcomes in Chronic Kidney Disease Patients-Identifying Potential Biomarkers. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:618286.
- Kazama JJ, Iwasaki Y, Fukagawa M. Uremic osteoporosis. *Kidney Int Suppl* (2011). 2013 Dec;3(5):446-50.
- Bover J, Ureña-Torres P, Cozzolino M, Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C. The Non-invasive Diagnosis of Bone Disorders in CKD. *Calcif Tissue Int.* 2021 Apr;108(4):512-27.
- Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Jul;15(7):953-60.
- Eustace JA, Astor B, Muntner PM, Ikizler TA, Coresh J. Prevalence of acidosis and inflammation and their association with low serum albumin in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1031-40.
- Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet.* 2016 Jul 16;388(10041):276-84.
- Tomeleri CM, Cavaglieri CR, de Souza MF, Cavalcante EF, Antunes M, Nabuco HCG, et al. Phase angle is related with inflammatory and oxidative stress biomarkers in older women. *Experimental Gerontology.* 2018 Feb 1;102:12-8.
- Barrea L, Muscogiuri G, Pugliese G, Laudisio D, de Alteriis G, Graziadio C, et al. Phase Angle as an Easy Diagnostic Tool of Meta-Inflammation for the Nutritionist. *Nutrients.* 2021 Apr 24;13(5):1446.
- Do JY, Kim AY, Kang SH. Association Between Phase Angle and Sarcopenia in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Front Nutr.* 2021 Sep 24;8:742081.
- Huang Y, Ge Y, Li F, Zhang C, Zhang Z, Xu N, et al. Elucidating the relationship between nutrition indices and coronary artery calcification in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Ther Apher Dial.* 2022 Feb;26(1):71-84.
- Sarmiento-Dias M, Santos-Araújo C, Poínhos R, Oliveira B, Sousa M, Simões-Silva L, et al. Phase Angle Predicts Arterial Stiffness and Vascular Calcification in Peritoneal Dialysis Patients. *Perit Dial Int.* 2017 Aug;37(4):451-7.
- Piccoli A. Identification of operational clues to dry weight prescription in hemodialysis using bioimpedance vector analysis. The Italian Hemodialysis-Bioelectrical Impedance Analysis (HD-BIA) Study Group. *Kidney Int.* 1998 Apr;53(4):1036-43.
- Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, et al. Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología.* 2018 Nov 1;38(6):606-15.
- Dey V, Farrah TE, Traynor JP, Spalding EM, Robertson SE, Geddes CC. Symptomatic fracture risk in the renal replacement therapy population. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Jul 1;32(7):1211-6.
- Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Díaz-López JB, Díaz-Corte C, Cannata-Andía JB, et al. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Jan;24(1):239-46.
- Boonpheng B, Thongprayoon C, Mao MA, Wijarnprecha K, Bathini T, Kaewput W, et al. Risk of hip fracture in patients on hemodialysis versus peritoneal dialysis: A meta-analysis of observational studies. *J Evid Based Med.* 2019 May;12(2):98-104.
- Maravic M, Ostertag A, Torres PU, Cohen-Solal M. Incidence and risk factors for hip fractures in dialysis patients. *Osteoporos Int.* 2014 Jan;25(1): 159-65.
- Naylor KL, McArthur E, Leslie WD, Fraser LA, Jamal SA, Cadarette SM, et al. The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014 Oct;86(4):810-8.
- Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD, Bradbury BD, Robinson BM, Kerr PG, et al. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2014 Jan;85(1):166-73.
- Ma MKM, Yap DYH, Yip TPS, Lui SL, Lo WK. Charlson co-morbidity index and albumin significantly associated with fracture risk in peritoneal dialysis patients. *Nephrology (Carlton).* 2013 May;18(5):365-8.
- Dombros NV. Pathogenesis and management of malnutrition in chronic peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16 Suppl 6:111-3.
- Guerrero-Riscos MA. Nutrición y diálisis adecuada en diálisis peritoneal. *Revista de la Sociedad Española de Enfermería Nefrológica.* 1999;2(1):6-17.
- Li G, Zhang L, Wang D, AIQudsy L, Jiang JX, Xu H, et al. Muscle-bone crosstalk and potential therapies for sarco-osteoporosis. *J Cell Biochem.* 2019 Sep;120(9):14262-73.
- Jamal SA, Leiter RE, Jassal V, Hamilton CJ, Bauer DC. Impaired muscle strength is associated with fractures in hemodialysis patients. *Osteoporos Int.* 2006;17(9):1390-7.
- Molina P, Carrero JJ, Bover J, Chauveau P, Mazzaferro S, Torres PU, et al. Vitamin D, a modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017 Oct;8(5):686-701.
- Verschueren S, Gielen E, O'Neill TW, Pye SR, Adams JE, Ward KA, et al. Sarcopenia and its relationship with bone mineral density in middle-aged and elderly European men. *Osteoporos Int.* 2013 Jan;24(1):87-98.
- Danese MD, Kim J, Doan QV, Dylam M, Griffiths R, Chertow GM. PTH and the Risks for Hip, Vertebral, and Pelvic Fractures Among Patients on Dialysis. *American Journal of Kidney Diseases.* 2006 Jan 1;47(1):149-56.
- Moyses RMA, Dusso A. Is osteocyte Klotho bad for bone health? *Kidney International.* 2017 Sep 1;92(3):540-3.
- Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, Nagan K, Amamo K, Ide N, et al. Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int.* 2017 Sep;92(3):599-611.
- Dusso AS, Bauerle KT, Bernal-Mizrachi C. Non-classical Vitamin D Actions for Renal Protection. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:790513.
- Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, et al. A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nat Metab.* 2019 Feb;1(2):236-50.
- Valderrábano RJ, Lui LY, Lee J, Cummings SR, Orwoll ES, Hoffman AR, et al. Bone Density Loss Is Associated with Blood Cell Counts. *J Bone Miner Res.* 2017 Feb;32(2):212-20.
- Terracciano R, Migliaccio V, Savino R, Pujja A, Montalcini T. Association between low bone mineral density and increased  $\alpha$ -defensin in salivary fluid among postmenopausal women. *Menopause.* 2013 Dec;20(12):1275-9.





OPEN ACCESS

**Edited by:**

Hui Y. Lan,  
The Chinese University of Hong  
Kong, China

**Reviewed by:**

Daw-Yang Hwang,  
National Health Research  
Institutes, Taiwan  
Xiao-Ming Meng,  
Anhui Medical University, China

**\*Correspondence:**

Ana Suárez  
anasua@uniovi.es

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work and share first  
authorship

<sup>‡</sup> These authors have contributed  
equally to this work and share second  
authorship

<sup>§</sup> These authors have contributed  
equally to this work and share senior  
authorship

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Nephrology,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 16 October 2020

**Accepted:** 07 April 2021

**Published:** 25 May 2021

**Citation:**

Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N,  
Ulloa C, Martín-Carro B,  
Rodríguez-Suárez C, Naves-Díaz M,  
Sánchez-Álvarez E,  
Rodríguez-García M, Arcidiacono MV,  
Fernández-Mariño B,  
Cannata-Andía JB, Suárez A and  
Dusso AS (2021) Novel Immune Cell  
Subsets Exhibit Different Associations  
With Vascular Outcomes in Chronic  
Kidney Disease Patients—Identifying  
Potential Biomarkers.  
Front. Med. 8:618286.  
doi: 10.3389/fmed.2021.618286

# Novel Immune Cell Subsets Exhibit Different Associations With Vascular Outcomes in Chronic Kidney Disease Patients—Identifying Potential Biomarkers

Javier Rodríguez-Carrio<sup>1,2,3†</sup>, Natalia Carrillo-López<sup>2,3,4†</sup>, Catalina Ulloa<sup>2,5†</sup>, Beatriz Martín-Carro<sup>2,3,4†</sup>, Carmen Rodríguez-Suárez<sup>6</sup>, Manuel Naves-Díaz<sup>2,3,4</sup>, Emilio Sánchez-Álvarez<sup>4,5</sup>, Minerva Rodríguez-García<sup>4,6</sup>, María Vittoria Arcidiacono<sup>2</sup>, Belinda Fernández-Mariño<sup>7</sup>, Jorge B. Cannata-Andía<sup>2,3,4,8§</sup>, Ana Suárez<sup>1,39\*</sup> and Adriana S. Dusso<sup>2,3,4,9§</sup>

<sup>1</sup> Area of Immunology, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain, <sup>2</sup> Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>4</sup> REDinREN-ISCIII, Oviedo, Spain, <sup>5</sup> Department of Nephrology, Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón, Spain, <sup>6</sup> Division of Nephrology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>7</sup> Department of Radiology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>8</sup> Department of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain, <sup>9</sup> Division of Endocrinology, Metabolism and Lipid Research, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, United States

**Background and Aims:** Alterations in novel immune cell subsets, such as angiogenic T cells (Tang), senescent T cells (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>), and monocyte subsets are associated with impaired vascular homeostasis in several inflammatory conditions. However, mediators underlying vascular deterioration in chronic kidney disease (CKD) are poorly characterized. This study assessed their role in the vascular deterioration of CKD using a broad spectrum of surrogate markers ranging from altered functionality to overt calcification.

**Methods:** Tang (CD3<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cells, and monocytes [CD14/CD16 subsets and angiotensin-converting enzyme (ACE) expression] were measured in peripheral blood by flow cytometry in 33 CKD stage 5 patients undergoing peritoneal dialysis (CKD5-PD) and 15 healthy controls (HCs). Analyses were replicated in a hemodialysis cohort. Vascular surrogate markers (including adventitial vasa vasorum, pulse wave velocity, intima-media thickness, and vascular calcification) were assessed by appropriate imaging methods.

**Results:** In CKD5-PD, decreased Tang levels ( $p < 0.001$ ) were unrelated to clinical features or traditional cardiovascular (CV) risk factors but correlated negatively with troponin T levels ( $r = -0.550$ ,  $p = 0.003$ ). Instead, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> frequency was increased ( $p < 0.001$ ), especially in those with vascular calcifications. Quantitative and qualitative differences were also observed within the monocyte pool, a shift toward CD16<sup>+</sup> subsets and ACE expression being found in CKD. Equivalent results were observed in the replication cohort. Each subset associated distinctly with adverse vascular outcomes in univariate and multivariate analyses: while Tang depletion

was linked to poor vascular function and subclinical atherosclerosis, increases in CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> were associated with overt vascular thickening and calcification. Monocytes were not independently associated with vascular outcomes in CKD patients.

**Conclusions:** Novel T cell and monocyte subsets are altered in CKD. Altered T-cell subpopulations, but not monocytes, exhibited distinct associations with different vascular outcomes in CKD. Tang are emerging biomarkers of subclinical vascular deterioration in CKD.

**Keywords:** atherosclerosis, vasa vasorum, CKD, inflammation, vascular outcomes

## INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is hallmarked by chronic systemic inflammation, which not only plays a role in aggravating renal damage, but it also contributes to the development of comorbidities, such as cardiovascular (CV) disease (1, 2).

Immune dysregulation is known to be involved in vascular traits such as endothelial damage, vascular dysfunction, or atherosclerotic plaque development, thus leading to CV disease (3). Although both innate and adaptive immune responses are thought to be involved, the exact mediators are yet to be characterized. Even though a crucial role for T cells and monocytes has been largely hypothesized (4, 5), it has not been until recently that specific, novel subsets of T cells and monocytes were documented to have dedicated functions in vascular homeostasis.

Within the T-cell compartment, angiogenic T cells (Tang) were described as a subset of naive T cells with key roles in vasculogenesis and vascular repair due to their functional cooperation with endothelial progenitor cells (6). As such, Tang have been proven to promote endothelial cell proliferation and function *in vitro* and trigger vessel formation and repair *in vivo* (6). Of note, a decreased frequency of circulating Tang has been reported in several conditions in association with adverse CV outcomes (7–11). However, Tang levels have not been characterized in CKD patients yet. On the other hand, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cells are known to be a biomarker of immunosenescence, and their noxious, cytotoxic-mediated effects on the vasculature have been described *in vitro* and *in vivo*, including endothelial cell apoptosis as well as plaque destabilization and rupture (12–14).

Moreover, recent breakthroughs on monocyte biology need to be considered. First, although classically considered a unique and relative uniform population, monocytes are now recognized as a mixture of phenotypical and functionally different subsets, including at least three categories based on their CD14/CD16 surface expression: classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), and non-classical (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) (15, 16). Since these subsets differ in terms of their ability to elicit cytokine responses, antigen presentation, or phagocytosis (15, 17), it is tempting to speculate that they may have different effects on vascular homeostasis. In addition, changes in the expression of other markers, such as angiotensin-converting enzyme (ACE), have been reported (18, 19) and linked to changes in monocyte activities (19). Even though the role of monocytes in

vascular homeostasis has been a topic of major interest, how this monocyte heterogeneity relates to vascular outcomes in CKD remains unknown (20).

Emerging evidence points to an important role of these subsets in vascular homeostasis in other conditions. However, evidence is lacking in CKD. First, most of the studies have focused on individual cell populations, hence making it difficult to compare the effects of the different subsets. Second, vascular involvement in CKD is a complex scenario with multiple stages and pathogenic circuits. Then, focusing on a single entity, such as medial calcification or atherosclerosis does not allow to draw firm conclusions on the global picture. Overcoming these limitations will help not only to gain understanding toward these potential disease mediators but will also pave the ground for their potential use as biomarkers in the clinical setting. Therefore, the main aim of this study was to evaluate potential alterations of different novel immune cell subsets, previously related to vascular homeostasis, as well as their associations with a broad spectrum of vascular surrogate markers, ranging from subclinical atherosclerosis to overt vascular calcification, in CKD patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

Approval for the study was obtained from the institutional review board (Comité de Ética Regional de Investigación Clínica, reference PI17/02181) in compliance with the Declaration of Helsinki. All participants gave a written informed consent prior to their inclusion in the study.

### Study Participants

Our study involved 33 CKD stage 5 patients undergoing peritoneal dialysis (CKD5-PD) recruited from the Peritoneal Dialysis Outpatient Clinic [Unidad de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Spain]. A group of 15 individuals with normal renal function from the general population were recruited as healthy controls (HCs). Additionally, 16 CKD stage 5 patients on hemodialysis (CKD5-HD) (Hemodialysis Outpatient Clinic, HUCA) and six HCs were independently recruited as a replication cohort (Supplementary Table 1). Exclusion criteria were immunosuppressive treatment, pregnancy, diagnosis of immune-mediated disease, cancer or diabetes mellitus, recent (<3 months) or current infections, previous CV disease, abdominal aneurysm or intermittent claudication, or previous

carotid surgery. The burden of traditional CV risk factors was assessed by the SCORE algorithm (low-risk charts) according to the European Society of Cardiology (ESC) guidelines (21). The SCORE algorithm integrates information about total cholesterol levels, blood pressure (systolic), smoking status, age, and gender, hence deriving an estimated figure of CV risk (10-year risk for fatal CV). The estimated risk is used in clinical practice to stratify patients [based on ESC guidelines (21)] into categories of risk for preventive pharmacological and non-pharmacological interventions. The SCORE algorithm has been validated in European real-world populations.

Blood samples were obtained by venipuncture (during a clinical appointment before dialysis). Automated serum biochemical parameters, lipid analysis, and complete blood counts were performed on all the participants at the Laboratorio de Medicina (HUCA) by means of routine laboratory methods. Serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analyses.

### Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral blood samples were immediately processed to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by centrifugation (1,900 rpm, 20 min) on density gradients (Lymphosep, Biowest, Germany).

The analysis of PBMCs was performed by flow cytometry. First, PBMCs were treated with FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Germany) for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to avoid unspecific antibody FcR binding. Then, cells were incubated with CD14 FITC (Immunostep, Spain), CD16 APC-Cy7 (BioLegend, Germany), and ACE APC (Miltenyi Biotec) or CD3 PerCP-Cy-5, 5 (Tonbo Biosciences, Belgium), CD184 PE-Cy7 (BD Biosciences, Germany), CD31 FITC (BD Biosciences), CD4 PE (Immunostep), and CD28 APC-Cy7 (Thermo Fischer, Germany) or corresponding isotype antibodies for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  protected from light. Next, cells were washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry [FACS Canto II (BD Biosciences) with FACS Diva 6.5 software].

Then, "live gate" excluding debris and no cellular events was designed. Lymphocyte and monocyte regions were defined according to their forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) features. Gating was performed based on the signal provided by the isotype controls (Supplementary Figure 1). Tang were defined as previously described (9). In brief, lymphocytes were evaluated for CD3 expression, and those  $\text{CD31}^{+}\text{CD184}^{+}$  within the  $\text{CD3}^{+}$  gate were considered Tang. Tang were further subdivided into  $\text{CD4}^{+}\text{Tang}$  and  $\text{CD8}^{+}\text{Tang}$  subsets (Figure 1A).  $\text{CD3}^{+}$  cells were evaluated for CD4 and CD8 expression, and  $\text{CD4}^{+}$  cells lacking CD28 expression were defined as  $\text{CD4}^{+}\text{CD28}^{\text{null}}$  cells (22) (Figure 1A). For the analysis of monocytes, events contained in the monocyte region (FSC/SSC) were evaluated for their CD14 and CD16 expression, and subsets were defined as follows: classical ( $\text{CD14}^{+}\text{CD16}^{-}$ ), intermediate ( $\text{CD14}^{+}\text{CD16}^{+}$ ), and non-classical ( $\text{CD14}^{\text{low}}\text{CD16}^{+}$ ) monocytes. All monocytes were contained within the FSC/SSC-defined monocyte region. Moreover, no lymphocytes were found within this region, as these

cells were all characterized by a  $\text{CD14}^{-}$  expression (Figure 2A). No monocytes were observed within the lymphocyte gate either. Finally, ACE expression was evaluated in the whole monocyte region as well as in each of the different monocyte subsets;  $\text{ACE}^{+}$  events within each population were calculated (Figure 2A). Absolute levels were computed by applying the lymphocyte/monocyte counts obtained in the automated blood cell counts.

### Quantification of Circulating Cytokines

Circulating interleukin (IL)-10, IL-6, IL-2, tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  and interferon (IFN) $\gamma$  levels were measured in serum samples using a bead-based multiplex assay (BiolegendPlex, BioLegend), following the protocol provided by the manufacturer. Samples were analyzed in a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) under FACS Diva 6. The detection limits were 1.2 pg/ml (IL-10 and IL-2) or 2.4 pg/ml (IL-6, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ).

### Angiotensin-Converting Enzyme Gene Expression Analysis

The gene expression of ACE was analyzed in total RNA extracted from PBMCs by using TRI reagent (Sigma-Aldrich). After reverse transcription using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), quantitative real-time PCR (qPCR) reactions were performed in triplicate using the Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies), Fast Start Universal Probe Master (Roche), and pre-developed assays for qPCR [ACE: Hs00174179\_m1 and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): Hs99999905\_m1; Thermo-Fisher Scientific]. ACE expression was quantified as relative units to GAPDH expression by comparing threshold cycles using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method.

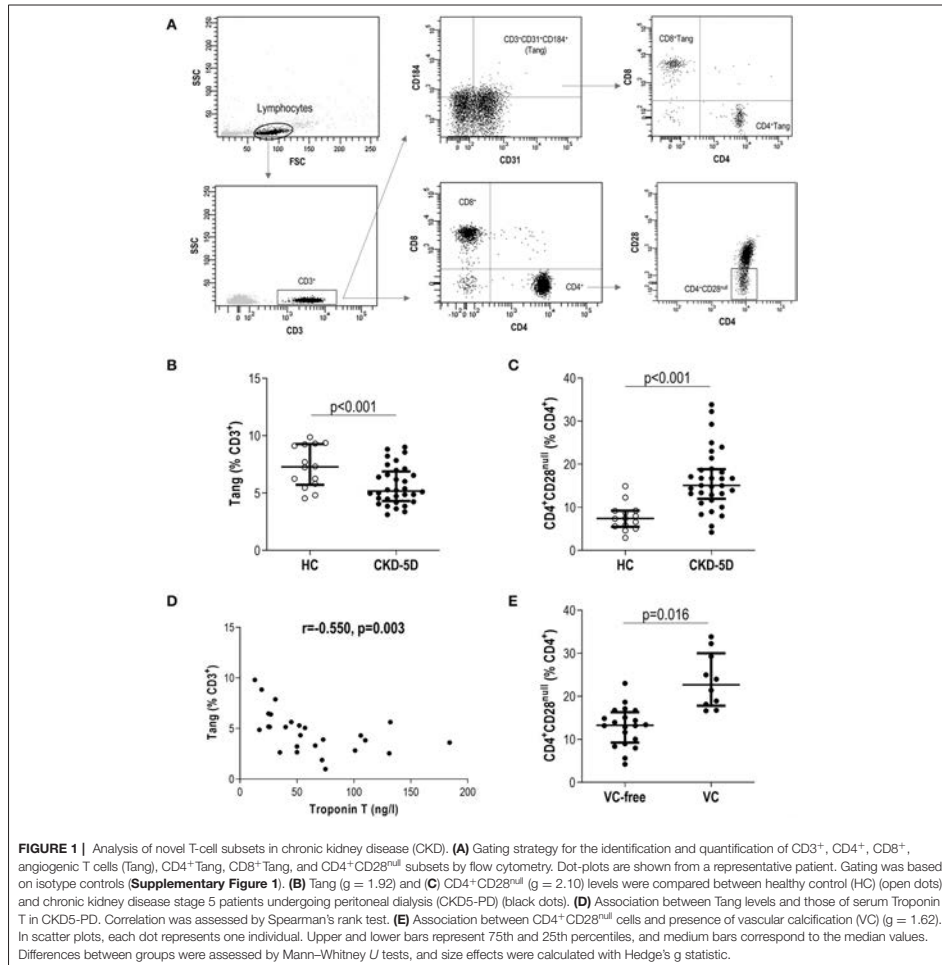
### Surrogate Vascular Outcomes

Abdominal aortic calcification [Kauppila Index (KI)] was quantified in lateral lumbar X-rays. Carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) was measured using Complior Analyze (ALAM Medical) according to the manufacturer's instructions. Results are the average of three optimal measurements.

B-mode ultrasound was performed by an experienced radiologist using a Toshiba-Aplio XG machine (Toshiba American Medical Systems). To evaluate left carotid intima-media thickness (cIMT) as well as carotid and femoral plaque presence (either cIMT  $>1.5$  mm or a focal thickening going over into the arterial lumen by at least 50% of the surrounding cIMT value) (23), all subjects, laid in a supine position, underwent a prior axial examination of the extracranial carotid artery followed by a longitudinal exploration.

Plaques were described by number, location, dimension, echogenicity, and homogeneity (stable and unstable).

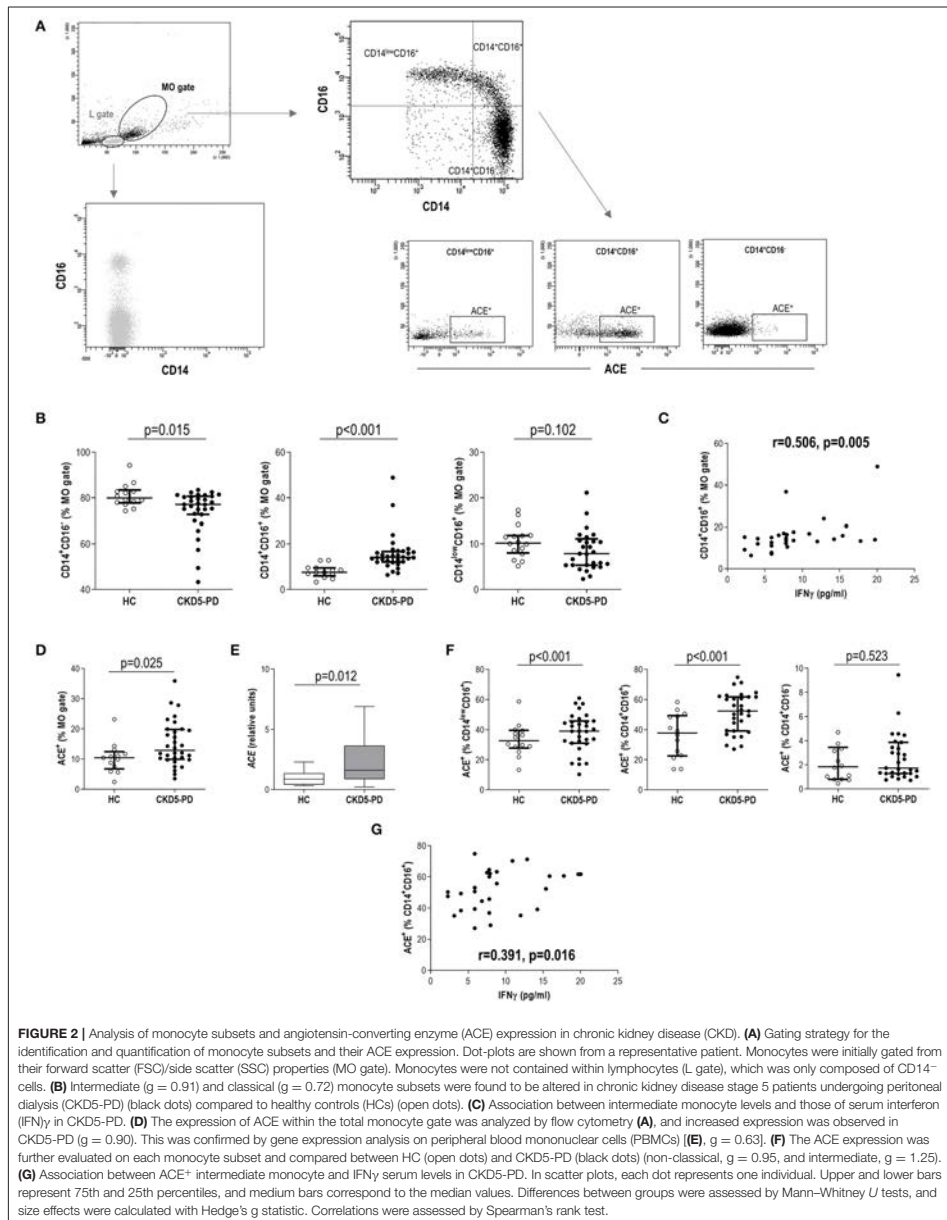
Adventitial vasa vasorum (aVV), the plexus of microvessels surrounding the adventitial layer, were quantified following a similar strategy to that validated by Arcidiacono et al. (24) but avoiding the use of a contrast agent. Indeed, the very sensitive Superb Microvascular Imaging Ultrasound (Toshiba Aplio 500), designed for the detection of small-diameter blood vessel flow,



was used. Vasa vasorum density was quantified in the left carotid artery and, for the first time, in the femoral arteries of HC and CKD5-PD (**Supplementary Figure 2**). The ImageJ program was used for the quantification of aVV density of the adventitial vessels, identified by an experienced radiologist, as depicted in representative **Supplementary Figure 2**. All surrogate vascular measurements were performed by an operator blinded to the study participants.

## Statistical Analyses

Continuous variables were expressed as median [interquartile range (IQR)] or mean  $\pm$  standard deviation according to the distribution of the variables. Categorical variables were summarized as *n* (%). Differences between groups were assessed by Mann–Whitney *U* tests or Student *T* tests, as appropriate. Hedge's *g* statistic was calculated in order to evaluate size effects (values  $g > 0.6$  and  $g > 0.80$  were considered of medium effect



and large effect, respectively) (25). The associations between continuous variables were evaluated by correlations (Spearman's rank test) or linear regression models, either univariate or multivariate adjusted by confounders. B coefficients and 95% confidence intervals (CIs) were computed. A  $p$ -value  $< 0.050$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 24.0 and GraphPad Prism 8.0 for Windows.

## RESULTS

### Novel T-Cell Subsets in Chronic Kidney Disease

A total of 33 CKD5-PD and 15 HCs were recruited for this study (Table 1). Tang ( $CD3^+CD31^+CD184^+$ ) levels in peripheral blood were evaluated by flow cytometry, and a highly significant lower Tang frequency was observed in CKD5-PD (Figure 1B). No differences were found in the frequency of  $CD4^+$  [46.55% (21.07) vs. 48.66% (19.45),  $p = 0.518$ ] and  $CD8^+$  subsets [42.20% (21.01) vs. 41.09% (18.16),  $p = 0.258$ ] within the Tang pool between patients and controls. As a consequence, both  $CD4^+$ Tang [1.88% (1.16) vs. 3.43% (1.80),  $p < 0.001$ ,  $g = 1.82$ ] and  $CD8^+$ Tang [2.02% (0.88) vs. 3.11% (1.72),  $p < 0.001$ ,  $g = 1.15$ ] were found to be decreased in CKD5-PD. Moreover,  $CD4^+CD28^{\text{null}}$  cells were also evaluated, and CKD5-PD exhibited a marked increase in this cell population compared to HC (Figure 1C). These differences were maintained when evaluated within the total lymphocyte region [Tang: 1.68% (1.05) vs. 3.38% (1.44),  $p < 0.001$ ,  $g = 0.92$ ; and  $CD4^+CD28^{\text{null}}$ : 9.06% (4.16) vs. 5.09% (2.52),  $p < 0.001$ ,  $g = 1.10$ ]. Importantly, equivalent results were observed when the absolute levels were computed [Tang: 2.38 (2.29) vs. 7.00 (4.99)  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $p < 0.001$ ,  $g = 2.30$ ;  $CD4^+CD28^{\text{null}}$ : 11.65 (8.83) vs. 5.82 (10.34)  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $p = 0.035$ ,  $g = 0.70$ ]. Similarly, no differences were observed in the  $CD3^+$  [HC: 46.25% (17.39) vs. CKD: 42.26% (29.55),  $p = 0.447$ ],  $CD4^+$  (61.86% (12.55) vs. 60.99% (14.81),  $p = 0.645$ ) or  $CD8^+$  subsets [33.86% (12.95) vs. 34.85% (12.00),  $p = 0.800$ ].

Next, in order to gain insights into the origin of these alterations, their associations with laboratory parameters and clinical features were analyzed. Whereas, Tang levels were associated with those of total cholesterol ( $r = -0.665$ ,  $p = 0.005$ ) and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol ( $r = -0.372$ ,  $p = 0.021$ ) in HC, these associations were not found in patients ( $r = -0.037$ ,  $p = 0.853$  and  $r = -0.203$ ,  $p = 0.301$ , respectively). Interestingly, Tang levels showed an inverse correlation with serum troponin T (TnT) concentration in CKD5-PD (Figure 1D). Regarding  $CD4^+CD28^{\text{null}}$  cells, patients with vascular calcifications exhibited higher levels of this subset than their calcification-free counterparts (Figure 1E). No associations were observed for Tang or  $CD4^+CD28^{\text{null}}$  cells with the rest of biochemical parameters examined in either HCs or patients [all  $p > 0.050$ , or with time on dialysis or medications in patients (all  $p > 0.050$ )]. Glucocorticoid usage was not observed to have an effect on these subpopulations (Tang:  $p = 0.356$ ,  $CD4^+CD28^{\text{null}}$ :  $p = 0.239$ ). Excluding patients under glucocorticoid treatment yielded equivalent results. Similarly, no associations were observed between Tang

or  $CD4^+CD28^{\text{null}}$  cells with the levels of circulating cytokines (Supplementary Tables 1, 2).

Finally, we recruited a replication cohort consisting of 16 CKD5-HD and six age- and gender-matched controls (Supplementary Tables 3, 4) in order to validate our results. The independent analysis of this cohort confirmed the differences observed in peritoneal dialysis patients for these cell subsets (Supplementary Figure 2). No major differences in blood cell counts and clinical parameters were observed between CKD5-HD and their peritoneal dialysis counterparts.

These results suggest that CKD is hallmarked by distinct alterations of T-cell subsets.

### Monocyte Subsets and Angiotensin-Converting Enzyme Expression

The analysis of monocyte subsets (Figure 2A) revealed an increased frequency of intermediate monocytes in CKD5-PD at the expense of a reduction in the classical group compared to HC (Figure 2B). Equivalent results were observed when absolute levels were calculated [intermediate: 7.67 (5.61) vs. 3.89 (3.71)  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $p < 0.001$ ,  $g = 0.89$ ; classical: 31.22 (17.88) vs. 42.18 (18.35)  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $p = 0.035$ ,  $g = 0.62$ ; non-classical: 3.90 (4.10) vs. 4.10 (2.28)  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $p = 0.696$ ]. Intermediate monocytes were found to be positively correlated with IFN $\gamma$  serum levels (Figure 2C), whereas no other associations were observed with the rest of cytokines analyzed. No effect was observed for medications (all  $p > 0.050$ ), including glucocorticoids (intermediate:  $p = 0.128$ , classical:  $p = 0.318$ , non-classical:  $p = 0.564$ ). Excluding patients under glucocorticoid treatment yielded equivalent results.

Additionally, the surface expression of ACE was analyzed in monocytes. Monocytes from CKD5-PD exhibited an increased ACE expression (Figure 2D). This increase was confirmed at the gene expression level by RT-PCR (Figure 2E). Interestingly, the ACE expression was not uniform within the monocyte pool, but differences were noted among subsets. It was mainly expressed by intermediate and non-classical monocytes, whereas their classical counterparts exhibited a negligible expression (Figure 2A). Moreover, increased expression was observed in CKD5-PD compared to controls in both intermediate and non-classical subsets compared to HC (Figure 2F). Of note, ACE expression (analyzed by flow cytometry) on intermediate monocytes was found to be positively correlated with IFN $\gamma$  serum levels (Figure 2G).

Furthermore, equivalent analyses were performed in our replication cohort, and similar results were obtained (Supplementary Figure 3).

All these findings suggest that quantitative and qualitative differences characterize the monocyte pool in CKD patients, linked at least in part to IFN $\gamma$  levels.

### Novel Immune Cell Subsets and Vascular Surrogate Markers

Next, vascular surrogate markers (including aVv, PWV, cIMT) and Kauppila scores were measured in 17 CKD5-PD

**TABLE 1 |** Demographical, laboratory, and clinical parameters of individuals recruited for this study.

	HC (n = 15)	CKD5-PD (n = 33)	P-value
Age, years, mean (range)	48.00 (22.00–68.00)	55.00 (21.00–77.00)	0.070
Sex, women/men	10/5	13/20	0.080
<b>Laboratory parameters</b>			
Albumin, mg/dl	44.17 ± 1.95	34.37 ± 4.35	<0.001
Urea, mg/dl	33.46 ± 8.08	132.66 ± 43.76	<0.001
Creatinine, mg/dl	0.78 ± 0.17	7.81 ± 2.72	<0.001
Plasma Ca, mmol/l	2.34 ± 0.07	2.17 ± 0.16	<0.001
Plasma phosphate, mmol/l	1.04 ± 0.18	1.64 ± 0.42	<0.001
PTH, pg/ml	49.60 ± 15.52	371.03 ± 198.61	<0.001
Total cholesterol, mg/dl	202.25 ± 49.20	159.32 ± 40.28	0.005
HDL cholesterol, mg/dl	67.63 ± 13.14	59.00 ± 24.52	0.017
LDL cholesterol, mg/dl	113.00 ± 38.38	74.71 ± 38.56	0.002
Triglycerides, mg/dl	65.53 ± 25.54	131.82 ± 75.33	0.003
25(OH)-vitamin D, ng/ml	32.93 ± 15.38	10.10 ± 6.89	<0.001
CRP, mg/dl	0.14 ± 0.07	0.64 ± 0.86	0.002
Troponin T, ng/l	5.33 ± 3.45	61.48 ± 41.82	<0.001
<b>Blood cell counts (10<sup>9</sup>/μl) median (IQR)</b>			
Leukocytes	5.67 (2.06)	6.25 (3.59)	0.380
Neutrophils	2.94 (1.15)	3.52 (2.27)	0.075
Lymphocytes	1.96 (0.91)	1.22 (0.85)	0.022
Monocytes	0.44 (0.19)	0.56 (0.23)	0.071
Eosinophils	0.11 (0.10)	0.23 (0.20)	0.002
Basophils	0.04 (0.02)	0.05 (0.05)	0.109
<b>Clinical features</b>			
Vascular calcifications, n (%)		18 (54.5)	
Kauppila score		7.88 ± 8.98	
Time on dialysis, months (median (IQR))		15.00 (16.00)	
Systolic blood pressure, mm Hg		133.88 ± 16.04	
Diastolic blood pressure, mm Hg		81.05 ± 10.70	
<b>Treatments, n (%)</b>			
Paricalcitol		15 (45.4)	
Phosphate binders		18 (54.5)	
Statins		21 (63.6)	
Methylprednisolone <sup>‡</sup>		9 (27.22)	
Epo		24 (72.7)	

Variables were summarized as mean ± SD or n (%), unless otherwise stated. Differences were assessed by Student t tests, Mann–Whitney U tests, or  $\chi^2$  tests, as appropriate. <sup>‡</sup> 8/9 patients were under low-dose glucocorticoids (<5 mg/day).

CKD5-PD, chronic kidney disease stage 5 patients undergoing peritoneal dialysis; CRP, C-reactive protein; HC, healthy control; HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; IQR, interquartile range; LDL cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol.

and 14 HCs. No differences in demographical, clinical, medications, or blood counts were observed between patients with and without vascular assessments, thus indicating that the subset analyzed was representative of the whole population (Supplementary Table 5). Of note, patients exhibited higher carotid aVV expansion and a trend in femoral location, together with higher PWV and cIMT values than HCs (Table 2).

In order to evaluate whether immune cell populations could be regarded as biomarkers of subclinical CV endpoints, correlations with these assessments were performed (Table 3). Interestingly, Tang were strongly correlated with aVV and PWV measurements. Importantly, these associations were maintained

after correcting for the effect of traditional CV risk factors (Table 4). On the other hand, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cells were found to be associated with cIMT and Kauppila score (Table 3). This association was maintained [ $\beta$  (95% CI),  $p = 0.883$  (0.357, 1.409),  $p = 0.003$ ] in a multivariate model after adjusting for traditional CV risk factors (entered as the SCORE) and time on dialysis as confounders. Finally, intermediate monocytes were correlated to PWV and vascular calcification (Table 3), although correlations were observed to be weaker than those of T-cell subsets. These associations were not observed after controlling for confounders (both  $p > 0.050$ ). Of note, no associations with other T-cell subsets (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup>) or leukocyte subsets were

**TABLE 2 |** Vascular surrogate markers in CKD and HC.

	HC (n = 14)	CKD5-PD (n = 17)	P-values
Carotid aVV, number (n vasa)	0.00 (2.00)	3.00 (7.00)	<0.050
Carotid aVV, area (% mm <sup>2</sup> /mm)	0.00 (2.16)	2.61 (8.84)	0.023
Femoral aVV, number (n vasa)	0.00 (1.25)	1.00 (3.50)	0.245
Femoral aVV, area (% mm <sup>2</sup> /mm)	0.00 (1.57)	0.89 (4.67)	0.121
PWV, m/s	7.20 (1.38)	8.70 (2.82)	0.008
cIMT, mm	0.60 (0.20)	0.75 (0.32)	0.045

Variables were summarized as median (interquartile range) and compared by Mann-Whitney U tests.

aVV, adventitial vasa vasorum; cIMT, carotid intima-media thickness; CKD5-PD, chronic kidney disease stage 5 patients undergoing peritoneal dialysis; HC, healthy control; PWV, pulse wave velocity.

observed (Supplementary Table 6), thus ruling out a potential confounding effect and emphasizing the specific role of the previous cell populations in vascular repair.

Taken together, distinct altered immune cell populations are related to different vascular surrogate outcomes in CKD. Tang were independently associated with subclinical atherosclerosis and vascular functionality even after adjusting for traditional risk factors.

## DISCUSSION

Although systemic inflammation has been described to contribute to vascular outcomes in CKD, the exact mediators are yet to be characterized. A growing body of evidence has identified novel immune cell subsets that play a role in vascular homeostasis and damage in different scenarios. CKD patients suffer a profound vascular deterioration, with different mechanisms being involved. Delineating the associations of the different immune mediators with the distinct adverse vascular scenarios is of major interest. In the present study, we addressed the analysis of some of these immune cell subsets in CKD. Our findings revealed marked alterations within T cells subsets, hallmarked by a Tang decrease and elevated CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cells, as well as within the monocyte pool, characterized by a shift toward CD16<sup>+</sup> subsets and enhanced ACE expression. These alterations exhibited distinct associations with vascular outcomes in patients under peritoneal dialysis, Tang depletion being related to a poor vascular functionality and subclinical atherosclerosis, whereas senescent CD4<sup>+</sup> T cells were associated with overt vascular wall thickening and calcification. Of note, these alterations were found in CKD5 patients undergoing peritoneal or hemodialysis compared to their control populations, thus suggesting that these phenomena may be related to the CKD stage itself. To the best of our knowledge, this is the first study not only to present a joint characterization of these subsets in CKD but also to evaluate their associations with a broad range of surrogate vascular outcomes in this condition.

One of the most remarkable findings of our work was the analysis of the Tang population. Tang are known to carry out vascular protective actions (6), and Tang depletion has been linked to CV outcomes in several immune-mediated conditions (7–11). The results herein presented expand the current knowledge in a two-fold manner. First, Tang depletion was observed beyond autoimmunity, hence strengthening the role of Tang as potential mediators of vascular homeostasis in a broad range of disorders, rather than being an immune disease-specific mechanism. Importantly, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tang subsets were found to be diminished, pointing to a strong quantitative effect on the Tang subset rather than a qualitative effect within the Tang composition. Second, decreased Tang have been linked to subclinical CV disease surrogate markers (aVV and PWV), that is, with the first signs of vascular impairments, but not with more advanced vascular traits (such as vascular calcification). In fact, in healthy individuals with zero risk for the classical atherosclerotic risk factors, left carotid aVV increased with age, the natural determinant of a higher prevalence of atheromatous lesions, in parallel with increases in cIMT within the normal range, thus supporting the accuracy and sensitivity of aVV as an earlier marker of subclinical atherosclerosis (24). Furthermore, in experimental hypercholesterolemia, increases in the density of coronary aVV precede epicardial endothelial dysfunction (26). Accordingly, type 2 diabetic patients present a higher left carotid adventitial neovascularization when compared to controls, with the highest aVV density in patients with retinopathy (angiogenesis) despite similar cIMT (27). Also, increases in aVV and in cIMT also occur in the right carotid artery of CKD stages 3–4 and dialysis patients with higher neovascularization at the earlier CKD stages (28).

Similarly, PWV is a well-established early marker of arterial stiffness (29). Since CKD patients exhibited both atherosclerosis and arteriosclerosis (30, 31), finding a mediator linked to the subclinical stage of both processes is of major relevance. Furthermore, this is supported by the strong association with TnT levels in CKD, a well-known biomarker of subclinical CV damage with predictive ability in CKD (32, 33). Therefore, a role for Tang to stratify CV risk may be considered. Interestingly, aVV expansion has been reported to be dependent on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) production (34, 35), these molecules being also linked to Tang mobilization (6). Importantly, current literature points to an association between aVV sprouting and T-cell adventitial accumulation, rather than monocytes or other subsets (36–38). These notions are in line with our findings comparing the distinct vascular surrogate markers. Taken together, these results may point to Tang as potential biomarkers of subclinical vascular impairment in CKD.

Furthermore, Tang depletion was not associated with the burden of traditional CV risk factors, and they were confirmed to be independent predictors of vascular surrogate markers. Therefore, this reinforces the idea that Tang could provide additional information as biomarkers. This is further supported by the fact that Tang depletion seemed to be a uniform observation in CKD patients, that is, linked to the disease itself and not to specific disease features. Since current algorithms



**TABLE 3 |** Associations between subclinical CV outcomes and immune cell subsets in CKD5-PD.

	Number of neovasa (carotid)	Number of neovasa (femoral)	aVV area (carotid)	aVV area (femoral)	PWW	cIMT	Kauppiia
<b>T cells</b>							
Tang (%)	<b><math>r = -0.640</math></b>	$r = -0.194$	<b><math>r = -0.813</math></b>	<b><math>r = -0.542</math></b>	<b><math>r = -0.734</math></b>	$r = -0.029$	$r = -0.359$
lymphocytes	<b><math>p = 0.006</math></b>	$p = 0.456$	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>	<b><math>p = 0.025</math></b>	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>	$p = 0.921$	$p = 0.060$
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> (%)	$r = 0.333$	$r = 0.088$	$r = 0.395$	$r = 0.395$	$r = 0.435$	<b><math>r = 0.566</math></b>	<b><math>r = 0.581</math></b>
lymphocytes	$p = 0.192$	$p = 0.737$	$p = 0.117$	$p = 0.117$	$p = 0.093$	<b><math>p = 0.035</math></b>	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>
<b>Monocytes</b>							
Non-classical (%)	$r = 0.286$	$r = -0.325$	$r = 0.505$	$r = 0.069$	$r = 0.271$	$r = -0.237$	$r = 0.217$
monocytes	$p = 0.265$	$p = 0.203$	$p = 0.039$	$p = 0.794$	$p = 0.310$	$p = 0.415$	$p = 0.258$
ACE <sup>+</sup>	$r = -0.123$	$r = -0.085$	$r = -0.114$	$r = -0.040$	$r = 0.055$	$r = 0.059$	$r = -0.214$
Non-classical (%) non-classical)	$p = 0.637$	$p = 0.744$	$p = 0.662$	$p = 0.879$	$p = 0.841$	$p = 0.842$	$p = 0.266$
Intermediate (%) monocytes)	$r = 0.294$	$r = 0.167$	$r = 0.472$	$r = 0.378$	<b><math>r = 0.576</math></b>	$r = 0.171$	<b><math>r = 0.388</math></b>
	$p = 0.252$	$p = 0.522$	$p = 0.086$	$p = 0.135$	<b><math>p = 0.020</math></b>	$p = 0.558$	<b><math>p = 0.037</math></b>
ACE <sup>+</sup> intermediate (%) intermediate)	$r = 0.158$	$r = -0.166$	$r = 0.406$	$r = 0.159$	$r = 0.175$	$r = -0.183$	$r = 0.017$
	$p = 0.545$	$p = 0.106$	$p = 0.106$	$p = 0.542$	$p = 0.516$	$p = 0.532$	$p = 0.930$
Classical (%) monocytes)	$r = -0.299$	$r = 0.065$	<b><math>r = -0.559</math></b>	$r = -0.345$	$r = -0.473$	$r = 0.088$	$r = -0.279$
	$p = 0.243$	$p = 0.804$	<b><math>p = 0.043</math></b>	$p = 0.174$	$p = 0.064$	$p = 0.765$	$p = 0.142$
ACE <sup>+</sup> classical (%) classical)	$r = 0.257$	$r = -0.013$	$r = 0.262$	$r = 0.148$	$r = 0.251$	$r = -0.083$	$r = 0.326$
	$p = 0.319$	$p = 0.961$	$p = 0.310$	$p = 0.572$	$p = 0.349$	$p = 0.777$	$p = 0.090$

Correlations were assessed by Spearman's rank tests. Correlations reaching statistical significance were highlighted in bold.

ACE, angiotensin-converting enzyme; aVV, adventitial vasa vasorum; cIMT, carotid intima-media thickness; CKD5-PD, chronic kidney disease stage 5 patients undergoing peritoneal dialysis; CV, cardiovascular; PWW, pulse wave velocity; Tang, angiogenic T cells.

**TABLE 4 |** Tang as predictors of subclinical CV outcomes.

	Number of neovasa (carotid)	Number of neovasa (femoral)	aVV area (carotid)	aVV area (femoral)	PWW
<b>Univariate</b>					
Tang	-0.505 (-2.281, -0.485) $p = 0.004$	-0.293 (-1.085, 0.116) $p = 0.110$	-0.523 (-3.819, -0.862) $p = 0.003$	-0.466 (-2.936, -0.477) $p = 0.008$	-0.663 (-1.40, -0.682) $p < 0.001$
<b>Multivariate</b>					
Tang	-0.662 (-6.309, -0.582) $p = 0.022$	0.161 (-1.290, 2.263) $p = 0.566$	-2.313 (-10.870, -0.409) $p = 0.036$	-0.393 (-6.963, -0.010) $p = 0.048$	-0.437 (-3.390, -0.141) $p = 0.010$
SCORE	-0.270 (-2.055, 0.702) $p = 0.310$	0.540 (-0.071, 1.640) $p = 0.069$	0.025 (-2.404, 2.633) $p = 0.924$	0.411 (-0.258, 3.423) $p = 0.086$	0.368 (-0.241, 1.545) $p = 0.139$

The associations between Tang frequency and subclinical CV outcomes were analyzed by linear regression in univariate or multivariate models adjusted for the burden of traditional CV risk factors (entered as the SCORE). The unstandardized regression coefficient (B) and (95% CI) with the corresponding p-values were computed.

aVV, adventitial vasa vasorum; CV, cardiovascular; PWW, pulse wave velocity; Tang, angiogenic T cells.

solely based on traditional risk factors fail to achieve an appropriate risk stratification in CKD (39–41), these findings may support the use of Tang as an additional instrument in the clinical setting. Larger studies to explore the ability of Tang to reclassify CKD patients to appropriate risk categories are warranted.

Additionally, the analysis of T-cell subsets revealed that CKD patients were hallmarked by a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> expansion. This subset was strongly correlated with the extent of vascular calcification, whereas no associations with subclinical features were noted. Interestingly, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> are terminally differentiated cells that result from a cumulative T-cell activation, leading to T cells exhaustion (42, 43). As a consequence, they are originated after a long exposure to pro-senescent

stimuli. This notion may underlie their association with vascular calcification, as it is the result of an evolutive, cumulative process, thus supporting their association with a harder endpoint than subclinical vascular outcomes, as observed for Tang.

Taken together, these lines of evidence highlight that T cells may act as a double-edged sword for vascular outcomes in inflammatory conditions. Despite being highly heterogeneous, T cells have been largely considered to prompt vascular impair or endothelial damage progression. The observation that early T-cell accumulation precedes vascular lesions further supported this idea. However, the findings from our group (8, 9) and others (7, 10, 44) support the existence of T cell-mediated protective mechanisms for vascular homeostasis. Disruptions of these mechanisms or an altered balance with the deleterious effects

mediated by other T-cell populations may explain the occurrence of vascular events (45). Then, the role of T cells in this scenario may be more complex than initially conceived. Consequently, the protective effects of some T-cell subsets may be taken into account, especially when the use of immunomodulating agents is considered.

Of note, despite our results showing profound changes in monocyte subsets in CKD patients, only intermediate monocytes were related to vascular surrogate markers, such correlations being weaker than those retrieved for T cells and being interfered by potential confounders. These results may sound counterintuitive, since monocytes are pivotal for the development of some vascular events. Moreover, the lack of association with clinical features leads us to think that monocyte alterations may be related to the immunopathogenesis of the CKD itself, rather than to vascular outcomes. Interestingly, the notion that a Th1 predominance has been documented in CKD (46, 47) aligns with this point. The fact that the disturbances of the circulating monocytes seemed to be homogeneous across all patients independently of clinical features (even between dialysis modalities) prompted us to hypothesize that these alterations may appear earlier in the continuum of CKD stages, thus being a common trait of its pathogenesis. This may explain why these changes were so consistent across individuals. Importantly, animal models have also confirmed an early shift in monocyte subsets during the initial steps leading to CKD (48). Therefore, it may be conceivable that monocytes become activated in previous stages, thus eliciting an inflammatory response by activating adaptive responses at a later stage. Emerging evidence supports this “progressive” model, with an initial involvement of innate pathways that fuel an aberrant activation of adaptive responses in the final phases of CKD. These lines of evidence may account for the lack of associations between monocyte disturbances and vascular outcomes in CKD stage 5.

In conclusion, novel immune cell subsets are related to vascular surrogate markers in CKD patients. T cells emerge as double-edged swords in the associations between vascular outcomes and CKD, with Tang depletion being associated with poor vascular functionality and subclinical atherosclerosis, whereas CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> were related to calcification. On the contrary, profound quantitative and qualitative changes were found within the monocyte compartment, but only intermediate monocytes were slightly related to vascular outcomes in univariate analyses. Our proof-of-concept study suggested for the first time a potential role for Tang in CKD, hence paving the ground for functional studies to unveil the mechanisms underlying Tang depletion in CKD. However, this study comes with some limitations that should be remarked, including reduced sample size and cross-sectional design. Our patient population was homogeneous and reflected a real-world CKD population undergoing dialysis. However, patients with diabetes were excluded due to the autoimmune background, which might have a differential effect on these populations, independently of that of the CKD. Further studies with appropriate control populations are needed to evaluate whether the alterations herein reported could be observed in diabetic CKD patients. The inclusion of an independent validation cohort strengthens the

consistency of our findings. It must be noted that our study found validation in the independent comparisons of each CKD5 cohort with its respective control group, but no comparisons were made between dialysis modalities, as this felt beyond the study aims. Having found a similar picture in these analysis, our findings could be considered to be a general effect of the CKD stage itself, although a potential effect of the dialysis modality should not be ruled out. However, whether these alterations may be extended to other CKD stages needs to be confirmed in future studies. Similarly, whether dialysis modality may influence these alterations cannot be addressed in the present study. Importantly, the findings related to the vascular outcomes were only analyzed in patients undergoing PD, so it remains unclear whether these results can be transferred to patients under hemodialysis. Furthermore, larger, long-term prospective studies are warranted to evaluate whether these subsets could be considered predictive biomarkers that could assist in the clinical setting.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Ética Regional de Investigación Clínica. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JR-C and NC-L performed most of the experimental procedures and carried out the statistical analyses. CU and BM-C carried out some experimental procedures. CR-S, ES-A, and MR-G were in charge of patients' recruitment and clinical data collection. JR-C, NC-L, MN-D, MA, BF-M, JC-A, AS, and AD contributed to the data analysis interpretation and discussion of the results. JR-C, NC-L, and AS drafted the manuscript. AD conceived the study, designed the protocols, and edited the manuscript. All authors read the manuscript, revised it for intellectual content, approved the final version, and agreed to be accountable for all aspects of the work.

## FUNDING

This work was supported by European Union FEDER funds, Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/01452, PI16/00113, PI17/02181, PI19/00532) from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028 and IDI/2018/000152) from Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Red de Investigación Renal-RedInREN (RETIC REDINREN

RD16/0009) from ISCIII, and by Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas (SAFIM). JR-C is supported by postdoctoral contracts from the Juan de la Cierva (IJCI-2017-32070, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) and Sara Borrell programs (CD19/00120, from ISCIII). NC-L is supported by GRUPIN14-028 and IDI/2018/000152, and AD is supported by Asociación Investigación de Fisiología Aplicada and ISPA. BM-C was supported by ISCIII-ISPA (PI17/00384) and by

a graduate fellowship from the Gobierno del Principado de Asturias (Severo Ochoa program BP19-057).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.618286/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Lam CWK. 2. Inflammation, cytokines chemokines in chronic kidney disease. *EJIFCC*. (2009) 20:12–20.
- Silverstein DM. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol*. (2009) 24:1445–52. doi: 10.1007/s00467-008-1046-0
- Libby P, Loscalzo J, Ridker PM, Farkouh ME, Hsue PY, Fuster V, et al. Inflammation, immunity, and infection in atherothrombosis: JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol*. (2018) 72:2071–81. doi: 10.1016/j.jacc.2018.08.1043
- Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity*. (2017) 47:621–34. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.008
- Padgett LE, Araujo DJ, Hedrick CC, Oling CE. Functional crosstalk between T cells and monocytes in cancer and atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. (2020) 108:297–308. doi: 10.1002/jlb.1MIR0420-076R
- Hur J, Yang H-M, Yoon C-H, Lee C-S, Park K-W, Kim J-H, et al. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies. *Circulation*. (2007) 116:1671–82. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.694778
- Cavazzana I, Piantoni S, Sciatti E, Fredi M, Taraborelli M, Bonadei I, et al. Relationship between endothelial dysfunction, videocapillaroscopy and circulating CD3<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> lymphocytes in systemic lupus erythematosus without cardiovascular risk factors. *Lupus*. (2019) 28:210–6. doi: 10.1177/0961203318821161
- López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Caminal-Montero L, Suarez A. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Leukoc Biol*. (2016) 99:405–12. doi: 10.1189/jlb.5HI0215-042R
- Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Ballina-García FJ, Suárez A. Angiogenic T cells are decreased in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. (2014) 287:e244. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.749
- Rouhl RPW, Mertens AECs, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux JGMC, Debrus-Palmans LL, Henskens LHG, et al. Angiogenic T-cells and putative endothelial progenitor cells in hypertension-related cerebral small vessel disease. *Stroke*. (2012) 43:256–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.632208
- Manetti M, Pratesi S, Romano E, Bellando-Randone S, Rosa I, Guiducci S, et al. Angiogenic T cell expansion correlates with severity of peripheral vascular damage in systemic sclerosis. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0183102. doi: 10.1371/journal.pone.0183102
- Dumitriu IE. The life (and death) of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>(null)</sup> T cells in inflammatory diseases. *Immunology*. (2015) 146:185–93. doi: 10.1111/imm.12506
- Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*. (2002) 105:570–5. doi: 10.1161/hc0502.103348
- Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol*. (2007) 179:6514–23. doi: 10.4049/jimmunol.179.10.6514
- Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity*. (2018) 49:595–613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005
- Sprangers S, de Vries TJ, Everts V. Monocyte heterogeneity: consequences for monocyte-derived immune cells. *J Immunol Res*. (2016) 2016:1–10. doi: 10.1155/2016/1475435
- Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Trans Med*. (2015) 4:e5. doi: 10.1186/s40169-014-0040-3
- Ryu JH, Vuk-Pavlović Z, Rohrbach MS. Monocyte heterogeneity in angiotensin-converting enzyme induction mediated by autologous T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. (1992) 88:288–94. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb03075.x
- Cao D-Y, Saito S, Veiras LC, Okwan-Duodu D, Bernstein EA, Giani JF, et al. Role of angiotensin-converting enzyme in myeloid cell immune responses. *Cell Mol Biol Lett*. (2020) 25:31. doi: 10.1186/s11658-020-00225-w
- Rogacev KS, Heine GH. Human monocyte heterogeneity—a nephrological perspective. *Nephrol Ther*. (2010) 6:219–25. doi: 10.1016/j.nephro.2010.01.008
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. (2016) 37:2315–81.
- Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Ballina-García FJ, Suárez A. TNF $\alpha$  polymorphism as marker of immunosenescence for rheumatoid arthritis patients. *Exp Gerontol*. (2015) 61:123–9. doi: 10.1016/j.exger.2014.12.009
- Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amareno P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006). *Cerebrovasc Dis*. (2007) 23:75–80. doi: 10.1159/000097034
- Arcidiacono MV, Rubinat E, Borrás M, Betriu A, Trujillano J, Vidal T, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors. *Cardiovasc Ultrasound*. (2015) 13:20. doi: 10.1186/s12947-015-0014-7
- Nakagawa S, Cuthill IC. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev*. (2007) 82:591–605. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00027.x
- Herrmann J. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*. (2001) 51:762–6. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00347-9
- Arcidiacono MV, Traveset A, Rubinat E, Ortega E, Betriu A, Hernández M, et al. Microangiopathy of large artery wall: a neglected complication of diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. (2013) 228:142–7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.011
- Arcidiacono MV, Martínez-Alonso M, Belart M, Vilar A, Martín M, Craver L, et al. High levels of hemoglobin promote carotid adventitial vasa vasorum neoangiogenesis in chronic kidney disease. *Mediators Inflamm*. (2017) 2017:1–11. doi: 10.1155/2017/3795142
- Safar ME, London GM. Therapeutic studies and arterial stiffness in hypertension. *J Hypertens*. (2000) 18:1527–35. doi: 10.1097/00004872-200018110-00001
- Drüeke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol*. (2010) 6:723–35. doi: 10.1038/nrneph.2010.143
- London GM, Drüeke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. (1997) 51:1678–95. doi: 10.1038/ki.1997.233
- Roos A, Bandstein N, Lundbäck M, Hammarsten O, Ljung R, Holzmann MJ. Stable high-sensitivity cardiac troponin T levels and outcomes in patients with chest pain. *J Am Coll Cardiol*. (2017) 70:2226–36. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.064
- Kanderian AS, Francis GS. Cardiac troponins and chronic kidney disease. *Kidney Int*. (2006) 69:1112–4. doi: 10.1038/sj.ki.5000174
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension*. (2002) 39:46–50. doi: 10.1161/hy1201.097200

35. Mulligan-Keheo MJ, Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*. (2014) 129:2557–66. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189
36. Moos MPW, John N, Gräbner R, Noßmann S, Günther B, Vollandt R, et al. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2005) 25:2386–91. doi: 10.1161/01.ATV.0000187470.31662.f6
37. Schwartz CJ, Mitchell JR. Cellular infiltration of the human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. *Circulation*. (1962) 26:73–8. doi: 10.1161/01.CIR.26.1.73
38. Watanabe M, Sangawa A, Sasaki Y, Yamashita M, Tanaka-Shintani M, Shintaku M, et al. Distribution of inflammatory cells in adventitia changed with advancing atherosclerosis of human coronary artery. *J Atheroscler Thromb*. (2007) 14:325–31. doi: 10.5551/jat.E489
39. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol*. (2007) 50:217–24. doi: 10.1016/j.jacc.2007.03.037
40. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol*. (2005) 16:529–38. doi: 10.1681/ASN.2004080656
41. Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, et al. Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease. *JAMA*. (2005) 293:1737. doi: 10.1001/jama.293.14.1737
42. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. (2015) 15:486–99. doi: 10.1038/nri3862
43. Maly K, Schirmer M. The story of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells revisited: solved or still ongoing? *J Immunol Res*. (2015) 2015:1–11. doi: 10.1155/2015/348746
44. Alunno A, Ibba-Manneschi L, Bistoni O, Cipriani S, Topini F, Gerli R, et al. Angiogenic T cells in primary Sjögren's syndrome: a double-edged sword? *Clin Exp Rheumatol*. (2019) 37 (Suppl 1):36–41.
45. Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis: Fig. 1. *J Lipid Res*. (2009) 50:S364–9. doi: 10.1194/jlr.R800092-JLR200
46. Azadegan-Dehkordi F, Bagheri N, Shirzad H, Rafeian-Kopaei M. The role of Th1 and Th17 cells in glomerulonephritis. *J Nephropathol*. (2015) 4:32–7. doi: 10.12860/jnp.2015.07
47. Kitching AR, Katerelos M, Mudge SJ, Tipping PG, Power DA, Holdsworth SR. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol*. (2002) 128:36–43. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01793.x
48. Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley SM. The role of the immune system in kidney disease. *Clin Exp Immunol*. (2018) 192:142–50. doi: 10.1111/cei.13119

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Rodríguez-Carrió, Carrillo-López, Ulloa, Martín-Carro, Rodríguez-Suárez, Naves-Díaz, Sánchez-Álvarez, Rodríguez-García, Arcidiacono, Fernández-Mariño, Cannata-Andía, Suárez and Dusso. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

OPEN

# A subset of low density granulocytes is associated with vascular calcification in chronic kidney disease patients

Javier Rodríguez-Carrio<sup>1,2</sup>, Natalia Carrillo-López<sup>2,3</sup>, Catalina Ulloa<sup>4</sup>, Mariana Seijo<sup>2,5</sup>, Minerva Rodríguez-García<sup>3,4</sup>, Carmen Rodríguez-Suárez<sup>4</sup>, Carmen Díaz-Corte<sup>3,4</sup>, Jorge B. Cannata-Andía<sup>2,3,6</sup>, Ana Suárez<sup>1</sup> & Adriana S. Dusso<sup>2,3</sup>

Inflammation is central to chronic kidney disease (CKD) pathogenesis and vascular outcomes, but the exact players remain unidentified. Since low density granulocytes (LDGs) are emerging mediators in inflammatory conditions, we aimed to evaluate whether LDGs may be altered in CKD and related to clinical outcomes as biomarkers. To this end, LDGs subsets were measured in peripheral blood by flow cytometry and confocal microscopy in 33 CKD patients undergoing peritoneal dialysis and 15 healthy controls (HC). Analyses were replicated in an additional cohort. DEF3 (marker of early granulopoiesis) gene expression on PBMCs was quantified by qPCR. Total CD15<sup>+</sup> LDGs and both CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup> subsets were expanded in CKD. The relative frequency of the CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup> subpopulation was higher among the CD15<sup>+</sup> pool in CKD. This alteration was stable over-time. The increased CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> paralleled Kauppila scores and DEF3 expression, whereas no association was found with CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>. Both subsets differed in their CD11b, CD10, CD35, CD31, CD62L, IFNAR1 and CD68 expression, FSC/SSC features and nuclear morphology, pointing to different origins and maturation status. In conclusion, LDGs were expanded in CKD showing a skewed distribution towards a CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> enrichment, in association with vascular calcification. DEF3 expression in PBMC can be a marker of LDG expansion.

Chronic Kidney Disease (CKD) is a disorder characterized by premature and exacerbated multi-organic aging<sup>1</sup>. As a consequence, CKD patients develop a number of senescence-related clinical outcomes, such as atherosclerosis, osteoporosis, soft tissue calcifications, sarcopenia, frailty, infections, oxidative stress, etc. Importantly, vascular calcification (VC) in CKD patients is a main determinant of their increased risk of cardiovascular (CV) death compared to the general population<sup>2-4</sup>.

Chronic and dysregulated inflammation plays a pivotal role in CKD progression, although the exact inflammatory mediators remain unclear at present. Inflammatory pathways are key factors for VC<sup>5,6</sup>, an important hallmark of CKD. Of note, inflammation is considered a major part of the aging process and recent studies have brought to light its involvement in CV outcomes<sup>7,8</sup>. Most vascular risks in CKD seem to be attributed to medial calcification rather than atherosclerosis occurrence (reviewed in<sup>9</sup>). However, immune circuits associated with VC in CKD are poorly understood. Unravelling immune mediators that underlie VC in CKD is of utmost relevance both from the basic perspective as well as for the clinical translation of such findings. In this scenario, myeloid

<sup>1</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain. <sup>2</sup>Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain. <sup>3</sup>Red de Investigación Renal (REDinREN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>4</sup>Division of Nephrology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>5</sup>Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Oseas, Hospital de Clínicas, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM) CONICET- UBA, Buenos Aires, Argentina. <sup>6</sup>Department of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain. Javier Rodríguez-Carrio and Natalia Carrillo-López contributed equally. Jorge B. Cannata-Andía, Ana Suárez and Adriana S. Dusso jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S. (email: [anasua@uniovi.es](mailto:anasua@uniovi.es))

Received: 17 April 2019

Accepted: 24 August 2019

Published online: 13 September 2019

	HC (n = 15)	CKD5-PD patients (n = 33)	p-value
Age, years, mean (range)	48.00 (22.00–68)	55.00 (21.00–77.00)	0.070
Gender, f/m	10/5	13/20	0.080
<b>Clinical features</b>			
Albumin, mg/dl	44.17 ± 1.95	34.37 ± 4.35	<0.001
Urea, mg/dl	33.46 ± 8.08	132.66 ± 43.76	<0.001
Creatinine, mg/dl	0.78 ± 0.17	7.81 ± 2.72	<0.001
Plasma Ca, mmol/l	2.34 ± 0.07	2.17 ± 0.16	<0.001
Plasma phosphate, mmol/l	1.04 ± 0.18	1.64 ± 0.42	<0.001
PTH, pg/ml	49.60 ± 15.52	371.03 ± 198.61	<0.001
25(OH)-vitamin D, ng/ml	32.93 ± 15.38	10.10 ± 6.89	<0.001
CRP, mg/dl		0.64 ± 0.86	
Vascular calcifications, n(%)		18 (54.5)	
Kaupilla score		7.88 ± 8.98	
Time on dialysis, months		15.00 (16.00)	
<b>Treatments, n(%)</b>			
Paricalcitol		15 (45.4)	
Phosphate binders		18 (54.5)	
Statins		21 (63.6)	
Metilprednisone		9 (27.22)	
Epo		24 (72.7)	
<b>Serum cytokines, pg/ml</b>			
IL-2	1.30 (1.91)	1.60 (0.70)	0.342
IL-6	4.73 (4.58)	6.77 (10.07)	0.154
IL-10	1.49 (0.80)	1.77 (1.05)	0.101
IFN $\gamma$	8.32 (6.80)	12.82 (6.57)	0.183
TNF $\alpha$	8.38 (7.66)	14.01 (6.38)	0.211

**Table 1.** Demographical, clinical and immunological characteristics of individuals recruited for this study.

populations have been partially neglected in CKD and VC. Importantly, novel aspects of granulocyte biology have emerged in recent years.

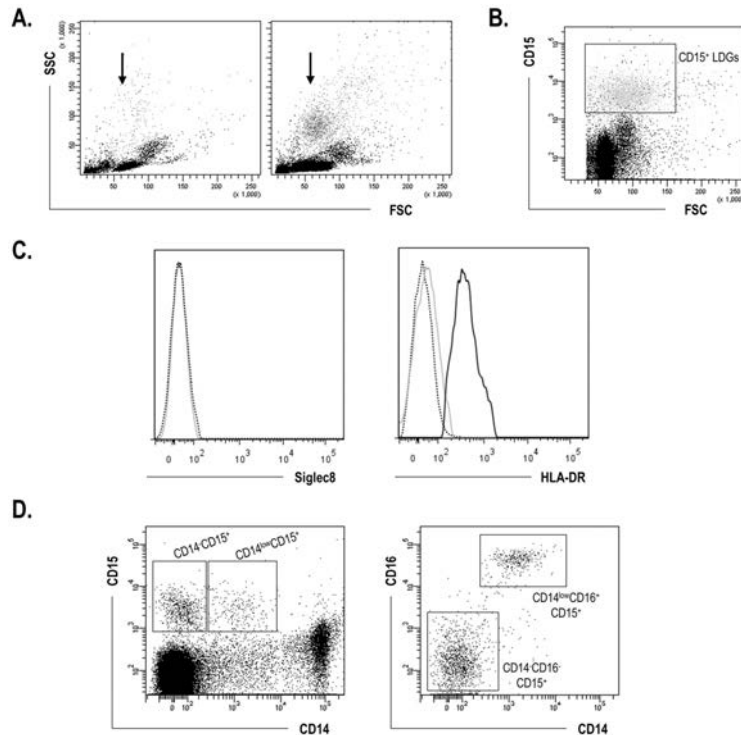
A major novel breakthrough in the field was the discovery of the enormous heterogeneity among granulocytes<sup>10,11</sup>. Additionally, granulocytes are now recognized as immune cells that can perform complex activities, orchestrate the immune response via several mediators and cytokines and establish a complex crosstalk with components of the innate and adaptive response<sup>12,13</sup>. In this scenario, a novel subset of granulocytes, the low density granulocytes (LDGs) are emerging as relevant players in a wide range of immune-based conditions<sup>14–17</sup>. LDGs are defined by their ability to sediment in the PBMC fractions upon gradient centrifugation of whole blood and to exhibit granulocyte markers. Nevertheless, a precise phenotypic definition of LDGs is lacking. LDGs have received a notable attention since their frequency has been related to disease severity and clinical outcomes in a number of conditions (reviewed in<sup>17</sup>). Among these conditions, systemic lupus erythematosus has been hallmarked by a noticeable LDG expansion<sup>17,18</sup>. Interestingly, a recent study has found an upregulation of a granulocyte-related gene, the defending 3 (DEF3A) in PBMC isolates from patients<sup>19</sup>. Although these lines of evidence may suggest that DEF3A could be a promising candidate of LDGs expansion, this potential connection has not been studied.

However, whether LDGs may be involved in CKD outcomes is yet to be clarified. Therefore, in the present study we aimed (i) to evaluate LDGs frequency in CKD patients, (ii) to analyze the associations between LDGs and clinical features in this condition as well as their role as a biomarker and (iii) to assess the LDGs phenotype in CKD.

## Results

**LDG expansion in CKD patients.** The presence of LDGs was evaluated in a group of 33 CKD5-PD patients and 15 HC (Table 1). The LDG population clearly segregated from the monocytes and lymphocytes subsets within the PBMC fraction by its side scatter signal (Fig. 1A). LDGs also clearly differed from monocytes by the expression of HLA-DR, their FCS/SSC signal as well as by the granulocyte marker CD15 (Fig. 1B,C). Additionally, CD15<sup>+</sup> cells were negative for Siglec8 expression (Fig. 1C), thus ruling out the possibility of these cells to be eosinophils. Interestingly, two different subsets were observed when the CD14 expression was analyzed, in a similar way than that of CD16. As a consequence, two subpopulations could be distinguished within the CD15<sup>+</sup> LDG population: CD14<sup>−</sup>CD16<sup>−</sup>CD15<sup>+</sup> and CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> (Fig. 1D).

CKD5-PD patients exhibited a higher frequency of LDGs within the mononuclear fraction than HC, and higher levels were observed for both CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> and CD14<sup>−</sup>CD16<sup>−</sup>CD15<sup>+</sup> subsets (Fig. 2A). None of the LDG subsets were related to age, time on dialysis, medications or circulating cytokines (all  $p > 0.050$ ).

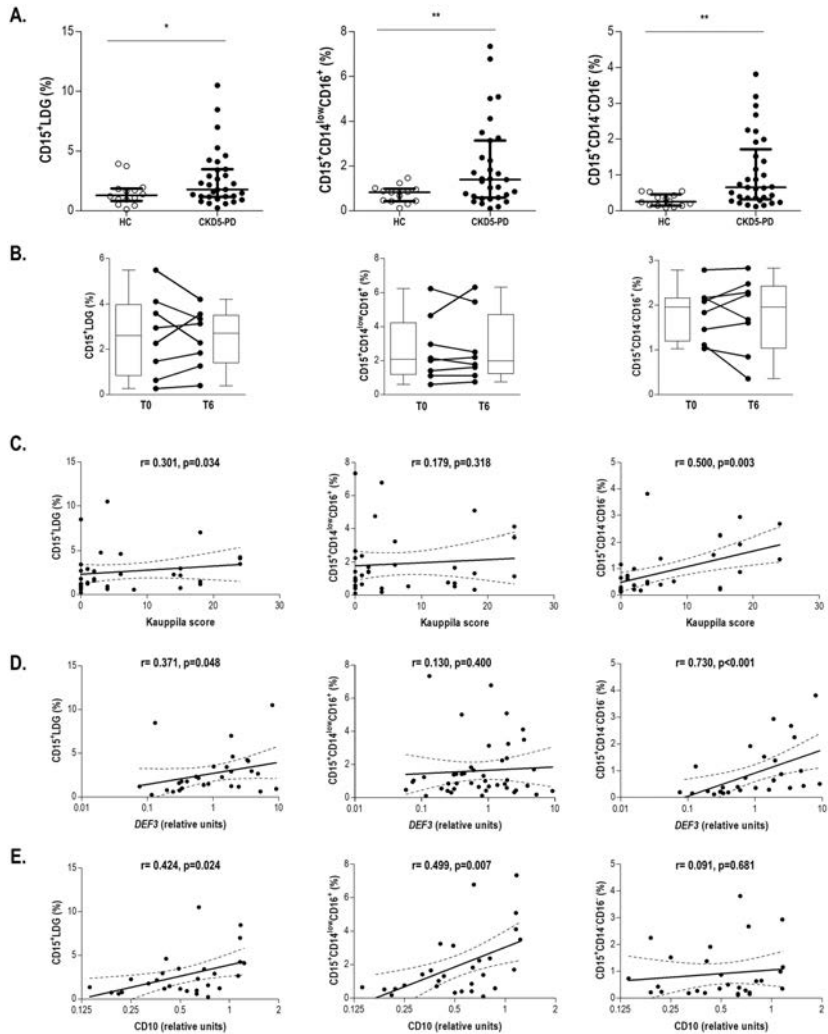


**Figure 1.** Gating strategy for LDG identification and quantification. (A) LDG (arrows) were identified by their FSC/SSC properties in PBMC fractions. Representative dot plots from a HC (left) and a CKD5-PD patient (right) are shown. (B) LDGs were first identified by their CD15 expression. (C) Histograms showing the analyses of the expression of Siglec8 (isotype control: dotted black line, CD15<sup>+</sup> population: gray line) and HLA-DR (isotype control: dotted black line, CD15<sup>+</sup> population: gray line, monocytes: black line). (D) Two subsets of LDGs were distinguished within the total CD15<sup>+</sup> population based on their CD14 (left dot-plot) and CD16 (right dot-plot) expression: CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> and CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>.

Moreover, no differences in circulating neutrophils were observed between patients and controls and none of the LDG subsets were correlated to neutrophil absolute counts (all  $p > 0.050$ ). Interestingly, within the CD15<sup>+</sup> total population, the relative frequency of the CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup> subset was increased in patients compared to HC ( $24.59 \pm 19.50$  vs.  $12.21 \pm 10.12$ ,  $p = 0.012$ ), thus pointing to a skewed profile of the LDG pool in CKD. Additionally, a subgroup of patients ( $n = 8$ ) was re-sampled after 6 months, and LDGs frequency and their relative distribution in the LDG pool were maintained over this period (Fig. 2B).

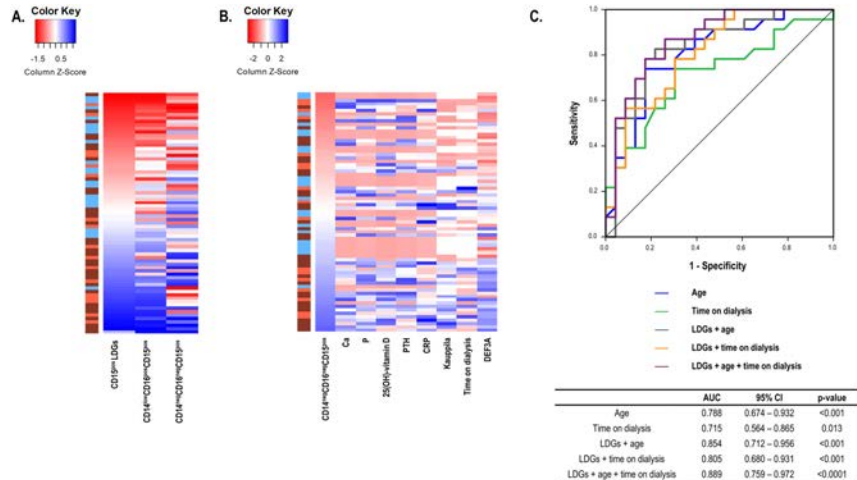
Interestingly, CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> expansion was restricted to patients with vascular calcifications (VC, Kauppila scores  $> 5$ ) compared to VC-free patients ( $1.29 \pm 1.09$  vs.  $0.41 \pm 0.33\%$ ,  $p = 0.010$ ) and HC ( $0.34 \pm 0.26\%$ ,  $p = 0.009$ ), whereas this effect was not observed in the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> subpopulation ( $p = 0.245$  and  $p = 0.145$ , respectively). In fact, the frequency of CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> LDGs was strongly correlated to Kauppila scores in the whole patient group (Fig. 2C). Importantly, whereas the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> frequency strongly mirrored that of total CD15<sup>+</sup> LDGs, this was not the case for CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>, which exhibited a different distribution (Fig. 3A,B).

Furthermore, to gain insight into the LDG expansion, the gene expression of DEF3 (a granulocyte-restricted gene among blood cells) was measured in PBMC fractions. CKD5-PD patients exhibited a higher DEF3 expression compared to HC, which did not reach statistical significance ( $1.02(2.56)$  vs.  $0.55(0.76)$  relative units,  $p = 0.128$ ). Surprisingly, DEF3 expression was strongly correlated with the CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> subset but not with the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> subpopulation (Fig. 2D). DEF3A expression was in turn associated with the Kauppila score ( $r = 0.501$ ,  $p = 0.006$ ).



**Figure 2.** LDG subsets in CKD5-PD patients and their association with clinical features. (A) The frequencies of total CD15<sup>+</sup> LDGs as well as CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>CD16</sup> subsets in PBMC fractions were compared between HC (open circles) and CKD5-PD patients (black circles). Central bars represent the median values whereas whiskers represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles. Differences between groups were assessed by Mann-Whitney U tests (\*p < 0.050, \*\*p < 0.010, \*\*\*p < 0.001). (B) Analyses of LDG subsets in paired samples (n = 8) at baseline (t = 0) and after 6 months (t = 6). LDG frequencies are expressed as bars and scatter plots for each time point. Differences were assessed by Wilcoxon test for paired samples. Association of the LDG subsets with Kauppila scores (C), DEF3 (D) and CD10 (E) gene expression in PBMC fractions. Correlations were assessed by Spearman's rank test.





**Figure 3.** LDG subsets as biomarkers. (A,B) Associations of the frequency of the CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> population with other LDG subsets and clinical features. Variables were plotted in heatmaps (A, ranked by CD15<sup>+</sup> LDG frequency; B, ranked by CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> frequency). Each row of the heatmaps represents a study subject. Colors in the vertical left bar denoted HC (blue), CKD5-PD patients (brown) or CKD5-HD patients (orange). Tiles are colored based on variable levels, red and blue indicating low or high levels respectively, as indicated in the legend (top left). (C) ROC analyses of the role of CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> as a biomarker to predict VC. ROC curves were plotted and AUC, 95% CI and p-values were computed (table).

Similarly, the gene expression of CD10 (a well-known marker of mature neutrophils) was analyzed in PBMC fractions. CD10 expression paralleled total CD15<sup>+</sup> LDGs levels (Fig. 2E). However, this correlation was observed to be driven by the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> subset, whereas no association was found with their CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> counterparts.

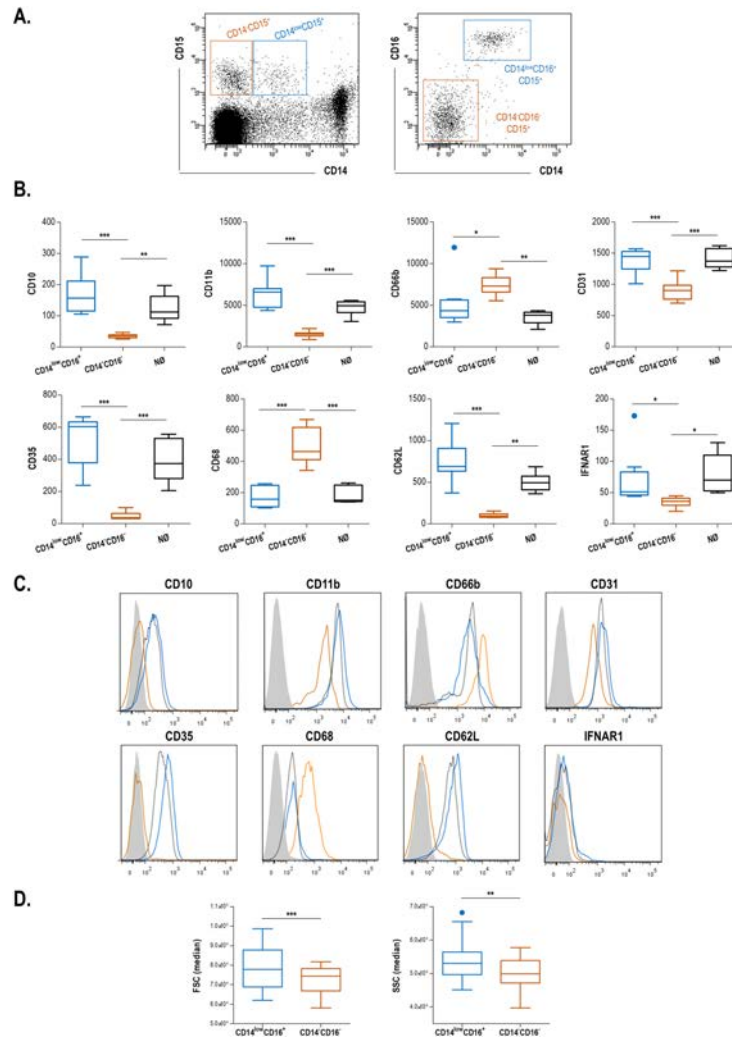
Finally, a replication cohort consisting on 16 CKD patients undergoing hemodialysis (CKD-5HD) and 6 age- and gender-matched controls were recruited to validate our findings. The independent analysis of this cohort confirmed all of our previous results (Supplementary Fig. 1). No differences were observed between dialysis modalities.

The ability of CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> LDGs as a biomarker to identify VC was tested by ROC curves. Interestingly, an AUC [95% CI] of 0.769 [0.613, 0.924] ( $p = 0.006$ ) was obtained for the CKD5-PD cohort. This was confirmed in the CKD5-HD group (0.803 [0.622, 0.984],  $p = 0.014$ ). A pooled analysis confirmed a good discriminative power of CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> LDGs as a biomarker in CKD (Fig. 3C). Moreover, not only it was identified as an independent predictor but also the frequency of CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> LDGs improved the ability of age and time on dialysis to predict VC when included in combined indices (Fig. 3C). Finally, multiple logistic regression analysis confirmed that CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> LDGs were independent predictors of VC (OR [95% CI],  $p = 1.112 [1.012 - 9.175]$ ,  $p = 0.020$ ) after adjusting for age, gender and time on dialysis as confounders.

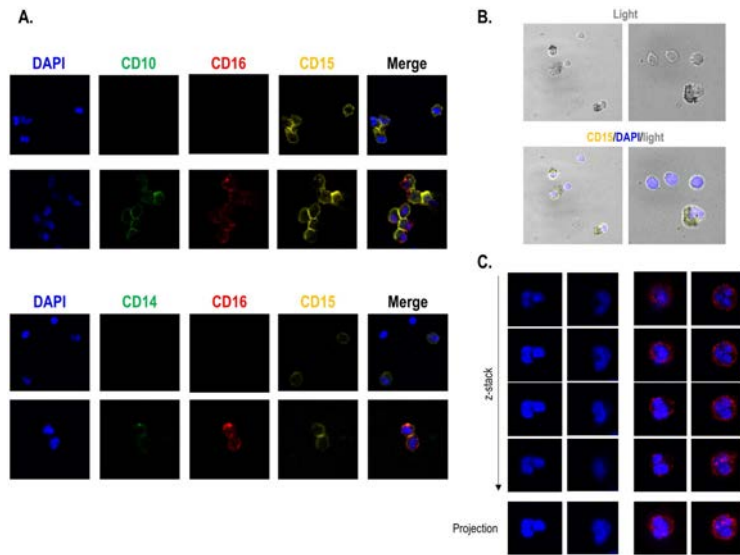
Taken together, these results suggest that CKD is hallmarked by a systemic LDG expansion that is stable over time. LDGs in CKD patients are a heterogeneous population, the CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> subset being associated with calcification, thus supporting its role as an independent biomarker. DEF3 expression in the PBMC fraction, which parallels CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> levels, could be considered as a surrogate marker of CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> levels and thus, a biomarker of VC.

**Resolving the LDG heterogeneity in CKD.** In order to gain insight into the heterogeneity observed within the LDG pool in CKD, an extensive immune-phenotyping of these populations and of mature neutrophils was carried out.

Interestingly, the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> subset exhibited an increased expression of mature and activated granulocyte markers (CD11b, CD10, CD35, CD31, CD62L and IFNAR1), whereas the CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> subpopulation exhibited a higher expression of CD66b and CD68, the latter being a marker of intermediate and early stages of neutrophil differentiation (Fig. 4A,B). As a consequence, the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> subset exhibited a profile that resemble that of mature neutrophils (Fig. 4C), whereas a distinct one was observed for their CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> counterparts. Additionally, these two subsets also differed in their size (FSC) and granularity (SSC) features (Fig. 4D).



**Figure 4.** Phenotype of LDG subsets in CKD. (A) CD14<sup>hi</sup>CD6<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> (orange) and CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> (blue) subsets were selected based on the previous gating strategy. (B) The expression of several granulocyte markers was analyzed by flow cytometry and compared among LDG subsets and mature neutrophils (black). Expression levels are shown as box plots, where the boxes represent the 25th and 75th percentiles, the lines within the boxes representing the median and the lines outside the boxes represent the minimum and maximum values. Differences were assessed by Kruskal-Wallis tests with Dunn-Bonferroni correction for multiple comparisons' test. (C) Representative histograms for granulocyte markers (gray: isotype control, orange: CD14<sup>hi</sup>CD6<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> subset, blue: CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> subset and black: mature neutrophils). (D) Differences in FSC and SSC parameters between both LDG subsets. Expression levels are shown as box plots, where the boxes represent the 25th and 75th percentiles, the lines within the boxes representing the median and the lines outside the boxes represent the minimum and maximum values. Differences were assessed by Mann-Whitney U tests or paired tests (Wilcoxon's test). \*p < 0.050, \*\*p < 0.010, \*\*\*p < 0.001.



**Figure 5.** Microscopy analyses of LDG subsets. (A) Enriched CD15<sup>+</sup> cells from PBMC isolates were stained with CD15 (PE), CD16 (APC) and CD14 or CD10 (FITC) and nuclei were counterstained with DAPI. Surface expression of the markers allowed the identification of the two subsets. Four representative images are shown. (B) Cell morphology was analyzed by transmitted light, in combination with fluorescence channels. Two fields where lymphocytes could be observed were chosen to allow comparison between LDG and lymphocytes regarding cell size and complexity, cytoplasm distribution and nuclear morphology. Two representative images are shown. (C) Nuclear morphology was very heterogeneous between LDG subsets. Those CD16<sup>+</sup> mostly exhibited a polymorphonuclear shape, whereas a lower degree of nuclear segmentation was observed for those CD16<sup>-</sup>. Z-stacks were used to visualize the nuclei complexity among different sections, which evidenced the existence of different lobules, if present. Two representative images are shown. Original magnification X630 for all the images.

The phenotype of the LDGs was also confirmed by fluorescence confocal microscopy (Fig. 5). In CD15<sup>+</sup> enriched fractions, both CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> and CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> subsets were identified, CD14/CD10 and CD16 co-expression being confirmed in the former (Fig. 5A). Interestingly, CD14 expression was observed to be lower than other markers, such as CD10, in accordance to the CD14<sup>low</sup> expression detected by flow cytometry. The analysis of cell morphology (Fig. 5B) confirmed that LDGs were bigger than lymphocytes (as revealed by flow cytometry) and exhibited a complex membrane, in accordance with the SSC signal. Differences in the nucleus were also evident between LDGs and lymphocytes. Furthermore, examination of the nuclear morphology by DAPI counterstaining confirmed the complex structure of the LDG nuclei (Fig. 5C). Importantly, different nuclear morphologies could be distinguished: CD16<sup>+</sup> LDGs were more likely to exhibit a polymorphonuclear morphology, whereas those lacking CD16 expression exhibited a less segmented profile (bi-lobular, indented or band-like).

In conclusion, our results confirm that the LDG pool in CKD is composed by two distinct populations, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> showing a mature neutrophil-like phenotype, whereas CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> exhibited a distinct, immature profile. Nuclear morphology was also different between LDG subsets, which may account, at least in part, for the differences in the SSC signal.

### Discussion

Chronic inflammation, exacerbated aging and organ damage are well recognized hallmarks of CKD. Despite considerable advances striving to identify the exact immune cell subsets involved, a number of knowledge gaps are still present. Over the last decade, the study of innate immunity in CKD, and especially of granulocytes, has been partially neglected. However, in recent years an emerging body of evidence has highlighted a pivotal role for LDGs in a wide range of conditions, although, their relevance in CKD had not been studied. Herein, we have characterized for the first time the LDG pool in CKD, with a focus on its phenotype, heterogeneity and its clinical relevance as a potential biomarker. Moreover, this study provides a proof-of-concept of the significance of the granulocyte gene DEF3 as a surrogate marker of LDG expansion and thus, of vascular calcification in CKD.

LDGs have gained notable attention because of its pro-inflammatory properties and their particular characteristics<sup>16,17</sup>. However, their origin and phenotype are far from being clear. Actually, there is a notable heterogeneity in the scientific literature about the LDG identification<sup>17</sup>). A consensus strategy for LDG identification is lacking, and several markers and phenotypes have been proposed, which limits the comparison among studies. Despite of the huge variation in the markers proposed among studies, LDGs are usually conceived as a uniform population in individual studies, rather than a complex pool. Our results not only suggest that two phenotypically distinct LDG subsets can be distinguished but also, that they differ in terms of their clinical relevance. However, whether this finding could be applied to other clinical scenarios remains unknown, since the literature points to divergent functions of the LDG expansion in different scenarios, hence adding another layer of complexity to this field<sup>17,20,21</sup>. LDGs exhibiting CD14<sup>low</sup> and CD16 expression were hallmarked by their elevated expression of mature and terminally-differentiated granulocytes and molecules of adhesion, as well as by their higher size and granularity compared to their CD14/CD16negative counterparts. Interestingly, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> LDGs exhibited a high expression of CD10, which mirrored that of neutrophils, whereas it was absent in their CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> counterparts. Importantly, CD10 is specifically expressed by mature neutrophils at their latest stages of differentiation<sup>22–24</sup>, thus pointing to differences in maturation status between both LDGs subsets. Moreover, CD10 has been previously found to resolve heterogeneity among granulocytes in patients with acute or chronic inflammatory conditions in terms of their maturation status, hence strengthening our findings<sup>25</sup>. Moreover, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> LDGs were hallmarked by a high expression of CD35, another well-known marker of mature neutrophils<sup>22,26</sup> that is expressed in the plasma membrane after being shed from the secretory granules<sup>27</sup>, hence not only confirming the late maturation of this LDG subset but also suggesting a link with neutrophil degranulation. On the other hand, CD16<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup> LDGs showed a higher expression of CD68, a marker of the early stage of neutrophil differentiation<sup>28</sup>, and exhibited a strong correlation with DEF3 expression, a well-known marker of early granulopoiesis<sup>19,28,29</sup>. The opposed distribution of CD35 and DEF3A aligns with the different content of neutrophil granules along their differentiation stages<sup>30,31</sup>. Taken together, all these lines of evidence lead us to hypothesize that LDGs in CKD have different origins: whereas the CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> cells are likely to be mature degranulated neutrophils, their CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> counterparts may represent a distinct, immature subpopulation of granulocytes prematurely released from the bone marrow. The differences observed for size and granularity are in line with this notion. Furthermore, our findings are in line with a different pattern of mobilization between these two subsets (Fig. 3), hence strengthening these notions. Surprisingly, a recent paper by Sagin and coworkers revealed no differences in the number of granules between low density granulocytes and mature neutrophils in cancer patients<sup>32</sup>, which may contradict, at least in part, our hypothesis. However, due to the phenotypic and functional differences of LDGs in cancer and chronic inflammatory conditions, these results must be interpreted with caution. Additionally, differences in granularity could be also attributed, at least in part, to nuclear morphology and plasma membrane complexity. The microscopy findings observed in this study are in agreement with this idea.

Despite being less abundant than other leukocytes and exhibiting an immature phenotype, LDGs have been reported to prompt innate immune mechanisms, secrete pro-inflammatory cytokines, produce reactive oxygen species and, more importantly, to form Neutrophil Extracellular Traps (NETs)<sup>18,33,34</sup>. In fact, their immature state has been related to genetic damage and genomic instability in lupus patients<sup>35</sup>, which is supposed to underlie its aberrant functionality. Therefore, LDGs are likely to perpetuate chronic inflammation and tissue damage, two prominent features of CKD pathogenesis. LDGs exhibit an enhanced production of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-17 or IFN $\gamma$ <sup>18,33,34</sup>. These mediators have been described to be related to CKD (immuno)-pathogenesis<sup>36–38</sup>. Interestingly, LDGs have been reported to impair vascular repair and promote direct endothelial damage<sup>18,33,39</sup>. Therefore, based on the literature, LDGs may be conceived as promising mediators of VC and multi-organ aging in CKD, thus warranting further mechanistic studies in the future.

Interestingly, a recent paper has brought to light the existence of a network of trans-cortical capillaries in long bones that form a direct connection between the endosteal and periosteal circulations<sup>40</sup>. These vessels effectively transport blood and express endothelial markers that can guide neutrophil trafficking to the peripheral compartment. The number of these vessels as well as their activation status was determined by increases in TNF $\alpha$  expression and osteoclast activity, and autoimmune diseases affecting bone physiology led to substantial changes in trans-cortical vessel number<sup>40</sup>. Therefore, it may be hypothesized that increased trans-cortical capillaries formation could account, at least in part, for the increased frequency of LDGs in peripheral blood in CKD. However, whether trans-cortical capillaries are increased in CKD remains to be clarified.

A remarkable finding from our study was the association between CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> frequency and DEF3 expression in PBMC fractions. On one hand, DEF3 is a transcript restricted to the granulocyte lineage and as such, it should not be detected in PBMC fractions. Although this was the case for HC, it does not hold true for CKD patients since a significant proportion showed a notable upregulation of this gene. Therefore, an increased DEF3 expression in the PBMC fractions can be attributed to a LDG expansion, as demonstrated by our findings. On the other hand, DEF3 is only expressed during the intermediate (myelocyte-metamyelocyte) stage of neutrophil maturation<sup>28,29</sup>. The fact that the DEF3 expression was correlated with CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> frequency, but not with that of CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> cells, confirms the immature status of the former and further supports the differences between these two subsets revealed by the immune phenotype performed. Taken together, our findings highlight a potential role of DEF3 expression as a marker of immature LDGs expansion. Although interesting from the mechanistic point of view, LDG quantification could be accompanied by technical and logistical limitations regarding its implementation in the clinical setting, as it requires the access to flow cytometry and handling cell biomarkers. However, the analysis of the DEF3 expression will have several advantages as a surrogate marker of LDG expansion and consequently, of the presence of VC. Interestingly, DEF3 has been linked to a number of adverse vascular outcomes (dyslipidemias, vascular and endothelial dysfunction, cardiovascular morbidity and mortality)<sup>41–44</sup>, hence reinforcing this point. Unfortunately, there is a profound knowledge gap about its functional involvement in the setting of these conditions.

LDG subsets were found to be stable over time. More importantly, LDGs were expanded to a similar extent in CKD patients undergoing peritoneal dialysis and hemodialysis, despite exhibiting a different time on dialysis. These results may suggest that LDG expansion is an early phenomenon and not the result of the disease progression itself. However, the possibility that LDGs expansion may be a consequence of the inflammatory condition associated with CKD and/or an epiphenomenon of the dialysis itself should not be ruled out. This represents a limitation of the present study that must be acknowledged. Moreover, the lack of functional assays does not allow us to evaluate the potential contribution (and differences) of the LDGs subsets to CKD pathogenesis. Further studies, with different patient populations and complementary methods are needed. Due to the heterogeneity of LDGs functional assays and the long-lasting for time frames of the clinical endpoints analyzed, a special focus must be considered at this stage to make a conscientious selection of functional assays and clinical endpoints.

In conclusion, the results herein presented suggest for the first time the alterations of LDGs in CKD. The LDG pool in CKD patients was more complex than initially conceived, with two subsets being identified and differing in their phenotype, nuclear morphology and presumably origin. Moreover, our study points to immature LDG as potential biomarkers of VC and sheds new light into the potential role of DEF3 expression as a relevant surrogate marker of LDG expansion in CKD. Our findings set the bases to design further functional and prospective studies to gain additional insight into this topic.

## Material and Methods

**Ethics statement.** Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board (Comité de Ética Regional de Investigación Clínica, reference PI16/00113), in compliance with the Declaration of Helsinki. All participants gave a written informed consent prior to their inclusion in the study.

**Patients and controls.** Our study involved 33 CKD patients on peritoneal dialysis (CKD5-PD) recruited from the Peritoneal Dialysis Outpatient Clinic (Unidad de Gestión Clínica de Nefrología) at the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA, Oviedo, Spain). Simultaneously, a group of 15 healthy volunteers from the general population was recruited as healthy controls (HC). Moreover, 16 CKD patients undergoing hemodialysis (CKD5-HD) (Hemodialysis Outpatient Clinic) at HUCA and 6 HC were independently recruited as a replication cohort (Supplementary Table 1). Predominant CKD etiology in PD and HD patients were glomerulonephritis (36.3% and 37.5%) and vascular causes (16.1% and 12.5%), with unknown etiology in 22 and 12.5% of patients. None of the CKD patients had a previous diagnosis of diabetes. Exclusion criteria were (i) ongoing immunosuppressive treatment, (ii) concomitant immune-mediated disease or cancer diagnosis, (iii) recent or current infection, (iv) previous CV disease, abdominal aneurism or intermittent claudication, (v) previous carotid surgery, (vi) pregnancy or (vii) diabetes mellitus. Vascular calcifications (VC) were measured by Kauppila scores<sup>45</sup>.

Blood samples were obtained from all study subjects by venipuncture. Automated serum biochemical parameters, lipid analysis and complete blood counts were immediately conducted on all the participants at the Laboratorio de Medicina (HUCA) using routine methods. For additional tests, serum samples were stored at -80 °C. Peripheral blood samples were immediately processed and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) fractions were obtained by centrifugation (1900 rpm, 20 minutes) on density gradients (Lymphoprep, Lymphocyte Separation Medium, Biowest, Germany).

**Flow cytometry.** PBMCs were treated with FcR Blocking Reagent (Milteny Biotech, Germany) for 20 minutes at 4 °C to avoid unspecific antibody binding to Fc receptors. Then, cells were incubated with CD14 FITC (Immunostep, Spain), CD15 PE-Cy7 (Milteny Biotech), CD16 APC-Cy7 (BioLegend, Germany) and HLA-DR PE (BD Biosciences) or corresponding isotype antibodies for 30 minutes at 4 °C. Cells were then washed with PBS and analyzed in a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) equipped with a FACS Diva 6.5 software. First, a 'live gate' including all cells subsets, and excluding debris and no cellular events, was designed. LDGs were first gated by their FSC/SSC properties and then, the CD15<sup>+</sup> population was selected (total LDGs). The percentage (frequency) of each population was computed and referred to the 'live gate'. Siglec8 expression was analyzed to confirm that eosinophils were not present within CD15<sup>+</sup> cells, after incubating with a Siglec8 FITC (BioLegend) antibody.

For LDG phenotyping, PBMCs cells were stained as previously explained together with antibodies to granulocyte lineage-specific markers: CD11b PE (BioLegend), CD10 FITC (BioLegend), CD35 FITC (BioLegend), CD66b APC (BioLegend), CD31 PE (Immunostep), CD62L PE (BD Biosciences) or IFNAR1 PE (R&D, Belgium). The intracellular CD68 staining (CD68 PE (BioLegend)) was performed on fixed and permeabilized cells (Cytofix/Cytoperm Kit, BD Biosciences) after extracellular staining. Neutrophil phenotyping was performed in parallel for comparison with LDGs subsets. To this end, whole blood was stained following the previous protocol followed by red blood cell lysis using FACS Lysing Solution (BD) for 5 minutes at 4 °C. Expression levels were measured as the Median Fluorescence Intensity (MFI) for each marker.

**Confocal experiments.** CD15<sup>+</sup> cells were enriched from PBMCs samples by immunomagnetic separation using MojoSort Streptavidin Nanobeads (BioLegend) after incubating with a biotin-conjugated anti-human CD15 antibody (BioLegend) following the protocol provided by the manufacturer. Enrichment yield after sorting was confirmed by flow cytometry. Then, enriched CD15<sup>+</sup> fractions were seeded in poly-L-lysine coverslips and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 30 minutes. Cells were washed twice with PBS and incubated with different antibodies [CD16 APC (Immunostep), CD15-biotin (BioLegend) and CD14 FITC (Immunostep) or CD10 FITC (BioLegend)] for 1 hour at 4 °C. Parallel incubations were performed with paired isotypes for each staining. Next, coverslips were washed twice with PBS and cells were incubated with streptavidin-conjugated PE (Immunostep) for 30 minutes at 4 °C. Coverslips were washed twice and cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 5 minutes at 4 °C. Finally, coverslips were mounted with Fluoroshield Mounting Medium With DAPI (abcam) and immediately analyzed using a Leica TCS-SP8X Confocal Microscope (Leica Microsystems) using the 63X

objective. Images were acquired with LAS X software (Leica), which was also used to produce image overlays. To evaluate nuclear morphology, z-stacks were obtained from 4  $\mu\text{m}$  sections and maximum projections were derived.

**Gene expression analyses.** Total RNA from circulating PBMCs was extracted using TRI reagent (Sigma-Aldrich). After reverse transcription using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), quantitative-real time PCR (qPCR) reactions were performed in triplicate using the Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies), Fast Start Universal Probe Master (Roche) and pre-developed assays (Thermo-Fisher Scientific). Quantification of human DEF3 and CD10 target genes relative to GAPDH expression was performed by comparing threshold cycles using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method.

**Cytokine quantification.** Serum levels of IL-10, IL-6, IL-2, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  were measured with a bead-based multiplex assay (BiolegendPlex, BioLegend) analyzed in a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) under FACS Diva 6.5, following the protocol provided by the manufacturer. The detection limits were 1.2 pg/ml (IL-10 and IL-2) or 2.4 pg/ml (IL-6, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ).

**Statistical analysis.** Continuous variables were expressed as median (interquartile range) or mean  $\pm$  standard deviation, whereas n (%) was used for categorical ones. Differences among groups were assessed by Mann Withney U or Kruskal-Wallis (with Dunn-Bonferroni correction for multiple comparisons) tests, as appropriate. Correlations were assessed by Spearman ranks' test. Paired tests were used to evaluate differences between subsets from the same sample. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were used to evaluate the adequacy of LDGs subsets as biomarkers, and areas under the curve (AUC) with 95% confidence intervals (CI) and p-values were calculated. To evaluate the additional value of LDGs as biomarkers to conventional variables, z-scores were first derived from the different variables (age and time on dialysis) and combined indices were obtained by summing the individual variables. Multiple regression analyses were conducted to analyze the role of LDGs as a biomarker after adjusting for potential confounders. A p-value  $< 0.050$  was considered as statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 24.0 and GraphPad Prism 5.0 for Windows.

#### Data Availability

No datasets were generated or analyzed during the current study.

#### References

- Stenvinkel, P. & Larsson, T. E. Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging. *Am. J. Kidney Dis.* **62**, 339–51 (2013).
- de Jager, D. J. *et al.* Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. *JAMA* **302**, 1782–9 (2009).
- Cannata-Andia, J. B., Rodríguez-García, M., Carrillo-López, N., Naves-Díaz, M. & Díaz-López, B. Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, S267–73 (2006).
- Rodríguez-García, M. *et al.* Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant* **24**, 239–46 (2009).
- Bessueille, L. & Magne, D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2475–2489 (2015).
- Benz, K., Hilgers, K.-E., Daniel, C. & Amann, K. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Role of Inflammation. *Int. J. Nephrol.* **2018**, 1–7 (2018).
- Kochi, M., Kohagura, K., Shiohira, Y., Iseki, K. & Ohya, Y. Chronic kidney disease, inflammation, and cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis. *J. Cardiol.* **71**, 277–283 (2018).
- Libby, P. *et al.* Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2071–2081 (2018).
- Vervloet, M. & Cozzolino, M. Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall? *Kidney Int.* **91**, 808–817 (2017).
- Beyrau, M., Bodkin, J. V. & Nourshargh, S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol.* **2**, 120134 (2012).
- Deniset, J. F. & Kubes, P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J. Leukoc. Biol.* **103**, 829–838 (2018).
- Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* **210**, 1283–99 (2013).
- Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 181–218 (2014).
- Hacbarth, E. & Kajdacsy-Balla, A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* **29**, 1334–42 (1986).
- Cloke, T., Munder, M., Taylor, G., Müller, I. & Kropf, P. Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. *PLoS One* **7**, e48939 (2012).
- Carmona-Rivera, C. & Kaplan, M. J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* **35**, 455–63 (2013).
- Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C. & Cassatella, M. A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol. Rev.* **273**, 48–60 (2016).
- Denny, M. F. *et al.* A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J. Immunol.* **184**, 3284–97 (2010).
- Bennett, L. *et al.* Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood. *J. Exp. Med.* **197**, 711–723 (2003).
- Dumitru, C. A., Moses, K., Trellakis, S., Lang, S. & Brandau, S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 1155–67 (2012).
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M. & Koenderman, L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3813–27 (2013).
- Elghetany, M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells. Mol. Dis.* **28**, 260–74 (2002).
- Cossmann, J., Neckers, L. M., Leonard, W. J. & Greene, W. C. Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *J. Exp. Med.* **157**, 1064–9 (1983).
- McCormack, R. T., Nelson, R. D. & LeBien, T. W. Structure/function studies of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA/CD10) expressed on human neutrophils. *J. Immunol.* **137**, 1075–82 (1986).
- Marini, O. *et al.* Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**, 1343–1356 (2017).
- Elghetany, M. T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J. & Uhrova, H. Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *J. Clin. Lab. Anal.* **18**, 36–41 (2004).

27. Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503–21 (1997).
28. Cowland, J. B. & Borregaard, N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 989–95 (1999).
29. Rice, W. G. *et al.* Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* **70**, 757–65 (1987).
30. Cowland, J. B. & Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* **273**, 11–28 (2016).
31. Borregaard, N., Sorensen, O. E. & Theilgaard-Mönch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345 (2007).
32. Sagiv, J. Y. *et al.* Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* **10**, 562–73 (2015).
33. Villanueva, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **187**, 538–52 (2011).
34. Lin, A. M. *et al.* Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol.* **187**, 490–500 (2011).
35. Singh, N. *et al.* Genomic alterations in abnormal neutrophils isolated from adult patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R165 (2014).
36. Silverstein, D. M. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr. Nephrol.* **24**, 1445–1452 (2009).
37. Lam, C. W. K. 2. Inflammation, Cytokines and Chemokines in Chronic Kidney Disease. *EJIFCC* **20**, 12–20 (2009).
38. Mihai, S. *et al.* Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–16 (2018).
39. Carmona-Rivera, C., Zhao, W., Yalavarthi, S. & Kaplan, M. J. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1417–24 (2015).
40. Grüneboom, A. *et al.* A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nat. Metab.* <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0016-5> (2019).
41. López-Bermejo, A. *et al.* Alpha defensins 1, 2, and 3: potential roles in dyslipidemia and vascular dysfunction in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1166–71 (2007).
42. Maneerat, Y., Prasongsukarn, K., Benjathummarak, S., Dechkhajorn, W. & Chairis, U. Increased alpha-defensin expression is associated with risk of coronary heart disease: a feasible predictive inflammatory biomarker of coronary heart disease and in hyperlipidemia patients. *Lipids Health Dis.* **15**, 117 (2016).
43. Joseph, G. *et al.* Plasma alpha-defensin is associated with cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 1470–5 (2008).
44. Aragonés, G. *et al.* Proteomic Profile of Unstable Atheroma Plaque: Increased Neutrophil Defensin 1, Clusterin, and Apolipoprotein E Levels in Carotid Secretome. *J. Proteome Res.* **15**, 933–44 (2016).
45. Kauppila, L. L. *et al.* New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* **132**, 245–50 (1997).

### Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Dr. Cristina Tomás-Zapico (Department of Functional Biology, University of Oviedo) and Dr. Marta Alonso-Guervós (Microscopy Unit, Scientific Core Facilities, University of Oviedo) for their excellent assistance to conduct the confocal experiments. This work was supported by European Union FEDER funds, “Fondo de Investigación Sanitaria” (PI16/00113, PI14/01452, PI17/02181) from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013–2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028 and IDI/2018/000152) from Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Red de Investigación Renal-RedInREN (RETIC REDINREN RD16/0009) from ISCIII, and by Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas (SAFIM). J.R.-C. is supported by postdoctoral contracts from the “Juan de la Cierva” program (FJCI-2015-23849 and IJCI-2017-32070), NC-L is supported by GRUPIN14-028 and IDI/2018/000152, and ASD is supported by Asociación Investigación de Fisiología Aplicada and ISPA.

### Author Contributions


J.R.-C. and N.C.-L. performed most of the experimental procedures and carried out the statistical analyses. C.U., M.S., C.R.-S., M.R.-G. and C.D.-C. were in charge of patients’ recruitment and clinical data collection. J.R.-C., N.C.-L., J.B.C.-A., A.S. and A.D. contributed to the data analysis interpretation and discussion of the results. J.R.-C. and A.S. drafted the manuscript. A.D. conceived the study, designed the protocols and edited the manuscript. All authors read the manuscript, revised it for intellectual content, approved the final version and agree to be accountable for all aspects of the work.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49429-x>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019





OPEN

# Barley- $\beta$ -glucans reduce systemic inflammation, renal injury and aortic calcification through ADAM17 and neutral-sphingomyelinase2 inhibition

Maria Vittoria Arcidiacono<sup>1,9</sup>, Natalia Carrillo-López<sup>2,9</sup>, Sara Panizo<sup>2,9</sup>, Anabel L. Castro-Grattoni<sup>1</sup>, Petya Valcheva<sup>1</sup>, Catalina Ulloa<sup>3</sup>, Javier Rodríguez-Carrión<sup>2,4</sup>, Anna Cardús<sup>1,5</sup>, Covadonga Quirós-Caso<sup>2</sup>, Laura Martínez-Arias<sup>2</sup>, Carlos Martínez-Salgado<sup>6</sup>, María José Motilva<sup>7</sup>, Carmen Rodríguez-Suárez<sup>5</sup>, Jorge B. Cannata-Andía<sup>2,8,10</sup> & Adriana S. Dusso<sup>1,2,10\*</sup>

In chronic kidney disease (CKD), hyperphosphatemia-induced inflammation aggravates vascular calcification (VC) by increasing vascular smooth muscle cell (VSMC) osteogenic differentiation, ADAM17-induced renal and vascular injury, and TNF $\alpha$ -induction of neutral-sphingomyelinase2 (nSMase2) to release pro-calcifying exosomes. This study examined anti-inflammatory  $\beta$ -glucans efficacy at attenuating systemic inflammation in health, and renal and vascular injury favoring VC in hyperphosphatemic CKD. In healthy adults, dietary barley  $\beta$ -glucans (B $\beta$ glucans) reduced leukocyte superoxide production, inflammatory ADAM17, TNF $\alpha$ , nSMase2, and pro-aging/pro-inflammatory STING (Stimulator of interferon genes) gene expression without decreasing circulating inflammatory cytokines, except for  $\gamma$ -interferon. In hyperphosphatemic rat CKD, dietary B $\beta$ glucans reduced renal and aortic ADAM17-driven inflammation attenuating CKD-progression (higher GFR and lower serum creatinine, proteinuria, kidney inflammatory infiltration and nSMase2), and TNF $\alpha$ -driven increases in aortic nSMase2 and calcium deposition without improving mineral homeostasis. In VSMC, B $\beta$ glucans prevented LPS- or uremic serum-induced rapid increases in ADAM17, TNF $\alpha$  and nSMase2, and reduced the 13-fold higher calcium deposition induced by prolonged calcifying conditions by inhibiting osteogenic differentiation and increases in nSMase2 through Dectin1-independent actions involving B $\beta$ glucans internalization. Thus, dietary B $\beta$ glucans inhibit leukocyte superoxide production and leukocyte, renal and aortic ADAM17- and nSMase2 gene expression attenuating systemic inflammation in health, and renal injury and aortic calcification despite hyperphosphatemia in CKD.

In Chronic Kidney Disease (CKD), the development of hyperphosphatemia increases the risk of vascular calcification (VC) and cardiovascular mortality<sup>1</sup>. Elevations in serum phosphate (P), even to levels below the upper normal limit, increase the propensity for VC indirectly by worsening secondary hyperparathyroidism (SHPT)

<sup>1</sup>Division of Experimental Nephrology, IRBLleida, Lleida, Spain. <sup>2</sup>Bone and Mineral Research Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), REDinREN-ISCIII, Oviedo, Spain. <sup>3</sup>Division of Nephrology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>4</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain. <sup>5</sup>Division of Infection & Immunity, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, Wales, UK. <sup>6</sup>Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, IECSCYL, Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), REDinREN-ISCIII, Salamanca, Spain. <sup>7</sup>Department of Food Science and Technology, Agrotecnio Research Center, Lleida University, Lleida, Spain. <sup>8</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain. <sup>9</sup>These authors contributed equally: Maria Vittoria Arcidiacono, Natalia Carrillo-López and Sara Panizo. <sup>10</sup>These authors jointly supervised this work: Jorge B. Cannata-Andía and Adriana S. Dusso. \*email: [adriana.dusso@gmail.com](mailto:adriana.dusso@gmail.com)

and bone de-mineralization<sup>2</sup> and also directly, by inducing the osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC)<sup>3</sup>.

Hyperphosphatemia also increases systemic inflammation<sup>4,5</sup> and consequently, oxidative-stress-driven multi-organ injury<sup>6,7</sup> worsening CKD-induced renal and vascular damage predisposing to VC and high mortality rates<sup>1,3</sup>. Part of the renal and vascular deleterious effects of oxidative stress involves the induction of two critical enzymes: ADAM17 (A Disintegrin And Metalloproteinase, also called TACE for Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme)<sup>8,9</sup> and neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)<sup>10</sup>. Specifically, renal ADAM17 expression increases in CKD of all etiologies<sup>11</sup> aggravating renal damage<sup>12</sup> and systemic inflammation, the latter by releasing soluble TNF $\alpha$  to the circulation<sup>8</sup>. In turn, TNF $\alpha$  induces its own gene expression<sup>13</sup>, and also the ADAM17 gene<sup>14</sup>, generating a vicious ADAM17/TNF $\alpha$  feed-forward inflammatory loop that worsens multi-organ injury<sup>9</sup>. In fact, in the severe inflammation of LPS-induced endotoxemic shock in mice, exclusive ablation of the ADAM17 gene in mouse myeloid cells is sufficient to markedly reduce mortality rates<sup>15</sup>.

In the vasculature, TNF $\alpha$  increases local inflammation aggravating VSMC osteogenic differentiation<sup>7</sup>, and also, nSMase2 gene expression and activity<sup>16</sup>, an essential determinant of aging-induced inflammation, atherosclerosis and VC<sup>10,16,17</sup>. In fact, nSMase2 gene ablation or pharmacological inhibition of nSMase2 activity markedly reduces age-enhanced inflammation in health<sup>10</sup>, the higher propensity for atherosclerotic lesions in the ApoE $^{-/-}$  mouse<sup>17</sup> and, more significantly for CKD, the release of exosomes initiating medial calcification<sup>18</sup>.

Based upon current therapeutic limitations to lower hyperphosphatemia in CKD<sup>18</sup>, and considering that orally administered yeast  $\beta$ -glucans efficaciously reduce multi-organ injury and mortality rates in LPS-challenged rats,<sup>19</sup> this study was designed to examine whether an anti-inflammatory strategy with  $\beta$ -glucans could effectively attenuate systemic inflammation in health, including the mediator of early pro-senescent/pro-inflammatory interferon like responses, activated by the cGAS/STING pathway of cytosolic dsDNA recognition<sup>20</sup> and also, renal and vascular injury predisposing to VC in a rat model of hyperphosphatemic rat CKD.

To test this hypothesis, among the multiple natural sources for  $\beta$ -glucans, we chose barley  $\beta$ -glucans (B $\beta$ glucans), based upon the safety of the FDA recommended daily intake of 3 to 5 g for their cholesterol<sup>21,22</sup> lowering capacity. Specifically, we evaluated the efficacy of dietary B $\beta$ glucans to reduce: (a) Systemic inflammation in healthy adults with normal renal function; (b) Renal and aortic inflammation and the propensity for CKD progression and aortic calcium deposition in a rat model of hyperphosphatemic CKD, and (c) The contribution of B $\beta$ glucans regulation of ADAM17 and nSMase2 expression to their anti-inflammatory/anti-calcifying actions *in vivo* and *in vitro* in VSMC.

## Results

**Human study. Systemic anti-inflammatory actions by dietary B $\beta$ Glucans.** The daily intake of 3 g of B $\beta$ Glucans, as barley bread by 10 individuals with normal renal function during 4 weeks, decreased circulating leukocyte mitochondrial superoxide production by 50% in one week (Supplementary Fig. 1).

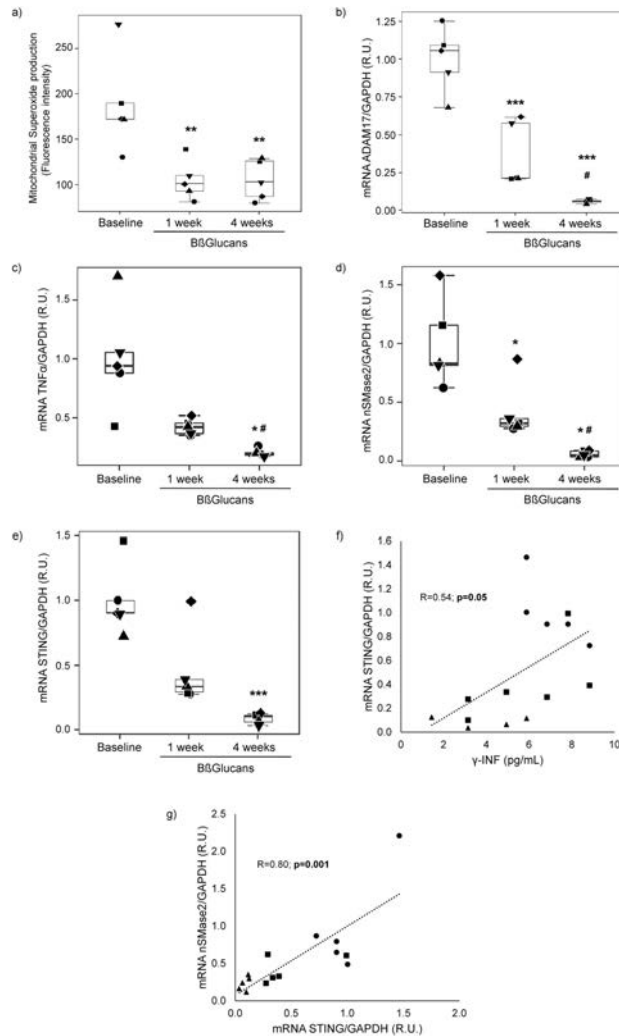
In the 5 volunteers that completed the 3 g daily intake of B $\beta$ Glucans for one month, the 50% inhibition of leukocyte superoxide production in the first week remained up to the end (week 4) (Fig. 1a). Furthermore, dietary B $\beta$ Glucans also decreased leukocyte median mRNA levels of three recognized inflammatory markers: ADAM17 (80% at week 1 and 94% at week 4;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1b), TNF $\alpha$  (64% (not significant) at week 1 and 80% at week 4,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1c) and nSMase2 (58% at week 1 and 77% at week 4;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1d). These B $\beta$ Glucans actions in circulating leukocytes after 1 or 4 weeks of a daily intake occurred despite no increases in serum levels either of  $\beta$ -glucans or in markers of bone and mineral homeostasis (calcium, phosphate, PTH, soluble klotho) or of systemic inflammation (C reactive protein and pro-inflammatory cytokines, except for a significant reduction of  $\gamma$ -interferon by week 4) (Table 1).

Dietary B $\beta$ Glucans-driven reductions in serum  $\gamma$ -interferon levels were paralleled by significant decreases in leukocyte STING mRNA ( $r = 0.54$ ;  $p = 0.05$ ; Fig. 1f). In fact, leukocyte STING mRNA levels decreased by 90% ( $p < 0.01$ ) by week 4 (Fig. 1e) of dietary B $\beta$ Glucans intake. Furthermore, this reduction strongly correlated with that of leukocyte nSMase2 gene expression ( $r = 0.80$ ;  $p = 0.001$ ; Fig. 1g).

**Animal study. Renal anti-inflammatory actions by dietary B $\beta$ Glucans.** The administration of the high P diet containing B $\beta$ Glucans to uremic rats had no effect on daily food consumption (20 g/day) or body weights (CKD:  $234 \pm 13$  g to  $248 \pm 23$  g;  $n = 13$ ; CKD + B $\beta$ glucans:  $237 \pm 9$  g to  $255 \pm 18$  g;  $n = 13$ ). Furthermore, despite undetectable serum (1,3)- $\beta$ -D-glucan levels, the CKD + B $\beta$ glucans group showed better renal function compared to the CKD group (lower serum creatinine, BUN, proteinuria and higher renal klotho) (Table 2), as well as reduced inflammatory markers (lower renal inflammatory cell infiltration (Table 2), ADAM17 protein and mRNA (Fig. 2a,b) and nSMase2 mRNA) (Fig. 2c). Serum and urinary TNF $\alpha$  levels were undetectable in both dietary groups.

Regarding bone and mineral parameters, there were no significant differences in serum calcium, phosphate, PTH, 25-hydroxyvitamin D, FGF23 and bone alkaline phosphatase between groups (Table 3). The higher renal klotho found in the CKD + B $\beta$ glucans group (Table 2) did not result in increases in 24 hours phosphaturia (Table 3).

**Animal study. Vascular anti-inflammatory actions by B $\beta$ Glucans.** The uremic rats fed the high P diet with B $\beta$ glucans had significantly lower median aortic ADAM17 protein (47%) (Fig. 3a,b), ADAM17 and TNF $\alpha$  mRNA levels (80%) (Fig. 3c) and nSMase2 mRNA levels (65%) and activity (55%) compared with the CKD group (Fig. 3d). Furthermore, in the aortas of these uremic rats, TNF $\alpha$  mRNA levels correlated directly with ADAM17 mRNA ( $r = 0.81$ ;  $p < 0.001$ ) and also with nSMase2 mRNA levels and activity ( $r = 0.89$ ;  $p < 0.001$  and  $r = 0.81$ ;  $p < 0.01$ , respectively).



**Figure 1.** Dietary B $\beta$ glucans inhibit mitochondrial superoxide production, ADAM17, TNF $\alpha$ , nSMase2 and STING gene expression in circulating leukocytes from healthy adults. Box plot analyses of changes in baseline superoxide production (a), ADAM17 (b), TNF $\alpha$  (c), nSMase2 (d) and STING (e) mRNA levels (each shape represents one individual) in peripheral blood monocytes from 5 healthy adults ingesting 3 g of B $\beta$ glucans daily, as slices of barley bread, during 4 weeks. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. Baseline, \* $p < 0.05$  vs. 1 week. Correlation between leukocyte STING mRNA and serum  $\gamma$ -interferon levels (f) and between leukocyte STING and nSMase2 mRNA levels (g). Each shape represent baseline (●), one week (■) and 4 weeks (▲) values.

**Animal study. Vascular anti-calcifying actions by dietary B $\beta$ glucans.** In the CKD group, 36% of the aortas were Von Kossa positive while all aortas from the CKD + B $\beta$ glucans group stained negatively (Fig. 4a). Furthermore, median aortic total calcium was 8 times lower in the CKD + B $\beta$ glucans group (7.5  $\mu$ g Ca/mg

	Baseline (n = 5)	1 week B $\beta$ Glucans (n = 5)	4 weeks B $\beta$ Glucans (n = 5)
<b>Serum <math>\beta</math>glucans</b>			
(1,3)- $\beta$ -D-glucan (pg/mL)	Undetectable	Undetectable	Undetectable
<b>Renal function</b>			
Creatinine (mg/dL)	0.86 $\pm$ 0.10	0.89 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.16
Urea (mg/dL)	23.9 [21.9–52.3]	26.3 [25.6–39.1]	26.8 [24.2–29.9]
Albumin (g/L)	46.02 $\pm$ 2.57	45.3 $\pm$ 1.48	44.46 $\pm$ 2.15
<b>Mineral homeostasis</b>			
Calcium (mmol/L)	2.37 $\pm$ 0.08	2.32 $\pm$ 0.07	2.32 $\pm$ 0.05
Phosphorus (mmol/L)	1.29 $\pm$ 0.18	1.18 $\pm$ 0.16	1.14 $\pm$ 0.23
PTH (pg/dL)	56.00 [36.40–58.40]	51.70 [33.00–55.90]	31.9 [30.9–43.2]
Klotho (pg/mL)	925.33 [809.83–1,003.17]	873.17 [749.83–1,001.50]	868.00 [819.83–1,010.83]
<b>Inflammation</b>			
C Reactive Protein (mg/dL)	0.11 [0.04–0.22]	0.05 [0.04–0.10]	0.10 [0.04–0.13]
IL-2 (pg/mL)	1.37 $\pm$ 0.21	1.54 $\pm$ 0.26	1.47 $\pm$ 0.48
IL-6 (pg/mL)	4.31 $\pm$ 0.50	2.91 $\pm$ 1.52	3.55 $\pm$ 1.05
TNF $\alpha$ (pg/mL)	5.18 $\pm$ 3.15	5.20 $\pm$ 4.00	3.86 $\pm$ 1.47
$\gamma$ -INF $\gamma$ (pg/mL)	7.05 $\pm$ 1.28	6.31 $\pm$ 2.28	3.71 $\pm$ 1.73*
VCAM-1 (ng/mL)	2,180.68 $\pm$ 117.97	2,130.27 $\pm$ 34.16	2,246.75 $\pm$ 139.80

**Table 1.** Serum biochemistries in healthy volunteers. Values indicate Mean  $\pm$  SD or Median (interquartile range). \* $p < 0.05$  vs. Baseline.

	CKD (n = 13)	CKD + B $\beta$ Glucans (n = 13)	p value
Serum Creatinine (mg/dL)	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	<b>0.03</b>
BUN (mg/dL)	52.9 $\pm$ 9.6	44.3 $\pm$ 7.2	<b>0.02</b>
Phosphaturia (nmol/24 hours)	1.9 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.6	0.15
Proteinuria (mg/24 hours)	101.1 $\pm$ 80.0	21.4 $\pm$ 32.1	<b>0.04</b>
$\alpha$ -Klotho (IOD/Area)	1,477.2 $\pm$ 459.7	3,197.0 $\pm$ 1839.4	<b>0.02</b>
Lymphocyte infiltration (% Area)	2.2 $\pm$ 2.4	1.0 $\pm$ 0.7	<b>0.04</b>

**Table 2.** Biomarkers of renal dysfunction in rat CKD. Values indicate Mean  $\pm$  SD.

protein) compared to uremic controls (CKD group: 60  $\mu$ g Ca/mg protein) (Fig. 4b). Despite the higher Ca deposition found in the CKD group, there were minor changes in median aortic mRNA levels of osteogenic differentiation markers (reductions in  $\alpha$ -actin and increases in Runx2 and Osterix) compared to the CKD + B $\beta$ Glucans group, which did not reach statistical significance (Table 4). Instead, total aortic calcium content strongly correlated with increases in nSMase2 activity ( $r = 0.60$ ;  $p < 0.01$ ).

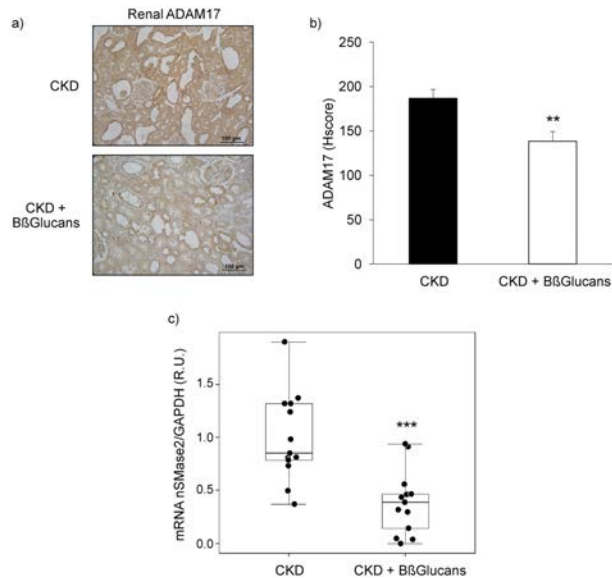
### **In vitro studies. Direct anti-inflammatory/anti-calcifying actions by B $\beta$ Glucans in VSMC.**

*Protocol 1* searched for an effective anti-inflammatory dose of B $\beta$ Glucans extracts in the murine monocyte cell line Raw 264.7, exposed to 5  $\mu$ g/mL of *E. Coli* LPS for 16 hours to reproduce severe systemic inflammatory stimuli.

Exposure to LPS increased mitochondrial superoxide production by 2-fold (Supplementary Fig. 1). A dose of 100  $\mu$ g/mL of commercial B $\beta$ Glucans extracts was necessary to fully prevent LPS-induced superoxide production. In unstimulated monocytes, the 100  $\mu$ g/mL dose of B $\beta$ Glucans extracts elicited anti-inflammatory actions as it reduced baseline monocyte superoxide production by 50% (Supplementary Fig. 1).

*Protocol 2* examined the impact of LPS-driven inflammation on VSMC phenotype. In A7r5 cells, the exposure to 100  $\mu$ g of B $\beta$ Glucans/mL for 16 hours had no effect on basal nSMase2, TNF $\alpha$  or ADAM17 gene expression (Fig. 5a–c). A7r5 exposure to LPS for 16 hours sufficed to significantly increase nSMase2, TNF $\alpha$  and ADAM17 gene expression (Fig. 5a–c) above the levels in unstimulated controls. Furthermore, the combination of the same dose of LPS with 100  $\mu$ g/mL B $\beta$ Glucans fully prevented LPS-driven increases in nSMase2 gene expression maintaining nSMase2 mRNA at the levels of the control group, failed to counteract LPS-induction of TNF $\alpha$  and decreased LPS-induced ADAM17 gene expression only marginally (Fig. 5a–c).

Regarding osteogenic differentiation, A7r5 exposure to 100  $\mu$ g of B $\beta$ Glucans/mL for 16 hours had no effect on basal mRNA levels of  $\alpha$ -actin, Runx2 or Osterix. Instead, while LPS exposure significantly decreased A7r5 levels of  $\alpha$ -actin and increased Runx2 and Osterix gene expression compared to those in the control group (Fig. 5d–f), the combination of LPS with 100  $\mu$ g/mL B $\beta$ Glucans attenuated the stimulatory effect of LPS maintaining the osteogenic differentiation markers at levels similar to those in the control group (Fig. 5d–f).



**Figure 2.** Renoprotection by dietary B $\beta$ glucans in hyperphosphatemic rat CKD. (a) Representative immunohistochemical images of renal ADAM17 from 5/6NX rats fed a high P diet with none (CKD; n = 13) or 2 mg of B $\beta$ glucans/g diet (CKD + B $\beta$ glucans; n = 13) during 4 weeks (Inset bars indicate relative scale); (b) Quantification of immunostaining. Bars and error bars represent mean  $\pm$  SD of Histscores values for all rats in both dietary groups; (c) Box plot analysis of nSMase2 gene expression in kidneys from rats described in (a). \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs. CKD.

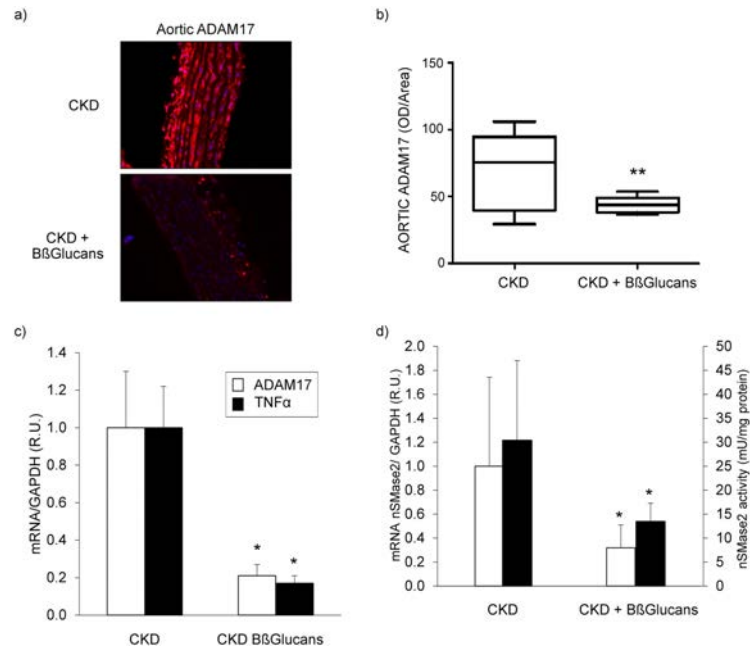
	CKD (n = 13)	CKD + B $\beta$ Glucans (n = 13)	p value
Calcium (mg/dL)	9.8 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.8	0.19
Phosphate (mg/dL)	8.1 $\pm$ 2.6	7.7 $\pm$ 2.2	0.66
PTH (pg/mL)	3107 $\pm$ 2152	2044 $\pm$ 1127	0.14
25-hydroxyvitamin D (ng/mL)	29.4 $\pm$ 8.7	27.9 $\pm$ 6.5	0.63
FGF23 (ng/mL)	10.9 $\pm$ 5.6	12.5 $\pm$ 6.5	0.58
Bone alkaline phosphatase (U/mL)	42.1 (33.3–70.2)	28.1 (16.9–74.0)	0.28
(1,3)- $\beta$ -D-glucan (pg/mL)	Undetectable	Undetectable	—

**Table 3.** Serum biomarkers of bone and mineral metabolism in rat CKD. Values indicate Mean  $\pm$  SD or Median (interquartile range).

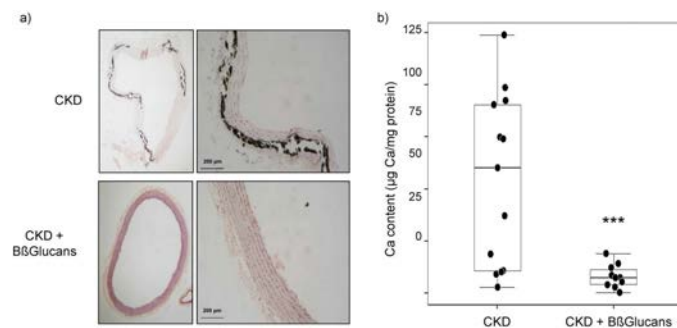
*Protocol 3* examined the impact of uremia-driven inflammation on VSMC phenotype. The exposure of A7r5 to uremic serum from hyperphosphatemic rats for 16 hours significantly increased TNF $\alpha$  and ADAM17 gene expression. However, the almost 2-fold increase in nSMase2 gene expression was not statistically significant (Fig. 6a–c). By contrast, exposure of A7r5 cells to uremic serum + B $\beta$ glucans maintained the mRNA of the three markers of inflammation at levels similar to those in the cells exposed to control serum, which was not affected by exposure to B $\beta$ glucans (Fig. 6a–c).

In A7r5 cells exposed to normal serum, B $\beta$ glucans had no effect on basal levels of the osteogenic markers. Instead, the uremic serum only increased Runx2 gene expression with no significant changes in either  $\alpha$ -actin or Osterix (Fig. 6d–f). However, the addition of 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans to the uremic serum prevented the increases in Runx2 gene expression maintaining its levels at basal values.

**In vitro studies. Direct anti-calcifying and anti-nSMase2 actions by B $\beta$ Glucans.** In *Protocol 4*, A7r5 cells were exposed exclusively to calcifying media (CM: 2 mM Ca; 3 mM P) during 4 days, which increased



**Figure 3.** Anti-inflammatory vascular protection by dietary BβGlucans. (a) Representative immunostaining for ADAM17 (Inset bars indicate relative scale) in thoracic aortas from 5/6NX rats fed a high P diet with none (CKD; n = 13) or 2 mg of BβGlucans/g diet (CKD + BβGlucans; n = 13) during 4 weeks. (b) Quantification of aortic ADAM17 immunostaining. Box plots represent median (interquartile range) of OD/Area values for all rats in both dietary groups. (c) Aortic ADAM17 and TNFα gene expression; (d) Aortic nSMase2 mRNA (white bars; CKD n = 9; CKD + Bβglucans n = 7) and activity (black bars; CKD n = 13; CKD + Barley n = 11). R.U.: Relative units. Bars and error bars represent mean ± SD; \*p < 0.05 vs. CKD.



**Figure 4.** Anti-calcifying protection by dietary BβGlucans. (a) Representative calcium deposition measured by Von Kossa (black staining) (Inset bars indicate relative scale) in thoracic aortas from 5/6NX rats fed a high P diet with none (CKD; n = 13) or 2 mg of BβGlucans/g diet (CKD + BβGlucans; n = 13) during 4 weeks. (b) Quantification of calcium deposition in thoracic aortas described in (a); boxplot analysis of changes in calcium content, \*p < 0.05 vs. CKD.

	CKD	CKD + B $\beta$ Glucans	p value
$\alpha$ -actin mRNA (R.U.)	0.97 (0.69–1.45) N = 12	1.20 (0.37–1.41) N = 9	0.696
Runx2 mRNA (R.U.)	1.67 (1.11–2.58) N = 10	1.51 (0.9–1.91) N = 11	0.481
Osterix mRNA (R.U.)	0.72 (0.47–1.13) N = 12	0.53 (0.47–0.73) N = 9	0.374

**Table 4.** Biomarkers of vascular osteogenic differentiation in rat CKD. Values indicate Median (interquartile range).

calcium deposition by 13-fold. The addition of B $\beta$ Glucans to the CM markedly attenuated (by 72%) the increases in calcium deposition induced by the CM (Fig. 7a), prevented the decrease in  $\alpha$ -actin and the increases in osteogenic Osterix and Runx2 mRNA levels (Fig. 7b).

Similar results were found in *ex vivo* experiments culturing aortic rings from normal rats under the same calcifying conditions used in A7r5 (data not shown).

In addition, in A7r5 cells exposed to CM, the activity of nSMase2 increased by 3-fold, an induction totally prevented by adding 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ Glucans to the CM (Fig. 7c).

These direct anti-calcifying actions of B $\beta$ Glucans extracts occurred in cells with undetectable mRNA levels of the  $\beta$ -glucan receptor Dectin 1 (not shown) and involved  $\beta$ -glucan internalization into A7r5 cells, as demonstrated by significant increases in intracellular B $\beta$ Glucans levels from undetectable in cells exposed to the Non CM or CM alone to 2.3 ng/well ( $p < 0.01$ ) in cells exposed to the CM + B $\beta$ glucans.

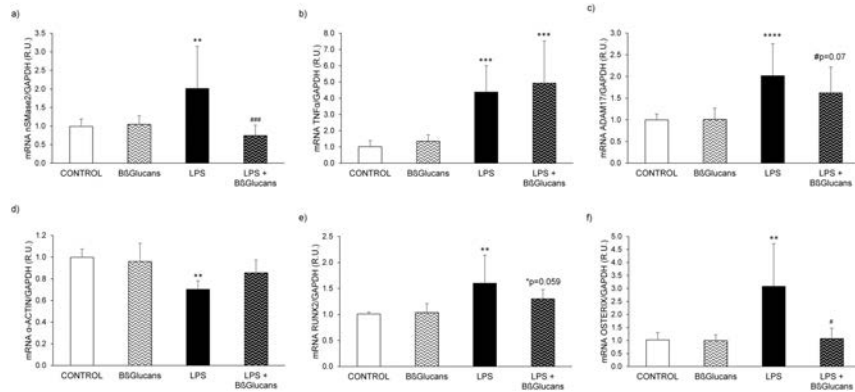
## Discussion

This work presents unprecedented properties of dietary B $\beta$ glucans of high translational relevance to attenuate systemic inflammation in health, as well as the progression of renal and vascular damage predisposing to VC in hyperphosphatemic rat CKD. These B $\beta$ glucans actions extend beyond the inhibition of leukocyte superoxide production and of STING/interferon-like pro-aging/proinflammatory signals that precede any elevation of systemic inflammatory markers above normal levels, and involve a marked suppression of leukocyte, renal and vascular ADAM17 and nSMase2.

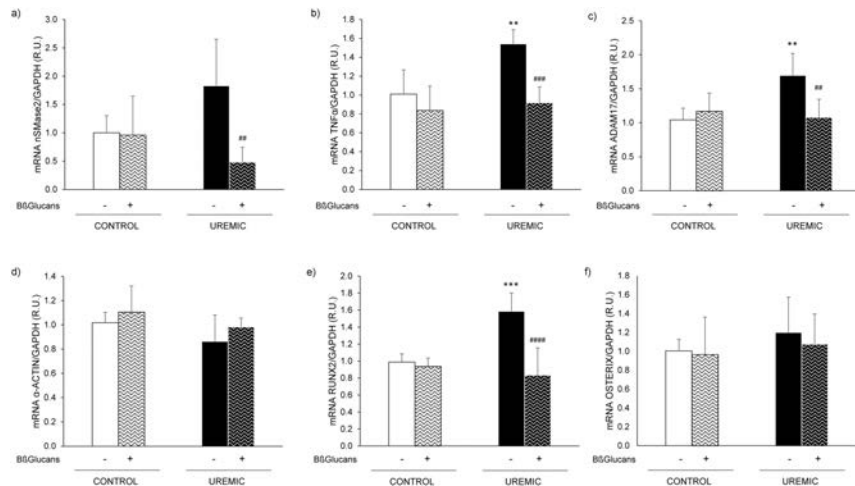
**B $\beta$ glucans control of systemic inflammation in health.** In healthy adults, the daily intake of 3 g of B $\beta$ glucans, recommended by the FDA to lower serum cholesterol<sup>21,22</sup> could rapidly and efficaciously suppress systemic inflammation, a recognized inducer of VC. Indeed, dietary B $\beta$ glucans markedly reduced circulating leukocyte superoxide production (50%) as well as leukocyte ADAM17 and nSMase2 gene expression (60%) after a week intake, despite unchanged serum levels of CRP, TNF $\alpha$  and several other inflammatory cytokines, all within the normal range, and undetectable serum  $\beta$ -glucans concentrations. Despite the small size of this population of adults with normal renal function, B $\beta$ glucans rapid inhibition of these two pro-inflammatory genes in circulating leukocytes supports their potential to prevent/attenuate ADAM17-driven multi-organ injury and mortality rates<sup>8</sup>, and also nSMase2-driven age-enhanced inflammation regardless of serum TNF $\alpha$ <sup>10</sup> and the propensity for atheromatous lesions<sup>17</sup>, as conclusively demonstrated in experimental models of ADAM17 or nSMase2 gene ablation.

Significantly, by week 4, dietary B $\beta$ glucans exerted a stronger (80 to 90%) inhibition of both ADAM17 and nSMase2 gene expression, and also markedly inhibited leukocyte TNF $\alpha$  mRNA levels, despite no further reductions of either of their inducers: superoxide production and serum TNF $\alpha$ . Thus, dietary B $\beta$ glucans inhibition of leukocyte ADAM17, nSMase2 and TNF $\alpha$  gene expression involved mechanisms other than suppressing oxidative stress induction of ADAM17<sup>8,14</sup> and nSMase2 gene expression<sup>10,23</sup>, or TNF $\alpha$ -self up-regulation<sup>13</sup>. Significantly, among the inflammatory cytokines measured, dietary B $\beta$ glucans markedly reduced only circulating  $\gamma$ -interferon levels by week 4. This finding led us to evaluate whether dietary B $\beta$ Glucans could also attenuate interferon-like pro-senescence/pro-inflammatory responses initiated by activation of the cGAS/STING pathway<sup>20,24,25</sup>. We found that serum  $\gamma$ -interferon not only strongly correlated with leukocyte STING mRNA but, more significantly, dietary B $\beta$ Glucans caused a 90% reduction of leukocyte STING mRNA by week 4. Thus, leukocyte STING emerged as a novel sensitive biomarker of leukocyte pro-aging/pro-inflammatory features, as its reductions by dietary B $\beta$ Glucans precede any elevations above normal in circulating levels of inflammatory cytokines, including  $\gamma$ -interferon. Furthermore, the strong correlation between leukocyte STING and nSMase2 mRNA levels suggests that dietary B $\beta$ Glucans' progressive and simultaneous suppression of leukocyte STING and nSMase2 gene expression could contribute to attenuate the age-enhanced inflammation attributed to increases in nSMase2 in health. Indeed, enhanced nSMase2 release of exosomes from leukocytes carrying a cGAS/STING-driven senescence/inflammation-associated secretory phenotype would propagate these signals to healthy neighboring cells<sup>26</sup>. Even though the accuracy of these early biomarkers of the anti-aging, anti-inflammatory actions of B $\beta$ Glucans was only identified in the 5 normal individuals who completed the 4 weeks of B $\beta$ Glucans intake, the strength of the leukocyte STING/nSMase2 association ( $r^2 = 0.65$ ) provides a solid base for early anti-inflammatory actions that need to be further corroborated in larger cohorts and long-term studies.

**B $\beta$ glucans renal and vascular protection in hyperphosphatemic CKD.** In hyperphosphatemic rat CKD, a daily intake of 40 mg of B $\beta$ glucans, as barley flour, effectively reduced inflammation-driven renal injury by targeting renal elevations in ADAM17, an enzyme induced by CKD of all etiologies<sup>15</sup> and also by TNF $\alpha$ <sup>14</sup> and oxidative stress<sup>8</sup>, despite undetectable serum  $\beta$ -glucan levels. The higher renal ADAM17 in uremic controls

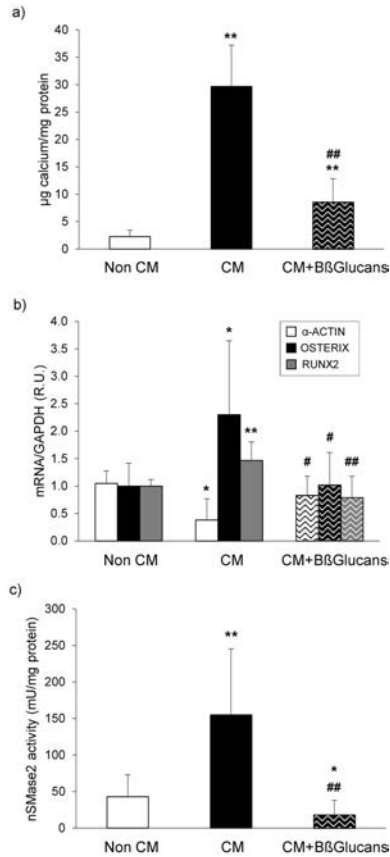


**Figure 5.** B $\beta$ glucans attenuate the vascular smooth muscle cell inflammation and osteogenic differentiation induced by LPS. Gene expression of nSMase2 (a), TNF $\alpha$  (b), ADAM17 (c),  $\alpha$ -actin (d), Runx2 (e) and Osterix (f) in A7r5 cells exposed to control medium (CONTROL), 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans ( $\beta$ -GL), 5  $\mu$ g/mL of LPS (LPS) or the combination of 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans and 5  $\mu$ g/mL of LPS (LPS +  $\beta$ -GL) for 16 hours. Bars and error bars represent mean  $\pm$  SD from three independent experiments, each performed in triplicate per experimental condition. R.U.: relative units. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  vs. Control,  $^{\#}p < 0.05$  and  $^{\#\#}p < 0.001$  vs. LPS.



**Figure 6.** B $\beta$ glucans attenuate vascular smooth muscle cell inflammation and osteogenic differentiation induced by uremic conditions. Gene expression of nSMase2 (a), TNF $\alpha$  (b), ADAM17 (c),  $\alpha$ -actin (d), Runx2 (e) and Osterix (f) in A7r5 cells exposed to serum from rats with normal renal function (Control), with or without 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans ( $\beta$ -GL), or exposed to serum from rats with 14 weeks of uremia fed a high phosphorus diet (Uremic) with or without 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans for 16 hours. Bars and error bars represent mean  $\pm$  SD from three independent experiments, each performed in triplicate per experimental condition. R.U.: relative units. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Control,  $^{\#}p < 0.01$ ,  $^{\#\#}p < 0.001$  and  $^{\#\#\#}p < 0.0001$  vs. Uremic.





**Figure 7.** B $\beta$ glucans attenuate calcium deposition by inhibiting vascular smooth muscle cell osteogenic differentiation and nSMase2 activity. (a) Calcium deposition in A7r5 cells exposed to non-calcifying media (Non CM: 1 mM Ca; 1 mM P) or calcifying media (CM: 2 mM Ca; 3 mM P) with 0 or 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans (CM +  $\beta$ -GL) during 4 days. (b) Gene expression of  $\alpha$ -actin (white bars), osterix (black bars) and Runx2 (gray bars) in A7r5 cells treated as described. (c) nSMase2 activity in A7r5 cells treated as described. Bars and error bars represent mean  $\pm$  SD from three independent experiments performed in triplicate per experimental condition. R.U.: relative units. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. Non CM, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. CM.

is sufficient to explain their increased inflammatory cell infiltration and 24 h proteinuria, as demonstrated by Lautrette and co-workers<sup>12</sup>. In turn, the higher proteinuria of uremic controls could mediate the faster decline in GFR, as recently reported<sup>27</sup>, and corroborated herein by the higher serum creatinine and BUN in the CKD group.

Dietary B $\beta$ glucans also reduced renal nSMase2 gene expression, which could extend the renoprotective benefits of this nutritional strategy to hypertensive individuals<sup>28</sup>, by counteracting angiotensin II-driven-increases in renal nSMase2 or to diabetic nephropathy, by reducing the release to the urine of megalin loaded exosomes<sup>29</sup>.

B $\beta$ glucans simultaneous attenuation of CKD progression and renal inflammatory cell infiltration, the two most potent down-regulators of renal  $\alpha$ -klotho content<sup>5,30</sup>, resulted in a higher renal  $\alpha$ -klotho in the CKD + B $\beta$ glucans group. However, phosphaturia was similar between dietary groups, which suggested that the higher renal klotho was insufficient to ameliorate kidney resistance to FGF23 and, consequently, the deleterious renal impact of phosphate retention.

In the inflamed aortas from these uremic rats, TNF $\alpha$  mRNA levels correlated directly with ADAM17 mRNA, partly reflecting the expected TNF $\alpha$  induction of ADAM17<sup>9</sup> and of its own gene<sup>13,14</sup>, and also with nSMase2 mRNA levels and activity. Dietary B $\beta$ glucans suppressed by 80% the self-perpetuating aortic ADAM17/TNF $\alpha$ -inflammatory loop<sup>9</sup> and prevented the 3-fold elevations in nSMase2 reported to prompt pro-calcifying exosome release<sup>16</sup>, thereby reducing aortic calcium deposition in the CKD + B $\beta$ glucans group by 8-fold compared to that in uremic controls. Interestingly, the higher calcium in uremic controls was unrelated to changes in the expression of markers of osteogenic differentiation and strongly correlated only with increased nSMase2. Thus, our aortic findings support the evidence that exosomes released by nSMase2 are the earliest calcified particles preceding overt calcification<sup>31</sup>, and also, that there are differential increases in vascular nSMase2 release of calcified and noncalcified exosomes causing heterogeneous calcium deposition at sites of early calcification<sup>31,32</sup>. Furthermore, Von Kossa staining was positive only in 36% of the aortas from uremic controls supporting that overt calcification is a late event in the course of CKD. Significantly, dietary B $\beta$ glucans fully prevented overt calcification, as none of the aortas in the barley group was Von Kossa positive despite no amelioration of systemic calcium and phosphate homeostasis.

Importantly, a B $\beta$ glucans intake effective at reducing aortic nSMase2 gene expression and activity had no adverse impact on bone mineralization, as estimated by serum bone specific alkaline phosphatase levels. This is an important translational consideration to design therapeutic anti-nSMase2 strategies in CKD because the nSMase2 null mouse presents severe bone and dental mineralization defects<sup>33,34</sup>.

**Mechanisms for B $\beta$ glucans' actions.** An intriguing aspect of B $\beta$ glucans potent anti-inflammatory, anti-ADAM17, anti-nSMase2, renal and vascular protective actions *in vivo*, is that they occurred with undetectable serum  $\beta$ glucans levels. Indeed, part of these actions may not require intestinal B $\beta$ glucans absorption because oral B $\beta$ glucans induce a saccharolytic shift in the microbiota that augments serum levels of anti-inflammatory short chain fatty acids, and also reduces circulating levels of p-cresyl-sulfate<sup>35</sup>, a uremic toxin promoting renal and cardiovascular injury<sup>36,37</sup>.

However, our studies *in vitro* in murine monocytes and VSMC exposed to commercially available B $\beta$ glucans extracts (95% purity) demonstrated direct anti-inflammatory, anti-calcifying actions that support the pharmacokinetics of dietary B $\beta$ glucans absorbed in the gut<sup>38–40</sup>. Specifically, in murine monocytes, we first identified that a dose of 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans extracts was necessary to prevent the 2-fold increases in mitochondrial superoxide production induced by a 16 h exposure to an LPS challenge (5  $\mu$ g/mL). Significantly, this anti-inflammatory dose of B $\beta$ glucans also reduced by 50% the superoxide production in unstimulated monocytes, thus reproducing the 50% inhibition exerted in normal subjects after a week, or a month, of a daily intake of 3 g of B $\beta$ glucans.

Furthermore, the exposure of A7r5 cells to LPS (5  $\mu$ g/mL for 16 h) corroborated that severe inflammation rapidly induced a switch to an osteogenic phenotype, as the increases in the mRNA levels for ADAM17, nSMase2 and TNF $\alpha$  were associated to decreases in  $\alpha$ -actin and increases in the osteogenic markers Runx2 and Osterix. Importantly, the simultaneous exposure of A7r5 cells to LPS and the effective anti-inflammatory dose of B $\beta$ glucans in immune cells, fully prevented LPS-induced inflammatory and osteogenic phenotypic changes without affecting VSMC baseline phenotype.

A7r5 cells also responded rapidly to uremic stimuli (serum from hyperphosphatemic rat CKD for 16 h) with significant elevations in ADAM17, TNF $\alpha$  and Runx2, but without significant increases in nSMase2 and Osterix or decreases in  $\alpha$ -actin. Nonetheless, B $\beta$ glucans fully prevented all uremia-induced changes, thus maintaining baseline levels of all of these inflammatory/osteogenic markers. These findings support that a threshold for inflammatory or uremic stimuli is necessary to increase nSMase2 and osteogenic markers to levels resulting in overt calcification.

In VSMC exposed exclusively to prolonged (4 days) high Ca/high P conditions, B $\beta$ glucans extracts decreased by 60% nSMase2 gene expression in the absence of any inflammatory or uremic stimuli, through a process involving  $\beta$ 1,3-glycan internalization into VSMC that is Dectin1-independent, as A7r5 cells showed undetectable Dectin1 mRNA levels. Several  $\beta$ -glucans receptors expressed in VSMC (Complement Receptor 3 or TLR2/6)<sup>41,42</sup> could mediate B $\beta$ glucans actions in A7r5 cells.

The internalization of (1,3) $\beta$ -D-glucans into A7r5 cells exposed to B $\beta$ glucans extracts may also occur in other B $\beta$ glucans target cells, which could explain in part the systemic, renal and vascular anti-inflammatory/anti-nSMase2 actions of dietary B $\beta$ glucans in healthy adults and in hyperphosphatemic rat CKD despite undetectable serum levels. Indeed, there is evidence that soluble  $\beta$ 1,3-glucose polymers, generated from oat and barley grains by the highly predominant  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,4-galactanase in human gut bacteria<sup>43</sup>, are internalized and further processed by intestinal epithelial and immune cells to shorter  $\beta$ 1,3-glucans. In turn, the shorter  $\beta$ 1,3-glucans released to the circulation<sup>39</sup> can be re-internalized into immune cells reducing serum levels while enhancing leukocyte systemic anti-oxidant/anti-inflammatory capacity<sup>41,44</sup>, as demonstrated herein in healthy adults.

Barley is the least expensive cereal grain. Therefore, dietary B $\beta$ glucans health benefits could reach the poorest populations of CKD patients and of healthy adults with systemic pro-aging or inflammatory problems and, therefore, at a higher risk for renal and vascular injury.

Prospective clinical trials are mandatory to evaluate the sensitivity and accuracy of leukocyte ADAM17, nSMase2 or TNF $\alpha$  mRNA and STING levels to personalize dietary B $\beta$ glucans interventions for efficacious systemic, renal and vascular protection in the general population and to attenuate CKD progression and the initiation of medial calcium deposition in human CKD.

## Material and Methods

**Ethics statements.** Approval for the human study was obtained from the Institutional Review Board (Comité de Ética en Investigación Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias), in compliance with the Declaration of Helsinki. All participants gave a written informed consent prior to their inclusion in the study.

Approval for the animal study was obtained from the Ethics Committee for Animal Experimentation at Lleida University in compliance with current international legislation for animal research.

All methods in the experimental protocols described below were carried out following the regulations for biomedical research of the University of Lleida and the University of Oviedo.

**Human study.** Ten volunteers (2 men, 8 women, age 20 to 60 y.o.), with normal renal function ingested daily during 4 weeks barley bread, manufactured with flour from barley grains selected for their high (1-3) (1-4)- $\beta$ -D-glucans content (8%), to provide 3 g of B $\beta$ Glucans (produced at Food Science and Technology Department, Lleida University). Blood (5 mL) was drawn at baseline and at week 1 and 4 to obtain plasma and circulating leukocytes (after red cell lysis). As systemic inflammation biomarkers, we measured leukocyte mitochondrial superoxide production by flow cytometry in freshly isolated leukocytes. In the five volunteers (1 man, 4 women) that complied with the daily intake for one-month, we also quantified the mRNA levels of TNF $\alpha$ , ADAM17, nSMase2 and STING, as described in the *in vitro* studies. Serum levels of (1, 3) $\beta$ -D-glucans, cholesterol, glycemia, markers of renal function, calcium and phosphate homeostasis, and systemic inflammation were measured as specified in blood chemistries. The reason to abandon the study was the omission of the daily intake more than twice per week.

**Animal study.** Five-sixth nephrectomized (NX) female Sprague-Dawley rats (200–225 g) were fed during 4 weeks a high phosphate diet (HPD: 0.9% P; 0.6% calcium, Ca; Altromin) containing either 0 (CKD; n = 13) or 2 mg of B $\beta$ Glucans/g diet (CKD + B $\beta$ Glucans) from the barley flour described above, with no changes in dietary protein, P, carbohydrate or lipid content. The modified Megazyme method quantified final  $\beta$ -D-glucan content in the diet<sup>45</sup>.

#### ***In vitro* studies.**

- I. B $\beta$ Glucans anti-inflammatory actions were examined in the murine monocyte cell line Raw 264.7 and in the rat aortic VSMC line A7r5.

*Protocol 1:* Rested Raw264.7, synchronized at G0 by exposure to FBS-free DMEM medium for 6 h, were treated for 16 hours with 5  $\mu$ g/mL LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 (L4391, Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ g/mL of barley (1–3)(1–4)- $\beta$ -D-glucans (G6513, Sigma-Aldrich; 95% purity) or both.

*Protocol 2:* A7r5 cells were exposed to 5  $\mu$ g/mL LPS, 100  $\mu$ g/mL of barley (1–3)(1–4)- $\beta$ -D-glucans or both in DMEM + 1% foetal bovine serum (FBS) for 16 hours.

*Protocol 3:* To test uremia-driven inflammatory stimuli, A7r5 cells were exposed to either control serum (a pool from rats with normal renal function fed a normal P diet; DMEM + 10% control serum), or to uremic serum (a pool from rats with uremia of 14 weeks fed a high phosphorus diet; DMEM + 10% uremic serum), with or without 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ glucans for 16 hours.

- II. B $\beta$ Glucans anti-calcifying actions were examined in A7r5 cells and in aortic rings (1–2 mm) from normal rats.

*Protocol 4:* Aortic rings were washed in cold PBS containing P/S and then placed in fibronectin pre-coated (100  $\mu$ g/mL) 6-well plates (8 rings/well) with growing media. A7r5 and aortic rings were exposed during 4 days to either non-calcifying medium (Non CM: DMEM-F12 + 0.1% BSA, 1 mM Ca, 1 mM P) or to calcifying medium (CM: DMEM-F12 + 0.1% BSA, 2 mM Ca, 3 mM P) with 0 or 100  $\mu$ g/mL of B $\beta$ Glucans. A7r5 levels of the  $\beta$ -glucan receptor Dectin1 were examined by qPCR and intracellular levels of (1–3)- $\beta$ -D-glucans as indicated in blood chemistries.

**Blood chemistries and proteinuria.** Human biochemical parameters were measured at the Medicine Laboratory of the Hospital Universitario Central de Asturias using Cobas 8000 (Roche Diagnostics) Module c702, for most parameters, and Module e801 for PTH immunoassay.

For animal studies spectrophotometry and immunoassay (Cobas 8000, Roche Diagnostics) were used to measure serum levels of Ca, P, creatinine and 25-hydroxyvitaminD (25(OH)D). QuantiChrom™ Urea Assay Kit measured Blood Urea Nitrogen (BUN, BioAssay System). ELISA Kits were used to measure rat intact PTH (Immutopics), rat fibroblast growth factor 23 (FGF23; EMD Millipore), rat bone alkaline phosphatase (Biosource), blood and urinary rat TNF $\alpha$  (Abcam plc, Cambridge, UK). Serum human TNF $\alpha$  was measured by bead-based multiplex assay (BiolegendPlex, Biolegend, Germany) analyzed in a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) equipped with a FACS Diva 6.5 software, following manufacturers' protocols. Test strips measured urinary protein (SIEMENS MULTISTICK 10SG, Analyticon Biochemistry). The Fungitel™ kit (Associates of Cape Code, Inc) measured serum, plasma and intracellular (1,3) $\beta$ -D-glucans.

**Histological analyses.** Rat renal and aortic 5  $\mu$ m-paraffin sections were deparaffinized and hydrated. Renal ADAM17 and CD45 (leukocyte infiltration) immunostainings were performed as in<sup>46</sup> and renal  $\alpha$ -klotho with kit-CTS008 (R&D System). For aortic ADAM17 immunofluorescence nuclei were counterstained with Hoechst. For renal ADAM17, sections were counterstained with hematoxylin-eosin. Each slide had its negative control (no primary antibody). Supplementary Table 1 lists primary antibodies and dilutions. Quantifications used ImageJ or Histoscores<sup>47</sup>.

**Mitochondrial superoxide production.** Circulating human leukocytes and cultured Raw 264.7 cells were washed with PBS, resuspended in 5  $\mu$ M superoxide sensitive probe MitoSOX™ (Thermo-Fisher Scientific) in PBS

with either vehicle or the corresponding treatment for 10 min at 37 °C, protected from light and washed twice with PBS. A FACS Canto™II flow cytometer (Becton Dickinson Bioscience) measured superoxide anion levels.

**Von kossa staining.** Deparaffinized, hydrated rat aorta sections were incubated in 5% silver nitrate before the revealing solution. Slides placed in 2% sodium thiosulfate were counterstained with nuclear fast red.

**Total calcium measurements.** A 20 mm segment of the abdominal rat aorta proximal to the iliac bifurcation was first grinded in liquid nitrogen and then decalcified with 0.6 N HCl. A7r5 cells, washed thrice with PBS, were decalcified with 0.6 N HCl.

Samples were shaken gently at 4 °C for 24 h. Upon centrifugation, O-cresolphthalein-complexone measured total calcium in supernatants. Pellets were re-suspended in lysis buffer (0.1 N NaOH, 0.1% SDS) for protein extraction and quantification (Lowry method, Bio-Rad).

For rat aortic rings, total calcium was measured as above in cell pellets from RNA extraction (below) and expressed as µg calcium/µg RNA.

**Sphingomyelinase2 activity.** The Amplex Red Sphingomyelinase assay kit (Molecular Probes, Invitrogen) was used in aorta sections and in A7r5 whole cell extracts.

**Quantitative PCR.** Total tissue or cell RNA, extracted with TRI reagent (Sigma-Aldrich), was reverse transcribed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative-real time PCR (qPCR) reactions used the Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies), Fast Start Universal Probe Master (Roche), pre-developed assays (Thermo-Fisher Scientific) and  $\Delta\Delta Ct$  quantification<sup>18</sup>.

**Statistical analysis.** T tests, ANOVA or Kruskal-Wallis with Bonferroni post-hoc test examined statistical differences between groups. Results are expressed as mean  $\pm$  SD unless otherwise stated. Statistical analyses used GraphPad Prism, SPSS 17.0 for Windows or R.

#### Data availability

No datasets were generated or analyzed during the current study.

Received: 9 September 2019; Accepted: 6 November 2019;

Published online: 28 November 2019

#### References

- Vervloet, M. & Cozzolino, M. Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall? *Kidney Int* **91**, 808–817 (2017).
- Slatopolsky, E., Brown, A. & Dusso, A. Role of phosphorus in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* **37**, S54–S7 (2001).
- Paloian, N. J. & Giachelli, C. M. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol* **307**, F891–900 (2014).
- Navarro-Gonzalez, J. F., Mora-Fernandez, C., Muros, M., Herrera, H. & Garcia, J. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 1646–1654 (2009).
- Izquierdo, M. C. *et al.* Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **27**(Suppl 4), iv6–10 (2012).
- Massy, Z. A., Stenvinkel, P. & Drueke, T. B. The role of oxidative stress in chronic kidney disease. *Semin Dial* **22**, 405–408 (2009).
- Zhao, M. M. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int* **79**, 1071–1079 (2011).
- Brill, A. *et al.* Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovasc Res* **84**, 137–144 (2009).
- Gooz, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 146–169 (2010).
- Rutkute, K., Asmis, R. H. & Nikolova-Karakashian, M. N. Regulation of neutral sphingomyelinase-2 by GSH: a new insight to the role of oxidative stress in aging-associated inflammation. *Journal of lipid research* **48**, 2443–2452 (2007).
- Melenhorst, W. B. *et al.* ADAM17 upregulation in human renal disease: a role in modulating TGF- $\alpha$  availability? *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F781–790 (2009).
- Lautrette, A. *et al.* Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med* **11**, 867–874 (2005).
- Tabibzadeh, S., Satyaswaroop, P. G., von Wolff, M. & Strowitzki, T. Regulation of TNF- $\alpha$  mRNA expression in endometrial cells by TNF- $\alpha$  and by oestrogen withdrawal. *Mol Hum Reprod* **5**, 1141–1149 (1999).
- Charbonneau, M. *et al.* Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced increases in tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells. *J Biol Chem* **282**, 33714–33724 (2007).
- Horiuchi, K. *et al.* Cutting edge: TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol* **179**, 2686–2689 (2007).
- Kapustin, A. N. *et al.* Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res* **116**, 1312–1323 (2015).
- Lallemant, T. *et al.* nSMase2 (Type 2-Neutral Sphingomyelinase) Deficiency or Inhibition by GW4869 Reduces Inflammation and Atherosclerosis in ApoE(–/–) Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 1479–1492 (2018).
- Habbous, S. *et al.* The efficacy and safety of sevelamer and lanthanum versus calcium-containing and iron-based binders in treating hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* **32**, 111–125 (2017).
- Sandvik, A. *et al.* Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol* **148**, 168–177 (2007).
- Kreienkamp, R. *et al.* A Cell-Intrinsic Interferon-like Response Links Replication Stress to Cellular Aging Caused by Progerin. *Cell Rep* **22**, 2006–2015 (2018).
- Liu, S. *et al.* Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr* **70**, 412–419 (1999).

22. Karmally, W. *et al.* Cholesterol-lowering benefits of oat-containing cereal in Hispanic americans. *J Am Diet Assoc* **105**, 967–970 (2005).
23. Liu, B. & Hannun, Y. A. Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* **272**, 16281–16287 (1997).
24. Cai, X., Chiu, Y. H. & Chen, Z. J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Molecular cell* **54**, 289–296 (2014).
25. Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q. & Chen, Z. J. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E4612–e4620 (2017).
26. Torralba, D. *et al.* Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nat Commun* **9**, 2658 (2018).
27. Melsom, T. *et al.* Mild Albuminuria Is a Risk Factor for Faster GFR Decline in the Nondiabetic Population. *Kidney Int Rep* **3**, 817–824 (2018).
28. Bautista-Perez, R. *et al.* Involvement of neutral sphingomyelinase in the angiotensin II signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* **308**, F1178–1187 (2015).
29. De, S. *et al.* Exocytosis-Mediated Urinary Full-Length Megalin Excretion Is Linked With the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **66**, 1391–1404 (2017).
30. Hu, M. C. *et al.* Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating alphaKlotho. *J Am Soc Nephrol* **27**, 79–90 (2016).
31. Kapustin, A. N. *et al.* Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* **109**, e1–12 (2011).
32. Shroff, R. C. *et al.* Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* **118**, 1748–1757 (2008).
33. Khavandgar, Z. *et al.* A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *J Cell Biol* **194**, 277–289 (2011).
34. Aubin, I. *et al.* A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet* **37**, 803–805 (2005).
35. Cosola, C. *et al.* Beta-Glucans Supplementation Associates with Reduction in P-Cresyl Sulfate Levels and Improved Endothelial Vascular Reactivity in Healthy Individuals. *PLoS One* **12**, e0169635 (2017).
36. Ito, S. & Yoshida, M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Toxins (Basel)* **6**, 665–678 (2014).
37. Lin, C. J., Wu, V., Wu, P. C. & Wu, C. J. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PLoS One* **10**, e0132589 (2015).
38. Iraz, M., Bilgic, S., Samdanci, E., Ozerol, E. & Tanbek, K. Preventive and early therapeutic effects of beta-glucan on the bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **19**, 1505–1516 (2015).
39. Hong, F. *et al.* Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* **173**, 797–806 (2004).
40. Rice, P. J. *et al.* Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1079–1086 (2005).
41. Chan, G. C., Chan, W. K. & Sze, D. M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol* **2**, 25 (2009).
42. Han, Y. *et al.* Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* **25**, 284–289 (2012).
43. Tamura, K. *et al.* Molecular Mechanism by which Prominent Human Gut Bacteroidetes Utilize Mixed-Linkage Beta-Glucans, Major Health-Promoting Cereal Polysaccharides. *Cell Rep* **21**, 417–430 (2017).
44. Novak, M. & Vetvicka, V. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *J Immunotoxicol* **5**, 47–57 (2008).
45. Motilva, M. J. *et al.* Adaptation of the standard enzymatic protocol (Megazyme method) to microplaque format for  $\beta$ -(1,3) (1,4)-d-glucan determination in cereal based samples with a wide range of  $\beta$ -glucan content. *Journal of Cereal Science* **59**, 224–227 (2014).
46. Arcidiacono, M. V., Yang, J., Fernandez, E. & Dusso, A. The induction of C/EBP $\beta$  contributes to vitamin D inhibition of ADAM17 expression and parathyroid hyperplasia in kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **30**, 423–433 (2015).
47. Arcidiacono, M. V., Yang, J., Fernandez, E. & Dusso, A. Parathyroid-specific epidermal growth factor-receptor inactivation prevents uremia-induced parathyroid hyperplasia in mice. *Nephrol Dial Transplant* **30**, 434–440 (2015).
48. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

### Acknowledgements

Authors thank Dr. Roxana Savin (Agrotecnio Research Center, Lleida University) for generating barley grain with high (8%)  $\beta$ -glucan content by multiplying lines selected for this trait (provided by Semillas Batlle, Spain) and for valuable suggestions for project design; Ana Martínez (IRB Lleida) for diet-chow preparation and Xenia Borràs (Food Technology Dept., Agrotecnio Research Center, Lleida University) for Barley bread preparation. A grant to A.S.D. and M.J.M. from IRB Lleida and Agrotecnio Research collaborative projects from the Consell Social at Lleida University supported initial work, Instituto de Salud Carlos III and co-funded by European Union (ERDF/FEDER) (FIS PI11/00259, PI14/01452, PI17/02181), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013–2017 y 2018–2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152), RedInRen from ISCIII (ISCIII-RETIC REDINREN RD16/0009). Investigator support included: NC-L by GRUPIN14-028 and IDI-2018-000152, LM-A by GRUPIN14-028, SP by FICYT; MVA and PV by Educational Grant 2 A/2015 from ERA-EDTA CKD-MBD Working Group; PV and AC by ERA-EDTA fellowships 2011 and 2012; JR-C by MINECO (“Juan de la Cierva” program, FJCI-2015-23849); A.S.D. by Asociación Investigación de Fisiología Aplicada. A.S.D. and M.J.M. are members of the Campus Iberus (Ebro Valley Campus of International Excellence).

### Author contributions

M.J.M., C.R., J.B.C.-A. and A.S.D. designed the study; M.V.A., N.C.-L., S.P., A.L.C.-G., P.V., C.U., A.C., C.Q.-C., L.M.-A., J.R.-C. and A.S.D. performed experiments and analyzed results; M.V.A., N.C.-L. made figures; M.V.A., N.C.-L., S.P., C.M.-S., M.J.M., C.R., J.B.C.-A. and A.S.D. drafted and reviewed the manuscript. All authors approved the final version.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54306-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.S.D.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA



**SERVICIO DE SALUD  
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS**

HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS IV

**Comité de Ética de la Investigación del  
Principado de Asturias**  
Avda. de Roma s/n  
33011.-Oviedo  
Tfno: 985.10.79.27/985.10.80.28  
e-mail: [ceicr\\_asturias@hca.es](mailto:ceicr_asturias@hca.es)

Área Sanitaria

Oviedo, 12 de Julio de 2017

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias, ha revisado el Proyecto (FIS) n° 99/17, titulado: "β-GLUCANOS DE CEBADA: UNA ESTRATEGIA NUTRICIONAL EFECTIVA PARA PREVENIR EL DESARROLLO DE CALCIFICACIÓN VASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA". Investigadora Principal Dña. Adriana Dusso.

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado proyecto reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y en consecuencia emite su autorización.

Le recuerdo que deberá guardarse la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este proyecto.

Fdo: Eduarda Arriáez Moral  
Secretario del Comité de Ética de la Investigación  
del Principado de Asturias

