



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Polimorfismos y perfiles de expresión de microRNAs en el diagnóstico y predicción de la evolución de la calcificación cardiovascular y la enfermedad renal crónica

Tesis Doctoral

Guillermo Solache Berrocal

Oviedo, 2019



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Polimorfismos y perfiles de expresión de microRNAs en el diagnóstico y predicción de la evolución de la calcificación cardiovascular y la enfermedad renal crónica

Tesis Doctoral

Guillermo Solache Berrocal

Oviedo, 2019



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Polimorfismos y perfiles de expresión de microRNAs en el diagnóstico y predicción de la evolución de la calcificación cardiovascular y la enfermedad renal crónica	Inglés: Polymorphisms and microRNA expression profiles in the diagnosis and prediction of development of cardiovascular calcification and chronic kidney disease

2.- Autor	
Nombre: Guillermo Solache Berrocal	DNI/Pasaporte/NIE
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

En una población envejecida como es la de los países desarrollados, la enfermedad renal crónica (ERC) supone un importante problema de salud pública, llegando a tener algún grado de disminución en la función renal hasta el 10% de la población adulta de España. La pérdida de función de los riñones afecta a otros sistemas de órganos, favoreciendo el depósito de calcio en el aparato cardiovascular. La calcificación de las arterias y las válvulas cardiacas no se produce por un simple depósito de mineral, interviniendo numerosos mecanismos que, aunque tengan peculiaridades en ambas, convergen en procesos de transdiferenciación del tipo celular característico del tejido a células similares a osteoblastos.

A pesar del grave impacto que el descenso en la capacidad excretora tiene sobre la salud, más de la mitad de los pacientes con ERC en fase terminal mueren por causas cardiovasculares, falleciendo por este mismo motivo individuos aún en estadios tempranos. Debido a esto, el estudio de la calcificación cardiovascular a nivel celular y molecular es esencial para tratar de prevenirla, pues actualmente no existe ninguna terapia capaz de revertir o frenar su avance, ni tampoco una forma temprana de detección o evaluación de la susceptibilidad de los individuos en riesgo de desarrollar calcificaciones.

Con el objetivo de buscar biomarcadores no invasivos, se analizaron microRNAs circulantes en pacientes con distintos estadios de ERC mediante técnicas de secuenciación masiva. Esto no dio resultados óptimos aunque confirmó que algunos de los microRNAs más expresados en la circulación proceden de las células sanguíneas. Otra aproximación fue seleccionar microRNAs candidatos por su participación en procesos fibróticos y de diferenciación osteoblástica. Así se observaron niveles alterados de miR-29b y miR-30c en el suero de un modelo animal de insuficiencia renal crónica.



Seguidamente, se comprobó que tanto miR-29b como miR-30c ven sus niveles alterados en cultivos *in vitro* de células de músculo liso vascular sometidas a un estímulo calcificante consistente en concentraciones elevadas de calcio y fosfato. Además, la adición del compuesto análogo de la mitramicina EC-8042 a estos cultivos fue capaz de prevenir el cambio fenotípico inducido por las condiciones calcificantes, probablemente a través de la regulación de los niveles de expresión de miR-29b y miR-30c, sin afectar a la formación de depósitos minerales sobre las células.

Por otro lado, se estudiaron diversos mecanismos moleculares implicados en la calcificación de la válvula aórtica, cuya extensión se cuantificó mediante el uso de variables propias de histomorfometría ósea derivadas de microtomografía computarizada. Así se corroboró que estas medidas se correlacionan con los cambios producidos en el tejido valvular de pacientes sometidos a reemplazo quirúrgico. Gracias a ello se pudo determinar que, al igual que se ha descrito para la calcificación de la túnica íntima arterial, la producción de exosomas por parte de los macrófagos podría estar dirigiendo el proceso. También se observó que los pacientes con válvula calcificada tienen una mayor cantidad de este tipo de vesículas en la circulación que pacientes con válvula sin calcio.

Por último, se pudo determinar que dos polimorfismos del gen *MMP1*, que codifica la metaloproteasa de matriz extracelular 1, se asocian con la extensión de la calcificación en los velos de la válvula aórtica. Se estudió también este tipo de asociación para sendos polimorfismos hallados en estudios genéticos a gran escala en el contexto de la calcificación valvular, relacionados con los genes *LPA*, que codifica la lipoproteína aterogénica lipoproteína(a), y *PALMD*, que codifica una proteína de función aún desconocida. Aunque ninguno de los dos se asoció con la extensión de la calcificación en la válvula aórtica, el polimorfismo de *LPA* lo hizo con la calcificación arterial en pacientes con ERC.

Como conclusión, microRNAs circulantes y polimorfismos de *LPA* y *MMP1* podrían servir como biomarcadores o predictores de la susceptibilidad de calcificación de arterias y válvulas. Los exosomas implicados en su fisiopatología podrían también predecir calcificación en la válvula una vez que son liberados a la circulación. Por otra parte, el compuesto EC-8042 es, asimismo, un buen candidato para desarrollar una terapia dirigida a prevenir la calcificación vascular al ser capaz de modular los niveles de microRNAs alterados durante la ERC.



RESUMEN (en inglés)

Chronic kidney disease (CKD) is a major public health problem in the ageing population of developed countries, with 10% of the adult population in Spain manifesting some decline in kidney function. The loss of renal function impacts other organs, thus favouring calcium deposition in the cardiovascular system. Vascular and valvular calcification are not produced by simple deposition of minerals: several mechanisms take part and, despite several distinctions, both converge in processes of transdifferentiation of the characteristic tissue cell type into osteoblast-like cells.

Beyond the serious impact that the decrease in excretory capacity has on health, more than half of end stage renal disease patients and many individuals still in the early stages die from cardiovascular causes. Therefore, further study of cardiovascular calcification at the cellular and molecular level is essential for its prevention. There is no current therapy able to reverse or halt its progression, nor is there an early way of detecting or assessing the susceptibility of individuals at risk of developing calcifications.

Circulating microRNAs were analysed in patients with different stages of CKD using massive sequencing techniques in order to search for noninvasive biomarkers. This did not give conclusive results although it indicated that some of the most expressed microRNAs in plasma come from blood cells. Another approach was to select candidate microRNAs for their participation in fibrotic processes and osteoblastic differentiation. Altered levels of miR-29b and miR-30c were thus observed in the serum of an animal model of chronic renal failure.

Subsequently, it was found that levels of both miR-29b and miR-30c were altered in *in vitro* cultures of vascular smooth muscle cells subjected to a calcifying stimulus consisting of high calcium and phosphate concentrations. Moreover, the addition of the mithramycin analogue EC-8042 to these cultures was able to prevent the phenotypic change induced by calcifying conditions, without affecting the formation of mineral deposits on the cells possibly through the regulation of miR-29b and miR-30c expression levels.

Several molecular mechanisms involved in aortic valve calcification were studied. The extent of calcification was quantified using bone histomorphometry variables derived from microcomputed tomography. It was confirmed that these measurements correlated with the changes produced in the valve tissue of patients undergoing surgical replacement. It was also determined that the production of exosomes by macrophages could be directing the process of calcification, as previously described for intimal arterial calcification. Besides, it was observed that patients with a calcified valve had more vesicles of this type in serum than patients without valve calcium deposition.

Lastly, it was determined that two polymorphisms of the *MMP1* gene, which codes for matrix metalloproteinase 1, are associated with the extent of calcification in aortic valve cusps. A similar association was also studied for two polymorphisms found in large-scale genetic studies carried in the context of valvular calcification. These were related to *LPA* and



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

PALMD (palmdelphin) genes, which code for atherogenic lipoprotein(a) and a protein whose function is still unknown, respectively. Although neither polymorphism was associated with the extent of calcification in the aortic valve, the *LPA* polymorphism associated with arterial calcification in CKD patients.

In conclusion, circulating microRNAs and *LPA* and *MMP1* polymorphisms could serve as biomarkers or predictors of susceptibility to the calcification of valves and vessels. Once released into the bloodstream, exosomes involved in the pathophysiology of aortic valve calcification could also be used to predict it. EC-8042 may also be a good candidate for the development of a therapy aimed at preventing vascular calcification for its ability to modulate the levels of microRNAs altered during CKD.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

No puedo dejar de mencionar a una serie de personas sin las que nunca hubiese podido llegar hasta aquí:

A mis directores, los Dres. Jorge Cannata e Isabel Rodríguez, por permitirme llevar a cabo esta iniciación en la investigación. A Isabel, además, por haberme propuesto ideas y haber respondido siempre a mis dudas científicas.

A todos los miembros del laboratorio de la Unidad de Gestión Clínica Metabolismo Óseo: los Dres. Adriana Dusso, Cristina Alonso, José Luis Fernández, Manuel Naves, Natalia Carrillo, Pablo Román y Sara Panizo; y a los que, al igual que yo, aspiran a serlo: Beatriz Martín, Julia Martín, Laura Martínez y Sara Barrio.

Al Área del Corazón del HUCA, y sobre todo a la Dra. María Martín y a Sheila Areces, por su implicación en la recopilación de muestras y datos de pacientes.

A la Dra. Aurora Astudillo, por sus improvisadas lecciones magistrales de Histología, así como al resto del Biobanco del Principado de Asturias, en especial a Aitana Vallina y Daniela Corte, sin quienes hubiese sido imposible recopilar y procesar las muestras de pacientes con valvulopatías.

A las Dras. Ana Barral y Noelia Martín, por abrir camino con sus Tesis Doctorales.

A los Dres. Ana Suárez y Javier Rodríguez, del Área de Inmunología de la Universidad de Oviedo, por estar siempre dispuestos a colaborar.

A los investigadores implicados en el proyecto NEFRONA.

A la Dra. Catherine Shanahan y todos los miembros de su laboratorio en el King's College de Londres, por haberme brindado la oportunidad de pasar unos meses en un grupo de tan reconocido prestigio. A Robert Hayward por sus impagables consejos prácticos.

A mis padres.

Que la ciencia más que ninguna de las otras actividades de la humanidad ha modificado la vida del hombre sobre la tierra es tenido por verdad indubitable. Que la ciencia es una palanca liberadora de las infinitas alienaciones que le impiden adecuar su existencia concreta a su esencia libre, tampoco es dudado por nadie [...].

A partir de estas sencillas premisas puede deducirse la necesidad de establecer en cada hormiguero humano un a modo de reloj en movimiento incesante o de mecanismo indefinidamente perfectible dentro de cuyos engranajes, el esfuerzo de cada uno de aquellos varones meritorios vaya encasillado de modo armonioso para que —como consecuencia de todos deseada— se logre un máximo de rendimiento y de disfrute.

Luis Martín-Santos, *Tiempo de silencio*.

Índice

Abreviaturas	V
Lista de figuras.....	VII
Lista de tablas.....	XI
1. Introducción	1
1.1. Enfermedad renal crónica	3
1.1.1. Prevalencia.....	4
1.1.2. Causas	4
1.1.3. Clasificación	4
1.1.4. Fisiopatología.....	5
1.1.5. Complicaciones.....	6
1.2. Calcificación cardiovascular.....	7
1.2.1. Calcificación vascular	8
1.2.1.1. Calcificación de la íntima	8
1.2.1.2. Calcificación de la media.....	10
1.2.1.4. Enfermedad renal crónica y calcificación vascular.....	12
1.2.2. Calcificación valvular	13
1.2.2.1. Estenosis aórtica por calcificación	13
1.2.2.1.1. Causas de la estenosis aórtica	13
1.2.2.1.2. Estructura de las válvulas aórticas normales y patológicas	14
1.2.2.1.3. Fisiopatología	15
1.2.2.2. Enfermedad renal crónica y estenosis aórtica	18
1.3. Estudios genéticos en la enfermedad renal crónica y la calcificación cardiovascular.....	19
1.4. MicroRNAs en la enfermedad renal crónica y la calcificación cardiovascular.....	20
1.5. Tratamiento de la calcificación cardiovascular.....	21
2. Hipótesis y objetivos	23
3. Pacientes y métodos	27
3.1. Pacientes y recogida de muestras	29
3.1.1. Pacientes con enfermedad renal crónica.....	29
3.1.2. Pacientes con valvulopatía aórtica.....	30
3.2. Modelo animal de insuficiencia renal crónica	32
3.3. Cultivo celular y modelo <i>in vitro</i> de calcificación vascular	32

3.4. Análisis de los depósitos de calcio	33
3.4.1. Tinción de Rojo Alizarina	33
3.4.2. Cuantificación del calcio depositado sobre monocapas celulares.....	34
3.4.3. Cuantificación del contenido en calcio de los velos valvulares	35
3.5. Tinciones histológicas.....	36
3.5.1. Tinción de hematoxilina y eosina	36
3.5.2. Tinción de orceína	36
3.6. Inmunohistoquímicas.....	36
3.7. Cuantificación de los niveles de apoptosis.....	38
3.8. Cuantificación de exosomas circulantes	39
3.9. Análisis de la expresión de genes y microRNAs	39
3.9.1. Extracción de microRNAs circulantes	39
3.9.2. Secuenciación masiva de microRNAs	39
3.9.3. Extracción de RNA total.....	40
3.9.4. Retrotranscripción y PCR cuantitativa	40
3.10. <i>Western Blot</i>	41
3.11. Genotipado.....	42
3.11.1. Genotipado por PCR-RFLP	42
3.11.2. Genotipado por PCR cuantitativa	42
3.11.3. Genotipado masivo	43
3.12. Análisis estadístico	44
4. Resultados y discusión.....	45
4.1. La secuenciación de microRNAs circulantes en plasma de pacientes con enfermedad renal crónica no dio resultados óptimos	47
4.2. Los niveles circulantes de miR-29b y miR-30c se encuentran desregulados en un modelo animal de insuficiencia renal crónica	50
4.3. El compuesto EC-8042 atenúa el cambio osteogénico en un modelo <i>in vitro</i> de calcificación vascular, posiblemente a través de la regulación de microRNAs	52
4.3.1. EC-8042 a la concentración 100 nM inhibe la transcripción de genes diana de SP1 sin modificar los niveles de RNA mensajero y proteína del mismo, así como sin provocar muerte celular por apoptosis, en células de músculo liso vascular	52
4.3.1.2. EC-8042 100 nM no provoca un aumento de la muerte celular por apoptosis.....	52
4.3.1.1. EC-8042 100 nM bloquea la transcripción de COL1A1 sin alterar la de SP1.....	55
4.3.1.2. EC-8042 100 nM no altera los niveles proteicos de SP1.....	57

4.3.2. EC-8042 es capaz de prevenir los cambios en los niveles de expresión de RUNX2 y TGF-β3 de las VSMCs en condiciones calcificantes, probablemente a través de la regulación de miRNAs osteogénicos en lugar de dianas de SP1	58
4.4. La calcificación de las válvulas aórticas podría estar dirigida por exosomas producidos por los macrófagos, viéndose además la cantidad de estas vesículas incrementada en la circulación de los pacientes con calcio en sus velos	66
4.4.1. La cuantificación de la extensión de los depósitos minerales presentes en los velos valvulares por medio de parámetros de histomorfometría ósea es indicativa de su grado de degeneración tisular	66
4.4.1.1. Hay una elevada correlación entre BMD y BV/TV en las válvulas a pesar de existir diferencias en la distribución de sus valores	66
4.4.1.2. BV/TV aumenta de manera paralela a la progresión de la degeneración del tejido valvular, mientras que BMD solamente discrimina las válvulas más calcificadas del resto	68
4.4.2. Proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica, neovascularización, inflamación y presencia de exosomas están presentes en las regiones próximas a los depósitos de calcio de los velos valvulares	71
4.4.3. Los niveles de expresión de BMP2 en el tejido valvular no se correlacionaron con la calcificación de los velos, pero sí con los niveles de expresión de MGP	74
4.4.4. El área ocupada por los macrófagos en los velos valvulares se asocia con la extensión de la calcificación	76
4.4.5. La cantidad de exosomas circulantes en el suero de los pacientes con valvulopatía aórtica se asocia con la presencia de depósitos de calcio en sus válvulas	77
4.5. Polimorfismos de los genes <i>MMP1</i> y <i>LPA</i> se asocian con la calcificación de la válvula aórtica y de la túnica íntima de las arterias	80
4.5.1. Los polimorfismos -1607 y -519 de <i>MMP1</i> se asocian con la extensión de la calcificación valvular	80
4.5.2. El polimorfismo rs10455872 del gen <i>LPA</i> no se asocia con la extensión de la calcificación valvular, pero sí con la presencia de calcificación aterosclerótica en pacientes con enfermedad renal crónica	84
4.5.2.1. El polimorfismo rs10455872 no se asocia con las medidas valvulares de BMD y BV/TV	84
4.5.2.2. El polimorfismo rs10455872 se asocia con la presencia de calcificación en las arterias carótida y femoral de pacientes con enfermedad renal crónica	86
4.5.3. El polimorfismo rs6702619 del gen <i>PALMD</i> no se asocia con la extensión de la calcificación de la válvula aórtica	88
5. Conclusiones	91
6. Referencias	95
7. Publicaciones	111

Abreviaturas

ACR	<i>Albumin-to-creatinin ratio</i> , cociente albúmina/creatinina
BMD	<i>Bone mineral density</i> , densidad mineral ósea
BV/TV	<i>Bone volume/tissue volume</i> , volumen óseo/volumen total
CAVD	<i>Calcific aortic valve disease</i> , enfermedad de la válvula aórtica calcificada
ERC	Enfermedad renal crónica
GFR	<i>Glomerular filtration rate</i> , tasa de filtrado glomerular
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> , estudio de asociación del genoma completo
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
IRC	Insuficiencia renal crónica
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> , lipoproteína de baja densidad
Lp(a)	Lipoproteína(a)
MAF	<i>Minor allele frequency</i> , frecuencia del alelo minoritario
microCT	<i>Microcomputed tomography</i> , microtomografía computarizada
miRNA	MicroRNA
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> , metaloproteasa de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
oxLDL	LDL oxidado
oxPL	<i>Oxidised phospholipid</i> , fosfolípido oxidado
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de nucleótido único
VEC	<i>Valvular endothelial cell</i> , célula endotelial valvular
VIC	<i>Valvular interstitial cell</i> , célula intersticial valvular
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i> , célula de músculo liso vascular

Lista de figuras

Figura 1.	Tipos de calcificaciones que pueden tener lugar en el organismo.	Página 7
Figura 2.	Estructura de la pared arterial sana.	Página 8
Figura 3.	Procesos patológicos característicos de las primeras fases de la aterosclerosis.	Página 9
Figura 4.	Causas de la estenosis de la válvula aórtica.	Página 14
Figura 5.	Estructura de los velos valvulares aórticos sanos.	Página 15
Figura 6.	Procesos patológicos que tienen lugar durante el transcurso de la enfermedad de la válvula aórtica calcificada.	Página 16
Figura 7.	Velos valvulares procedentes de válvulas aórticas reemplazadas quirúrgicamente.	Página 32
Figura 8.	Estructura química del compuesto EC-8042.	Página 33
Figura 9.	Comprobación de la capacidad del medio CaP para inducir la formación de depósitos de calcio sobre las células mediante tinción de Rojo Alizarina.	Página 34
Figura 10.	Imágenes de los depósitos minerales obtenidas tras el análisis mediante microtomografía computarizada (microCT) de los velos valvulares aórticos.	Página 35
Figura 11.	Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas realizadas en los controles positivos con las que se determinaron las condiciones adecuadas para cada anticuerpo.	Página 38
Figura 12.	Patrones de bandas resultantes de la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR y digeridos con enzimas de restricción para cada genotipo de los tres polimorfismos estudiados.	Página 43
Figura 13.	Expresión de miR-29b y miR-30c en el suero de ratas con insuficiencia renal crónica con respecto a un grupo <i>Sham</i> .	Página 50
Figura 14.	Aspecto al microscopio de las células A7r5 cultivadas con diferentes concentraciones de EC-8042 y mitramicina, así como con volúmenes equivalentes de vehículo.	Página 53
Figura 15.	Efecto de EC-8042 y mitramicina a diferentes concentraciones sobre la muerte por apoptosis de las células A7r5.	Página 54
Figura 16.	Tamaño y complejidad interna de las células A7r5 cultivadas con los diferentes tratamientos a la concentración 100 nM.	Página 54
Figura 17.	Efecto de EC-8042 y mitramicina a diferentes concentraciones sobre la expresión de SP1 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5.	Página 55
Figura 18.	Efecto de EC-8042 y mitramicina a diferentes concentraciones sobre la expresión de COL1A1 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5.	Página 56

Figura 19.	Efecto de EC-8042 a diferentes concentraciones sobre los niveles proteicos de SP1 en las células A7r5.	Página 58
Figura 20.	Morfología al microscopio de las células A7r5 cultivadas con las diferentes condiciones aplicadas al modelo de calcificación.	Página 59
Figura 21.	Efecto del compuesto EC-8042 en la cantidad de calcio depositado sobre las células A7r5 cultivadas con medio calcificante.	Página 60
Figura 22.	Efecto de EC-8042 sobre la expresión de promotores de la diferenciación osteoblástica medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante.	Página 61
Figura 23.	Efecto de EC-8042 sobre la expresión de inhibidores de la diferenciación osteoblástica medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante.	Página 61
Figura 24.	Efecto de EC-8042 sobre la expresión del marcador de VSMCs ACTA2 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante.	Página 62
Figura 25.	Efecto de EC-8042 sobre la expresión de SP1 y su diana COL1A1 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante.	Página 63
Figura 26.	Efecto de EC-8042 sobre la expresión de miR-29b y miR-30c medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante.	Página 64
Figura 27.	Posición de los sitios consenso de unión del factor de transcripción SP1 en los promotores de los genes <i>Mir29b1</i> , <i>Mir29b2</i> (en los cromosomas 1 y 13) y <i>Mir30c1</i> de <i>Rattus norvegicus</i> .	Página 65
Figura 28.	Ajuste a la distribución normal estándar de los valores registrados para BMD y BV/TV de los velos valvulares aórticos.	Página 67
Figura 29.	Correlación entre las variables BMD y BV/TV.	Página 68
Figura 30.	Estado de la matriz extracelular de cuatro válvulas aórticas correspondientes a cada estadio de la escala de Warren y Yong.	Página 69
Figura 31.	Valores de BMD y BV/TV según el grado de degeneración del tejido valvular evaluado mediante la escala de Warren y Yong.	Página 70
Figura 32.	Valores de BMD para los dos grados de degeneración del tejido según los estadios de Warren y Yong agrupados.	Página 70
Figura 33.	Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de proteínas implicadas en la enfermedad de la válvula aórtica calcificada.	Página 73
Figura 34.	Correlación de los niveles de expresión de BMP2 y MGP en el tejido valvular con las variables BMD y BV/TV.	Página 75
Figura 35.	Correlación entre los niveles de expresión de BMP2 y MGP en el tejido valvular.	Página 75

Figura 36.	Relación entre el área con tinción positiva para CD68 y el grado de degeneración del tejido valvular evaluado mediante la escala de Warren y Yong.	Página 76
Figura 37.	Correlación del área con tinción positiva para CD68 con BMD y BV/TV en el tejido valvular.	Página 77
Figura 38.	Diferencias entre la medición de la fluorescencia generada por las <i>beads</i> en muestras de plasma y suero procedentes de un mismo individuo.	Página 78
Figura 39.	Cantidad de exosomas presentes en el suero de pacientes con valvulopatía aórtica en función de la presencia de depósitos de calcio en sus velos y de la severidad de su estenosis.	Página 79
Figura 40.	Valores de BMD y BV/TV para cada genotipo de los polimorfismos -1607, -519 y -340 de <i>MMP1</i> .	Página 80
Figura 41.	Valores de BMD y BV/TV para los genotipos de los polimorfismos -1607, -519 y -340 de <i>MMP1</i> según un modelo de herencia recesiva.	Página 81
Figura 42.	Valores de BMD y BV/TV para cada genotipo del polimorfismo rs10455872 de <i>LPA</i> .	Página 85
Figura 43.	Valores de BMD y BV/TV para cada genotipo del polimorfismo rs6702619 de <i>PALMD</i> .	Página 89

Lista de tablas

Tabla 1.	Clasificación de los pacientes con enfermedad renal crónica atendiendo al riesgo de progresión hacia la fase terminal de la enfermedad según categoría de tasa de filtrado glomerular y albuminuria.	Página 5
Tabla 2.	Características demográficas y clínicas de la población del estudio NEFRONA.	Página 29
Tabla 3.	Grado de severidad de la estenosis valvular aórtica de acuerdo con parámetros ecocardiográficos.	Página 30
Tabla 4.	Características demográficas y clínicas de la primera población de pacientes con valvulopatía aórtica.	Página 31
Tabla 5.	Características demográficas y clínicas de la segunda población de pacientes con valvulopatía aórtica.	Página 31
Tabla 6.	Parámetros bioquímicos de las ratas cuyos sueros fueron utilizados en este trabajo.	Página 32
Tabla 7.	Anticuerpos y condiciones utilizados en las inmunohistoquímicas.	Página 37
Tabla 8.	Sondas <i>TaqMan</i> utilizadas en la PCR cuantitativa.	Página 41
Tabla 9.	Anticuerpos utilizados en el <i>Western Blot</i> .	Página 42
Tabla 10.	Parejas de oligonucleótidos usadas en las PCRs para el estudio de los polimorfismos.	Página 43
Tabla 11.	Sondas <i>TaqMan</i> utilizadas en el genotipado por PCR cuantitativa.	Página 43
Tabla 12.	MicroRNAs que produjeron un mayor número de lecturas en cada muestra analizada mediante secuenciación masiva.	Página 48
Tabla 13.	Frecuencias genotípicas según el diagnóstico clínico de valvulopatía para los polimorfismos -1607, -519 y -340 de <i>MMP1</i> en individuos con válvulas tricúspides.	Página 83
Tabla 14.	Frecuencia del alelo minoritario de los polimorfismos -1607, -519 y -340 de <i>MMP1</i> en pacientes con valvulopatías y otras dos poblaciones europeas.	Página 83
Tabla 15.	Frecuencias genotípicas según el diagnóstico clínico de valvulopatía para el polimorfismo rs10455872 de <i>LPA</i> en individuos con válvulas tricúspides.	Página 85
Tabla 16.	Frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs10455872 de <i>LPA</i> en individuos con valvulopatías y en otras dos poblaciones europeas.	Página 86
Tabla 17.	Frecuencias genotípicas para el polimorfismo rs10455872 de <i>LPA</i> en la población NEFRONA según la presencia de calcificación en las arterias carótida y femoral al inicio del estudio.	Página 87

Tabla 18.	Frecuencias genotípicas para el polimorfismo rs10455872 de <i>LPA</i> en la población NEFRONA según la presencia de calcificación en las arterias carótida y femoral a los 24 meses del inicio del estudio.	Página 87
Tabla 19.	Frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs10455872 de <i>LPA</i> en el estudio NEFRONA y en otras dos poblaciones europeas.	Página 88
Tabla 20.	Frecuencias genotípicas según el diagnóstico clínico de valvulopatía para el polimorfismo rs6702619 de <i>PALMD</i> en individuos con válvulas tricúspides.	Página 89
Tabla 21.	Frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs6702619 de <i>PALMD</i> en individuos con valvulopatías y en otras dos poblaciones europeas.	Página 89

1. Introducción

El modo de vida y los avances sanitarios característicos de los siglos xx y xxi han repercutido sobre los motivos por los que enfermamos. Debido a ello, en la actualidad las enfermedades de naturaleza no transmisible suponen la principal causa de mortalidad a nivel global. En España, estas supusieron un 92,8% de las muertes producidas en 2016, frente al 3,6% debido a accidentes y el 3,5% debido a enfermedades transmisibles [1]. Aunque en los países en vías de desarrollo provocan un importante número de muertes prematuras, en países desarrollados como España la mortalidad como consecuencia de enfermedades no transmisibles es más frecuente en los grupos de edad más avanzada. De hecho, el envejecimiento de nuestra población es uno de los factores que favorecen su elevada prevalencia [1].

1.1. Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) se produce por alteraciones de la estructura y función de los riñones que cursan durante más de tres meses y llevan a una pérdida progresiva e irreversible de la función renal con implicaciones para la salud [2]. Se han propuesto una serie de criterios para ayudar a discernir la ERC de otras afecciones renales como el daño renal agudo [2]:

- *Duración mayor de 3 meses*, incidiendo así en la cronicidad de la enfermedad y la necesidad de su seguimiento a lo largo del tiempo. Además, esta suele ser de carácter irreversible, desarrollándose sus causas durante toda la vida de los individuos que la padecen y, por tanto, enfocándose sus tratamientos en ralentizar la progresión hacia el fallo renal terminal.
- *Disminución de la tasa de filtrado glomerular (GFR, glomerular filtration rate)*, una medida de la capacidad excretora de los riñones o función renal que se define como el volumen de fluido filtrado por el riñón por unidad de tiempo ajustado a la superficie corporal. Una GFR menor de 60 mL/min/1,73 m² mantenida durante tres meses se considera indicativa de ERC. La GFR normal para hombres y mujeres adultos jóvenes es aproximadamente 125 mL/min/1,73 m².
- *Existencia de daño renal*, del cual un buen indicador es la presencia de proteínas en la orina (proteinuria) y, más concretamente, la presencia de albúmina (albuminuria). Efectivamente, la albúmina es el principal componente proteico de la orina de los pacientes con ERC. Asimismo, la asociación de la albuminuria con el riesgo de padecer una enfermedad renal o cardiovascular ha sido demostrada por estudios recientes [3-6]. Una tasa de excreción urinaria de albúmina igual o superior a 30 mg/24 horas mantenida durante tres meses se considera indicativa de ERC (equivalente a un cociente albúmina/creatinina [ACR, *albumin-to-creatinin ratio*] en una muestra aleatoria de orina mayor o igual a 30 mg/g o 3 mg/mol).

La ERC es un ejemplo de enfermedad no transmisible cuyo estudio es de gran relevancia, pues supone una notable carga para los sistemas sanitarios, derivada no sólo de su propia fisiopatología, sino también de las importantes complicaciones cardiovasculares que produce.

Introducción

1.1.1. Prevalencia

Se ha estimado que la prevalencia mundial de la ERC es de un 10,6% [7]. Según datos del año 2010, en España la ERC afecta a un 4,0% de la población adulta (20 a 74 años), aunque si se consideran también los individuos con algún grado de disminución en su función renal, el porcentaje asciende al 9,8% [8]. Es importante destacar también que la prevalencia varía de forma notable por grupos de edad, llegando hasta el 20% en los mayores de 65 años [8].

Además, el número de personas que padecen la enfermedad se encuentra en aumento y cada vez son más las muertes que tienen lugar como consecuencia de la ERC. De hecho, y según datos del estudio *Global Burden of Disease* de 2010 [9], la ERC estaba en el puesto número 27 de la lista de causas del número total de muertes a nivel global en 1990 y escaló hasta el puesto 18 en 2010, siendo esta tendencia al alza solamente superada por el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

1.1.2. Causas

La principal causa del aumento en la prevalencia de la ERC es el creciente número de enfermos de diabetes tipo 2 en los últimos años, la cual se ha estimado que en 2030 afectará a un 69% más de adultos en países en vías de desarrollo y a un 20% más en países desarrollados que en 2010 [10]. A esta le sigue el notable incremento en la prevalencia de hipertensión arterial que ha tenido lugar en las tres últimas décadas, atribuido al envejecimiento de la población [11]. Como consecuencia de esto, durante los años 90, un 20% de los casos de insuficiencia renal terminal producidos en España ya lo fueron a causa de la diabetes y un 15% a causa de la enfermedad vascular renal asociada a hipertensión arterial, quedando en tercera posición la glomerulonefritis como causante de un 14% de los casos [12]. La glomerulonefritis posinfecciosa, que puede producirse tras haber padecido una infección bacteriana, frecuentemente causada por *Streptococcus pyogenes*, llegó a suponer la principal causa de ERC en el pasado, aunque en la actualidad los avances en el conocimiento y manejo de la misma han disminuido su importancia como generadora de ERC [13].

1.1.3. Clasificación

Hasta llegar al fallo renal terminal, los pacientes irán sufriendo una progresiva disminución de la función de sus riñones. Aunque no necesiten de una terapia sustitutiva, el deterioro de su función renal puede provocar importantes complicaciones. Con el objeto de llegar a un mejor manejo clínico de estos pacientes, se ha propuesto una forma de clasificarlos según la gravedad de la ERC.

A la clásica clasificación de los pacientes en estadios basada en el uso de la GFR, las actuales guías de práctica clínica de la organización *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) han añadido la albuminuria según el ACR, creando así una tabla que clasifica a los pacientes según su riesgo de progresión de la ERC utilizando ambas variables [2] (Tabla 1).

La importancia de la clasificación de los pacientes con ERC en categorías basadas en GFR y albuminuria según ACR, así como la asignación de niveles de riesgo a la mismas, queda reflejada en la

capacidad de ambas medidas para predecir de manera independiente el riesgo de mortalidad por cualquier causa en la población general [14]. Sin embargo, a la hora de predecir si un individuo desarrollará la enfermedad, estos indicadores son tardíos, por lo cual es de gran relevancia la búsqueda de nuevos biomarcadores.

Tabla 1. Clasificación de los pacientes con enfermedad renal crónica atendiendo al riesgo de progresión hacia la fase terminal de la enfermedad según categoría de tasa de filtrado glomerular y albuminuria.

				Categorías de albuminuria según ACR		
				A1	A2	A3
				Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Severamente elevada
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	> 300 mg/g > 30 mg/mmol
Categorías de GFR (mL/min/1,73 m ²)	G1	Normal o elevado	≥ 90			
	G2	Ligeramente reducido	60-89			
	G3a	Ligera a moderadamente reducido	45-59			
	G3b	Moderada a severamente reducido	30-44			
	G4	Severamente reducido	15-29			
	G5	Fallo renal terminal	<15			

El color verde representa un riesgo bajo; el amarillo, moderadamente elevado; el naranja, elevado; y el rojo, muy alto. Adaptado de [2]. ACR: ratio albúmina/creatinina, GFR: tasa de filtrado glomerular.

1.1.4. Fisiopatología

La pérdida de función de los riñones se produce por un conjunto de diferentes mecanismos. Las nefronas, unidades estructurales y funcionales básicas del riñón, no se regeneran tras su formación en las etapas embrionarias, por lo que su pérdida como consecuencia de la edad o de algún tipo de daño genera importantes cambios. La pérdida de capacidad de filtrado será inicialmente compensada mediante la hiperfiltración de los glomérulos restantes y la hipertrofia de las nefronas. Si esta situación se mantiene, acabará por agravar el daño renal produciendo proteinuria y pérdida de podocitos, las células que mantienen la barrera de filtración glomerular. Además, la pérdida de nefronas también implica la activación de mecanismos de respuesta al daño

Introducción

como la fibrosis intersticial que traerá como consecuencia, entre otras, la pérdida de más nefronas mediante isquemia renal [15].

Independientemente de cuál sea el causante de la ERC, la fibrosis renal supone un proceso de gran importancia en la progresión de la enfermedad hacia el fallo renal terminal [16]. Aunque los cambios a escala celular que conducen a la fibrosis renal son muy diversos (activación de fibroblastos y células mesangiales, transición epitelio-mesénquima tubular, infiltración de células inmunes y apoptosis), en todos los tipos de ERC tiene lugar la sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), según se ha demostrado tanto en modelos animales como en pacientes [16]. Por otro lado, destaca el papel de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) en la acumulación y degradación defectuosa de los componentes de la matriz en el riñón durante el transcurso del proceso fibrótico. Aparte de una desregulación de estas últimas proteínas y sus inhibidores endógenos en el tejido, un gran número de estudios han encontrado niveles elevados de MMP2, MMP8 y MMP9 en el suero y la orina de pacientes con nefropatía diabética [17].

1.1.5. Complicaciones

Aunque la consecuencia más grave de la progresión de la ERC es el fallo renal terminal, que conduce a diálisis o trasplante, los individuos en estadios intermedios también sufren importantes complicaciones que reflejan la pérdida de la capacidad exocrina y endocrina de los riñones, afectando a todos los sistemas de órganos. Entre ellas se encuentran anemia, hipertensión, deficiencia de vitamina D, acidosis metabólica, hiperfosfatemia, hipoalbuminemia o hiperparatiroidismo secundario [2].

Concretamente, las alteraciones del metabolismo óseo y mineral características de la ERC, las cuales incluyen cambios en la homeostasis del calcio y el fosfato, en los niveles circulantes de hormonas como la vitamina D y sus metabolitos o la hormona paratiroidea (PTH), así como en los niveles circulantes del factor de crecimiento fibroblástico-23 (FGF-23), ocurren de forma temprana en el transcurso de la enfermedad y van progresando conforme disminuye la función renal [2]. Estos cambios y las terapias dirigidas a corregirlos son causantes, además, de calcificaciones en todo el aparato cardiovascular [18].

Asimismo, es importante destacar que todos los individuos con ERC se encuentran en riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. La relación entre una función renal disminuida y los eventos cardiovasculares adversos es especialmente clara en los pacientes dializados. Un 50% de los pacientes con ERC en fase terminal mueren por causas cardiovasculares, una mortalidad cardiovascular de 15 a 30 veces mayor que la ajustada por edad en la población general [19]. Las complicaciones cardiovasculares son, por tanto, las que mayor número de muertes producen entre los pacientes con ERC. De hecho, la mayoría de los pacientes en los estadios 3 y 4 mueren por causas cardiovasculares antes de que acaben progresando hacia el fallo renal terminal [19].

La relevancia del vínculo entre la ERC y las enfermedades cardiovasculares es tal que recientemente se ha acuñado el término “síndrome cardio-renal” para englobar a todas las

relaciones existentes entre ambas. Los síndromes cardio-renales fueron definidos por consenso como “afecciones del corazón y los riñones por medio de las cuales una disfunción aguda o crónica de un órgano puede inducir una disfunción aguda o crónica del otro” [20].

1.2. Calcificación cardiovascular

Los procesos biológicos de acumulación de fosfatos de calcio en la matriz extracelular, denominados también biomineralización, son esenciales para la adecuada formación y el correcto funcionamiento de diversos tejidos como los huesos, el cartílago de crecimiento o fisis y los dientes. Existen numerosos mecanismos locales y sistémicos que impiden que los tejidos blandos se mineralicen. Sin embargo, estos procesos también pueden tener lugar en ellos. Es lo que se conoce como calcificación ectópica y se trata de un conjunto de procesos patológicos por los cuales se forma hidroxapatita e incluso proteínas de matriz y células de tipo óseo en diversos tejidos y órganos, siendo la piel, los riñones, los tendones y el aparato cardiovascular especialmente propensos a sufrirlos [21].

Esta Tesis Doctoral se centrará en el estudio de los procesos de calcificación de diferentes partes del aparato cardiovascular (Figura 1), los cuales son objeto de abundantes estudios debido a las graves consecuencias clínicas que producen. De hecho, la presencia de estas calcificaciones puede predecir mortalidad e indicar riesgo cardiovascular [22]. Así, en estudios recientes, la calcificación de las arterias mamarias se ha asociado a un mayor riesgo de eventos asociados a la enfermedad cardiovascular [23] y la presencia de calcio en las arterias del corazón lo ha hecho con la enfermedad coronaria y, junto con la presencia de calcio en la válvula mitral, a la mortalidad cardiovascular y por cualquier causa [24]. La presencia de calcio en las arterias coronarias se ha asociado también con la posibilidad de sufrir un infarto de miocardio si esta tiene lugar en adultos jóvenes [25].

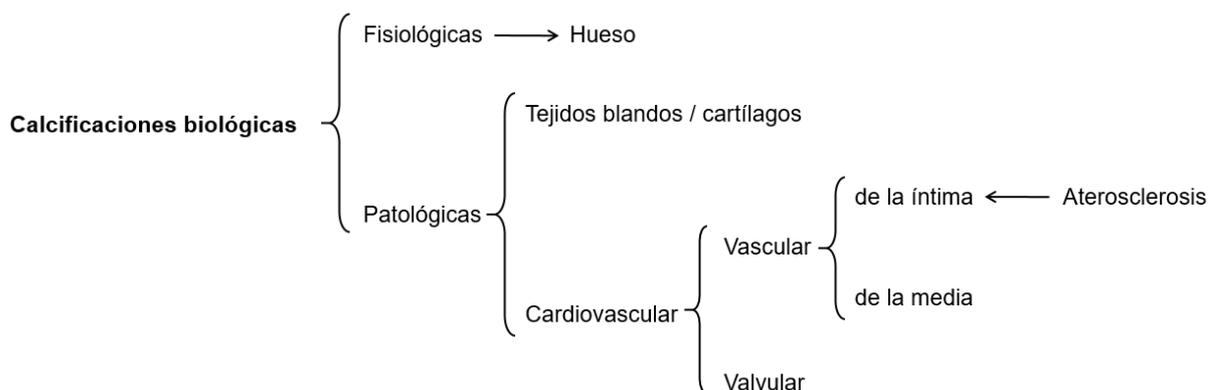


Figura 1. Tipos de calcificaciones que pueden tener lugar en el organismo. Adaptado de [26].

1.2.1. Calcificación vascular

1.2.1.1. Calcificación de la íntima

La calcificación de la íntima es la forma más común de calcificación vascular y se caracteriza por la formación de depósitos de hidroxapatita en las placas de aterosclerosis en estadios avanzados presentes en la túnica íntima de las arterias (Figura 2). La aterosclerosis, proceso patológico mediante el cual se forman estas placas, es la principal causa de enfermedades cardiacas y accidentes cerebrovasculares y, además, es la causa subyacente de alrededor del 50% de las muertes que se producen en las sociedades occidentales [27].

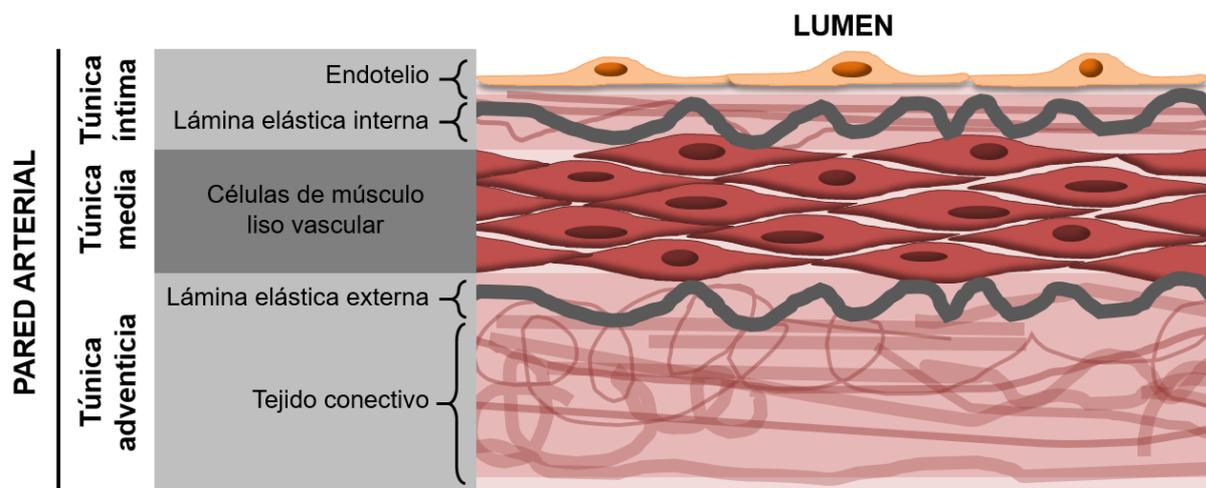


Figura 2. Estructura de la pared arterial sana.

La fisiopatología de la aterosclerosis se caracteriza por el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico regulado por lípidos en las paredes arteriales. Este se inicia en localizaciones del árbol vascular en las cuales se producen alteraciones del flujo laminar de la sangre, como pueden ser recodos o ramificaciones [28]. Las células endoteliales en estas regiones sufren cambios en su expresión génica, dando lugar a lo que se ha denominado fenotipo aterosusceptible [28]. La presencia de un endotelio modificado sumada a alteraciones de tipo estructural de los componentes de la matriz extracelular de la íntima contribuyen a la formación de zonas de mayor permeabilidad en las cuales irán acumulándose lípidos y células inmunitarias [29] (Figura 3).

Concentraciones elevadas de colesterol en la circulación contribuyen al desarrollo de estas lesiones ateroscleróticas. El colesterol es transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) que, ante la presencia de lesiones, pueden unirse a componentes de la matriz extracelular mediante interacciones iónicas [30]. Una vez atrapadas en la íntima, estas lipoproteínas son susceptibles de sufrir procesos oxidativos como consecuencia de ataques enzimáticos o de la presencia de especies reactivas de oxígeno, dando lugar a lo que se conoce como oxLDL [31]. Estos lípidos oxidados activan a las células endoteliales, las cuales expresan moléculas de adhesión y quimioquinas en la superficie arterial que provocan la migración de monocitos y otros tipos de células inmunitarias desde la

circulación a la íntima [31]. Las células endoteliales activadas producen, además, la citoquina factor estimulante de colonias de macrófagos o M-CSF, que estimula a los monocitos para que se diferencien a macrófagos, un proceso necesario en el desarrollo de la aterosclerosis [32]. Seguidamente, los macrófagos sobreexpresan en la íntima sus receptores *scavenger* o carroñeros con los que toman las partículas de oxLDL, acumulándose así en la región subendotelial convertidos en las células espumosas características de las placas de ateroma [31] (Figura 3).

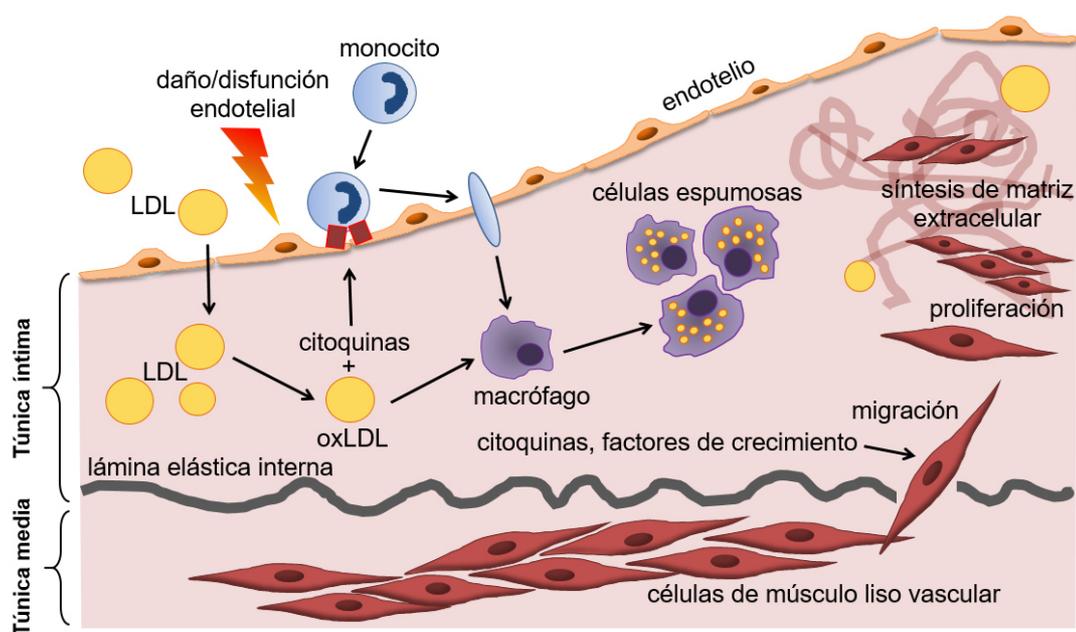


Figura 3. Procesos patológicos característicos de las primeras fases de la aterosclerosis. Adaptado de [33].

Asimismo, se han detectado acúmulos de lipoproteína(a) [Lp(a)] en la íntima arterial [34], lugar donde ejercería sus efectos aterogénicos por medio de la asociación a fosfolípidos oxidados (oxPLs) con características proinflamatorias, moléculas que Lp(a) se encarga de transportar [35]. De hecho, el incremento en los niveles plasmáticos de esta lipoproteína indica de manera robusta la existencia de un riesgo elevado de desarrollar enfermedad cardiovascular, pues se ha asociado con la presencia de enfermedad de las arterias coronarias, especialmente en pacientes con hipercolesterolemia [36-38]. En cuanto a los mecanismos por los que Lp(a) produce estos efectos, al tratarse en esencia de una forma modificada de LDL, su retención en la matriz extracelular de la pared de los vasos podría verse favorecida por su unión a la misma a través de componentes que no están presentes en las LDLs [39]. Además, se ha descrito su capacidad para unirse a proteínas como las defensinas, una familia de péptidos secretados por los neutrófilos durante los procesos inflamatorios [40].

Las placas más avanzadas cuentan con la presencia de células de músculo liso vascular (VSMCs, *vascular smooth muscle cells*) procedentes de la túnica media. La migración y proliferación de estas células está mediada por citoquinas y factores de crecimiento secretados por los macrófagos y otros tipos de células inmunitarias [27]. Las VSMCs presentes en las lesiones ateroscleróticas secretan una matriz extracelular fibrosa que genera placas que aumentan su tamaño y comienzan a ocluir el lumen

Introducción

arterial [27] (Figura 3). En estas placas fibróticas, la apoptosis de macrófagos y VSMCs, provocada por rutas de respuesta al estrés celular inducidas por el daño oxidativo y los lípidos acumulados en ellas, contribuye a la formación de un núcleo necrótico en las mismas [41]. Los cuerpos apoptóticos y las vesículas de matriz liberadas durante la muerte de estos dos tipos celulares sirven como sitios de nucleación para la formación de cristales de fosfato de calcio, la fase temprana de la calcificación de las placas [41]. Adicionalmente, los proteoglicanos secretados por las VSMCs contribuyen a la unión de LDL y Lp(a) a la matriz extracelular [42] (Figura 3).

Por otro lado, mientras que en las arterias sanas tan solo pro-MMP2 y los inhibidores de metaloproteasas TIMP1 y TIMP2 están presentes y no se detecta ninguna actividad metaloproteasa, las placas ateromatosas altamente inflamadas muestran un incremento generalizado en la actividad de estas proteínas [43]. Tanto las células espumosas como las VSMCs sintetizan MMPs, las cuales pueden evitar o favorecer la rotura de las placas y también despegar a las VSMCs de sus membranas basales antes de que se produzca su migración [43]. MMP2 y MMP9 median, además, la calcificación vascular característica de los pacientes con ERC, tal y como se ha demostrado en modelos animales [44, 45], y los niveles de estas y otras MMPs en la circulación se han propuesto como potenciales biomarcadores para el desarrollo de aterosclerosis en estos pacientes [46-48].

La progresión de la calcificación de las placas incluye la aparición en las mismas de células con fenotipo osteogénico, las cuales se ha confirmado que proceden en su mayoría de la transdiferenciación de las VSMCs de la media [49]. Este papel mediador de la calcificación de la transformación osteogénica de las VSMCs ha quedado también recalcado tras demostrarse que el bloqueo de este proceso afecta a la calcificación de las placas ateroscleróticas pero no al metabolismo lipídico, al reclutamiento de monocitos o al tamaño de las lesiones [50]. Moléculas encargadas de iniciar la diferenciación osteoblástica como la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2), o factores de transcripción osteoblásticos como el factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2), MSX2 y Osterix se han asociado a la calcificación aterosclerótica de la íntima, habiéndose descrito también la pérdida de marcadores de músculo liso vascular, por ejemplo actina de músculo liso o transgelina [51]. Los macrófagos juegan un papel importante en este proceso, pues se ha demostrado la colocalización de tales células con la actividad osteogénica en las placas [52]. Los macrófagos no intervienen en la transformación de las VSMCs por medio de un único mecanismo ya que, aparte de liberar de vesículas de matriz con expresión de marcadores exosomales [53], estos producen citoquinas proinflamatorias que también inducen la expresión de genes osteogénicos como RUNX2 y fosfatasa alcalina [41].

1.2.1.2. Calcificación de la media

La calcificación de la media es una forma de calcificación vascular que tiene lugar en la túnica media de las arterias (Figura 2) produciendo rigidez en las mismas y puede desarrollarse en ausencia de depósitos lipídicos o infiltración de células inflamatorias. Puede ocurrir durante el desarrollo de numerosas condiciones clínicas como enfermedades genéticas, envejecimiento, ERC, diabetes mellitus, dislipemia, lupus eritematoso sistémico o hipervitaminosis D [51]. Cuando este tipo de

calcificación se presenta en las arterias de las extremidades, también recibe la denominación de esclerosis de Mönckeberg. Es el tipo más frecuente de calcificación de la media y, aunque se ha estimado que ocurre en un 0,5% de la población adulta, su prevalencia es especialmente alta en pacientes con diabetes tipo 2 (17% en recién diagnosticados; 41,5% en pacientes tomando antidiabéticos orales) o enfermedad renal terminal (27%) [26].

En los estadios iniciales de este tipo de calcificación, las lesiones se observan al microscopio como pequeños depósitos granulares en la túnica media que, en ocasiones, se alinean a lo largo de la membrana elástica interna [54]. En lugar de depositarse en el colágeno tipo I como sucede en el hueso, en las arterias los fosfatos de calcio se depositan en las fibras de elastina. De hecho, se ha demostrado la asociación de daños de diferente naturaleza sufridos por las fibras elásticas y la calcificación de la media [55, 56]. Posteriormente, la banda que forman estos depósitos se ensancha y se convierte en una placa que se extiende hacia la parte interna de la media [54]. Con el tiempo, en la íntima se puede producir hiperplasia subendotelial y las calcificaciones pueden unirse y llegar a presentarse alrededor de la circunferencia completa de los vasos [26]. La fase final del proceso, al igual que en la calcificación aterosclerótica, se caracteriza por la presencia de células osteogénicas, que pueden incluso dar lugar a metaplasias con trabéculas óseas [26].

El proceso de calcificación de la media, al igual que la calcificación aterosclerótica, está orquestado por el cambio de fenotipo de las VSMCs hacia células de tipo osteogénico. Este se ve influenciado por numerosos procesos como, por ejemplo, la deficiencia de inhibidores de la calcificación. La proteína Gla de la matriz (MGP), capaz de inhibir BMP2; la fetuína A, capaz de inhibir la capacidad de las vesículas extracelulares de favorecer la precipitación de fosfatos de calcio; y el pirofosfato, capaz de inhibir la expresión de genes óseos incluso en presencia de concentraciones elevadas de calcio o fosfato, ven disminuidos sus niveles circulantes en la ERC o la diabetes [51]. Además, la senescencia celular y el daño oxidativo producidos durante el envejecimiento modifican la expresión génica de las VSMCs, y las elevadas concentraciones de fósforo características de la uremia hacen que expresen fosfatasa alcalina y RUNX2 [51].

Las VSMCs también generan sitios de nucleación para los fosfatos de calcio, secretando vesículas de matriz (recientemente caracterizadas como exosomas [57]) y cumpliendo el papel ejercido por los macrófagos en la aterosclerosis [58], además de endocitar cristales formados por estas sales, con la consecuente toxicidad. De hecho, la disolución de los cristales internalizados por las células provoca su muerte que, cuando se produce a través de apoptosis, genera cuerpos apoptóticos que también sirven de sitios de nucleación [59]. Asimismo, el DNA liberado tras la muerte celular precipita calcio y fosfato y podría iniciar el proceso de calcificación [60]. Todos estos procesos contribuirán, en definitiva, a la precipitación de hidroxapatita a partir de la disolución metaestable de calcio y fosfatos presente en el ambiente arterial [26].

Merece especial mención la calcifilaxis, un tipo de calcificación de la media que se da en vasos sanguíneos subcutáneos de pequeño tamaño. Suele presentarse en pacientes sometidos a tratamiento renal sustitutivo, por lo que también se la denomina arteriopatía urémica calcificante,

Introducción

aunque, de forma mucho más rara, también puede tener lugar en pacientes con función renal normal. Su incidencia anual es baja, 35 por cada 10.000 pacientes en hemodiálisis en los Estados Unidos, 4 por cada 10.000 en Alemania o menos de 1 cada 10.000 en Japón, pero actualmente se encuentra en alza [61]. Además, se asocia a una elevada morbilidad como consecuencia de las úlceras que provoca y a una alta mortalidad debida a que la infección de las mismas puede desembocar en sepsis.

En cuanto a su fisiopatología, la deficiente inhibición de la precipitación de fosfatos de calcio observada en el suero de pacientes con calcifilaxis indica una falta de inhibidores de la calcificación como causa de la enfermedad. Niveles bajos de MGP, fetuína A o ciertos polimorfismos del gen de la ectonucleótido pirofosfata/fosfodiesterasa 1 (ENPP1) se han visto asociados a la calcifilaxis [61]. Por otro lado, el motivo por el cual se presenta en la microcirculación asociada a grasa subcutánea podría ser la producción de adipocinas capaces de inducir la calcificación de las VSMCs por parte de adipocitos expuestos a niveles elevados de fósforo [62]. De hecho, la calcifilaxis es frecuente entre los pacientes con un síndrome en el cual la adipocina VEGF-A está elevada [63].

1.2.1.4. Enfermedad renal crónica y calcificación vascular

Es un hecho bien conocido que las calcificaciones arteriales se presentan en mayor medida en enfermos con ERC que en otros individuos. Como ya se ha mencionado, la prevalencia de la calcificación de la media es de casi un 30% en pacientes con enfermedad renal terminal [26] y el número de ateromas calcificados y el contenido en calcio de los mismos es más elevado en pacientes con ERC que en la población general [64]. Además, se ha demostrado que los pacientes en diálisis tienen *scores* de calcificación de 2 a 5 veces mayores que sujetos control con la misma edad con función renal normal y enfermedad de las arterias coronarias [65].

Sin embargo, ya que en los enfermos de ERC se pueden presentar de manera simultánea calcificaciones de los dos tipos anteriormente citados, la existencia real de estas dos categorías es materia de debate [66]. Algunos autores sostienen que el origen de las calcificaciones en la íntima y la media es el mismo y que el colesterol es el estímulo iniciador del proceso en cualquier arteria [67]. Se apoyan para ello en estudios en los cuales se observaron depósitos de material lipídico y ateromas en secciones de tejido arterial que solamente presentaban calcificación en la media [68] o en los que no se encontraron distinciones clínicas, de localización anatómica o histológicas entre las lesiones de pacientes con aterosclerosis o con esclerosis de Mönckeberg [69]. La calcificación de los vasos pequeños, en cambio, se produce exclusivamente en la media y otros autores consideran por este y otros motivos que existen dos procesos bien diferenciados de calcificación vascular [70]. Por ejemplo, en un modelo de ERC de conejos a los que se les practicaron nefrectomías subtotales, en ausencia de una dieta rica en colesterol, se observaron calcificaciones en las arterias sin evidencias de depósitos lipídicos incluso tras 8 meses de seguimiento [71]. Además, la distinción entre ambas variantes de la calcificación vascular es importante desde un punto de vista clínico, pues se ha demostrado que en pacientes en hemodiálisis el riesgo de mortalidad es menor en aquellos que tienen calcificación en la media que en los que tienen calcificación en la íntima [72].

1.2.2. Calcificación valvular

Además de en las paredes arteriales, la calcificación ectópica ocurre en otros tejidos blandos. Las válvulas cardíacas son las estructuras encargadas de mantener un flujo de sangre unidireccional entre las diferentes cámaras que componen el corazón, así como entre estas y los vasos que entran y salen de dicho órgano. Existen dos tipos de enfermedades de las válvulas cardíacas: estenosis o estrechamiento de los orificios valvulares e insuficiencias o pérdida de capacidad de las válvulas para impedir el retorno del flujo sanguíneo [73]. Las válvulas situadas en el lado izquierdo del corazón (aórtica y mitral) son más susceptibles a sufrir algún tipo de daño [74], pues soportan mayores presiones. Aunque hay estudios poblacionales que describen una mayor prevalencia de la insuficiencia mitral entre las enfermedades valvulares [75], es la estenosis aórtica la que tiene consecuencias clínicas más importantes [76]. Este último tipo de enfermedad valvular es producido mayoritariamente por un proceso de calcificación que guarda similitud con la calcificación vascular y, especialmente, con la de la íntima [76].

1.2.2.1. Estenosis aórtica por calcificación

La estenosis aórtica por calcificación consiste en un estrechamiento del orificio de la válvula aórtica provocado por un proceso en el que tienen lugar fibrosis y formación de depósitos de fosfatos de calcio en los velos valvulares. Representa el estadio final de la conocida como enfermedad de la válvula aórtica calcificada (CAVD, *calcific aortic valve disease*), la cual se inicia con un endurecimiento de los velos valvulares conocido como esclerosis aórtica y cursa de forma asintomática hasta sus fases más avanzadas, en las cuales la estenosis puede provocar angina de pecho, síncope o fallo cardíaco [77].

La prevalencia de la esclerosis aórtica es elevada entre la población mayor de 65 años de los países desarrollados (se estima en un 25%) mientras que la prevalencia de la estenosis aórtica en este grupo de individuos es un 1,7% y solamente un 0,4% en la población general [76]. Sin embargo, y como consecuencia del progresivo envejecimiento de la población, se estima que el número de pacientes ancianos con estenosis aórtica por calcificación se doblará o triplicará en los próximos 50 años en los países desarrollados [76]. A pesar del importante problema que supone, todavía no existe ningún tratamiento farmacológico que sea capaz de frenar o ralentizar la progresión de la CAVD hacia la estenosis aórtica. Por tanto, la única forma de tratar a los pacientes con estenosis aórtica severa es realizar un reemplazo de la válvula, ya sea por un procedimiento quirúrgico convencional o transcatóter [78]. El reemplazo valvular es el segundo procedimiento más frecuente en la cirugía cardíaca tras el *bypass* aorto-coronario. Cada año se realizan en Estados Unidos entre 65.700 y 70.000 reemplazos valvulares, aunque otras series hablan de 95.000, el doble con respecto a la década pasada [79]. En España, los registros hospitalarios recogen más de 18.000 reemplazos valvulares entre los años 2014 y 2015 [80].

1.2.2.1.1. Causas de la estenosis aórtica

La válvula aórtica cuya anatomía es considerada normal consta de tres velos (tricúspide), pero entre un 0,5% y un 2% de la población presenta válvula con tan solo dos velos (bicúspide), según han

Introducción

estimado varios estudios [81]. La estructura de las válvulas bicúspides es más desfavorable al flujo de sangre, lo cual provoca un desarrollo precoz de la CAVD y estenosis, hasta dos décadas antes que en los individuos con válvulas tricúspides [82]. De hecho, se ha descrito que hasta un 65% de los pacientes sometidos a un reemplazo valvular antes de los 60 años poseen válvulas con esta anatomía [83].

Si bien la producida por calcificación es la forma más común de estenosis aórtica, existen otras maneras por las cuales el diámetro de apertura de la válvula aórtica también se puede ver disminuido (Figura 4). La presencia de ciertas malformaciones, frecuentemente una válvula monocúspide, hace que la válvula aórtica sea estenótica de forma congénita sin necesidad de llegar a calcificarse. Como consecuencia, para estos individuos es prácticamente imposible llegar a la edad adulta de forma asintomática [84]. Además, la fiebre reumática, una enfermedad inflamatoria que resulta de una infección con *S. pyogenes*, también puede provocar una enfermedad valvular aórtica casi siempre acompañada de enfermedad en la válvula mitral. Sin embargo, esta es actualmente una causa rara de estenosis aórtica en los países desarrollados [85].

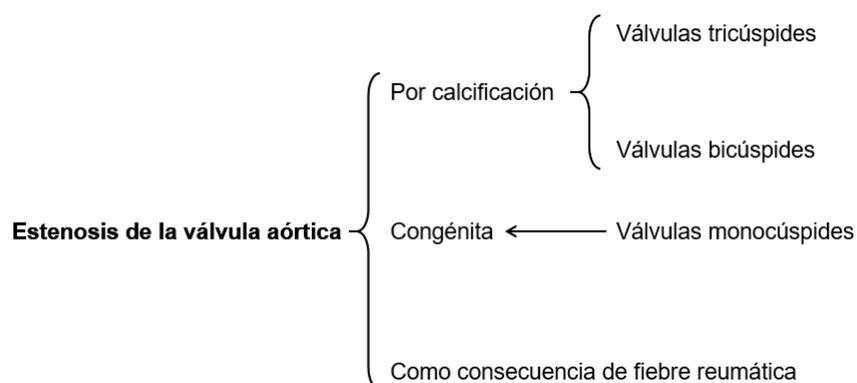


Figura 4. Causas de la estenosis de la válvula aórtica.

1.2.2.1.2. Estructura de las válvulas aórticas normales y patológicas

Las válvulas aórticas están constituidas mayoritariamente por tejido conectivo en forma de una matriz extracelular avascular en la cual pueden diferenciarse histológicamente tres capas (Figura 5): del lado aórtico se encuentra la capa fibrosa, caracterizada por un predominio de fibras colágenas que confieren rigidez a los velos; del lado del ventrículo izquierdo está la capa ventricular, que además de colágeno contiene fibras de elastina con propiedades elásticas; y entre ambas se encuentra la capa esponjosa, rica en glicosaminoglicanos y proteoglicanos que son capaces de comprimirse cuando se aplican fuerzas a los velos [86]. Esta matriz extracelular sustenta células de variada morfología (Figura 5): células endoteliales valvulares (VECs, *valvular endothelial cells*) formando una monocapa en las superficies aórtica y ventricular, una pequeña cantidad de VSMCs hacia la base de la capa ventricular y células intersticiales valvulares (VICs, *valvular interstitial cells*), el tipo celular mayoritario, embebidas en diferentes localizaciones de la matriz que ellas mismas se encargan de secretar [86].

Una buena manera de seguir los cambios que se producen a nivel histológico durante el transcurso de la CAVD es a través de la escala establecida por Warren y Yong, quienes publicaron en 1997 una división del desarrollo de esta enfermedad en estadios basándose en las observaciones de 374 válvulas obtenidas durante cirugías de reemplazo [87]:

- El *grado 1* se corresponde con aquellos casos en los que los velos valvulares mantienen aún la integridad de su estructura histológica sin presencia de calcificación pudiendo, no obstante, presentar cierto engrosamiento fibroso.
- Las válvulas incluidas en el *grado 2* presentan engrosamiento de sus velos valvulares acompañado de la aparición de nódulos calcificados, en los cuales se produce degeneración del tejido conectivo. Aunque la calcificación comienza a deformar la capa fibrosa, el tejido elástico todavía se mantiene intacto.
- En el *grado 3* los velos están ya gravemente engrosados y los nódulos calcificados son abundantes, provocando tanto la deformación de la capa fibrosa como el estiramiento del tejido elástico. Además, puede haber presencia de metaplasias óseas o cartilagosas, cristales de colesterol y neovascularización.
- Finalmente, en el *grado 4* la estructura general de los velos se encuentra notablemente modificada. Todos sus componentes están alterados o incluso destruidos, incluidas la capa fibrosa y el tejido elástico. La presencia de cambios metaplásicos y de neovascularización es frecuente. Este estadio puede subdividirse además en dos, según la superficie de los velos se encuentre (4B) o no (4A) ulcerada.

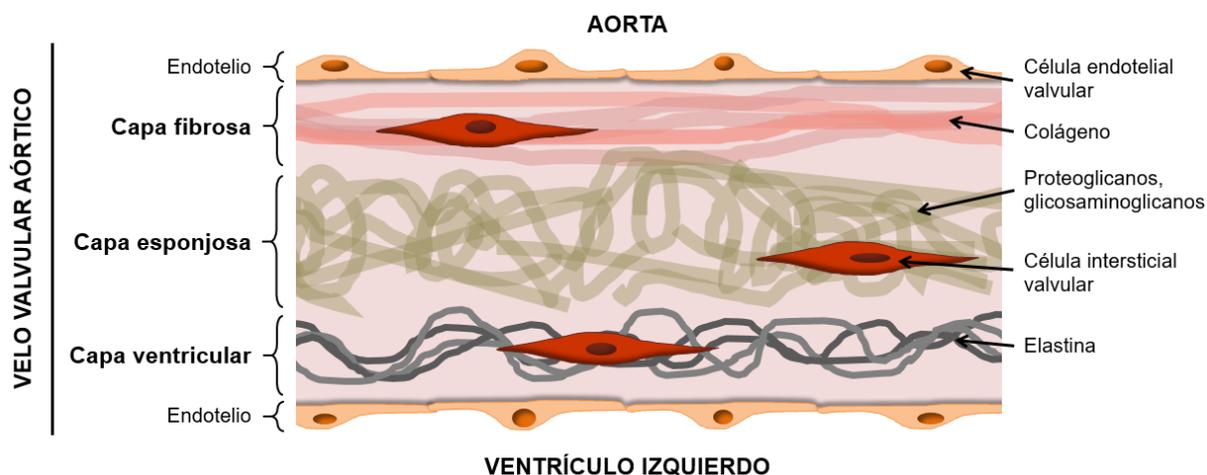


Figura 5. Estructura de los velos valvulares aórticos sanos.

1.2.2.1.3. Fisiopatología

La similitud entre la fisiopatología de la estenosis aórtica por calcificación y la de la aterosclerosis queda patente desde el inicio de ambas patologías, pues la CAVD también se inicia con daños en el endotelio como consecuencia del estrés mecánico producido por el flujo de la sangre

Introducción

[88]. Prueba de ello es la mayor incidencia de calcificación entre los individuos con una válvula bicúspide, peor preparada para soportar las fuerzas mecánicas a las que es sometida.

Un endotelio valvular dañado puede permitir la entrada de lípidos y su acumulación en zonas de inflamación [88] (Figura 6). En efecto, el colesterol LDL y Lp(a) han sido identificados como elementos contribuyentes al desarrollo de la CAVD, pues los niveles plasmáticos elevados de ambas lipoproteínas fueron reconocidos como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad hace más de dos décadas [89]. Se ha demostrado que el oxLDL promueve la mineralización de VICs aisladas en cultivo *in vitro* [90] y, por otro lado, que tanto Lp(a) como otras moléculas relacionadas se localizan en velos de válvulas aórticas estenóticas, aumentando su cantidad conforme lo hacen la degeneración del tejido y la calcificación [91]. Los oxPLs transportados por Lp(a) también juegan un papel importante en la mineralización de las válvulas. De hecho, recientemente se ha verificado la asociación entre los niveles de Lp(a), el avance de la calcificación y la progresión hemodinámica de la CAVD y los niveles de oxPL, dependiendo además la capacidad de la lipoproteína para inducir la diferenciación osteogénica de las VICs de su contenido en oxPL [92].

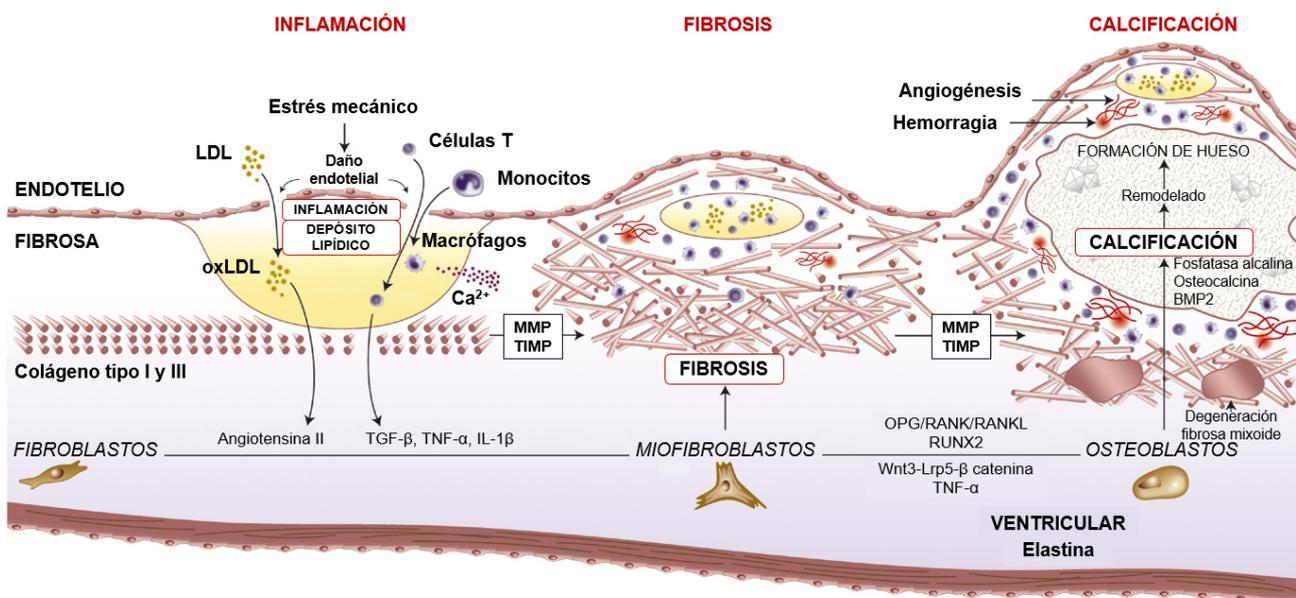


Figura 6. Procesos patológicos que tienen lugar durante el transcurso de la enfermedad de la válvula aórtica calcificada. Reproducido de [88] con permiso de Elsevier.

Los procesos de oxidación lipídica en el ambiente valvular tienen su origen en el desacople de la actividad óxido nítrico sintasa endotelial [93], cuyo incorrecto funcionamiento genera especies reactivas de oxígeno. Conjuntamente, algunos proteoglicanos como el biglicano y la decorina se sobreexpresan durante la estenosis por calcificación [94, 95], promoviendo la retención de lípidos y su modificación enzimática, lo cual produce diversos tipos de compuestos bioactivos [96]. Los lípidos oxidados también contribuyen a la iniciación de un proceso inflamatorio en las válvulas al activar la respuesta inmune innata a través de los receptores tipo Toll y la vía del factor nuclear κB [76].

Gracias a un estudio en el cual Bossé y colaboradores compararon la expresión génica de válvulas aórticas sanas y válvulas con estenosis por calcificación se descubrió que hasta un 15% de los más de 700 genes regulados diferencialmente en la CAVD están relacionados con la inflamación [97]. La presencia de infiltrados inflamatorios en las válvulas, constituidos mayoritariamente por macrófagos (Figura 6), se ha relacionado con la severidad de la estenosis y con rasgos histológicos característicos de la CAVD como metaplasia osteocondrogénica o neovascularización [98]. La producción de diferentes tipos de citoquinas por parte de las células inflamatorias también contribuye a la progresión de este proceso. Así, la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por parte de monocitos y macrófagos activa la respuesta osteogénica a través de la expresión de MSX2, promueve el remodelado de la matriz y desencadena la apoptosis de las VICs [76]. La interleuquina 6 (IL-6), aguas abajo de TNF- α y del factor nuclear κ B, es secretada en grandes cantidades por las VICs cultivadas en condiciones osteogénicas y el bloqueo del gen que la codifica reduce la expresión de BMP2 [99].

En el estudio llevado a cabo por Bossé y colaboradores, el gen que codifica la MMP12 era uno de los más sobreexpresados en válvulas estenóticas con respecto a las normales [97]. Efectivamente, en las válvulas, la inflamación va acompañada de la expresión de MMPs, las cuales, además de participar en el remodelado de la matriz, generan péptidos capaces de promover la calcificación [100] (Figura 6). Se ha encontrado una mayor expresión de MMP1, 2 y 3 en el tejido de las válvulas calcificadas que en el precedente de válvulas normales y una expresión exclusiva de MMP9 en las válvulas enfermas [101]. Concretamente, MMP1 aparece asociada a los infiltrados de leucocitos en las válvulas estenóticas y su expresión se ve incrementada en las VICs en cultivo tras la aplicación de las citoquinas TNF- α e IL1- β [102, 103].

Los niveles elevados de fosfato en la circulación son también un factor de riesgo para la CAVD [104]. De hecho, se ha descrito la sobreexpresión del transportador de fosfato dependiente de sodio PiT-1 en válvulas aórticas calcificadas, así como un incremento de su expresión en cultivos *in vitro* de VICs expuestas a concentraciones elevadas de fosfato y la prevención de la calcificación de estos cultivos tras su silenciamiento [105]. La entrada de fosfatos en la célula mediada por PiT-1 activa la caspasa 3, promoviendo así la calcificación a través de un proceso apoptótico. Las ectonucleotidasas ENPP1 y fosfatasa alcalina también se encuentran sobreexpresadas en el proceso de calcificación que tiene lugar en la CAVD [106]. Estas enzimas generan fosfato inorgánico mediante la hidrólisis de nucleótidos, y una mayor expresión de las mismas provoca que los niveles de fosfato sean más elevados que los de pirofosfato, un inhibidor de la calcificación. Además, las ectonucleotidasas reducen el nivel extracelular de ATP, desencadenando así de otra manera la apoptosis de las VICs [106].

Por último, otro de los puntos clave en la fisiopatología de la CAVD es la diferenciación osteogénica de las células de la válvula (Figura 6). De nuevo el estrés mecánico producido por el flujo sanguíneo podría ser el origen de este proceso, pues se ha demostrado que un esfuerzo cortante oscilatorio es capaz de modular alrededor de 1.000 genes y 30 microRNAs (miRNAs) en cultivos *in*

Introducción

vitro de VECs [107]. Probablemente como consecuencia de esto, el endotelio valvular en la cara aórtica de los velos expresa menos genes antiosteogénicos que el situado en la cara ventricular [108], fenómeno que además concuerda con la ocurrencia más frecuente de fibrosis y calcificación en la capa fibrosa. Es conocido también el papel de NOTCH1 en el desarrollo del cambio osteogénico característico de la CAVD: una actividad deficiente de la proteína repercute en la falta de inhibición de RUNX2, el cual está implicado en la calcificación valvular al igual que en la vascular [109]. Además, las citoquinas inflamatorias y los derivados oxidados de los lípidos son también capaces de inducir la expresión de BMP2 en las VICs [110].

Estos cambios están en gran medida orquestados por las células de la válvula y, fundamentalmente, por las VICs. Se trata de células de origen mesenquimal con una elevada plasticidad, capaces de adaptarse a los estímulos presentes en el ambiente cambiando su fenotipo. Algunos autores consideran que pueden presentar hasta cuatro diferentes: quiescentes, encargadas de mantener la fisiología normal de la válvula; activadas, implicadas en la regulación de los mecanismos patológicos de respuesta al daño y similares a miofibroblastos; progenitoras, con funciones de reparación; y osteoblásticas, encargadas de dirigir los procesos de osteogénesis y condrogénesis [86].

Es importante destacar también que, a día de hoy, y a pesar de todos los mencionados avances en el conocimiento de la fisiopatología de la CAVD a nivel celular y molecular, aún no existe un biomarcador capaz de predecir el riesgo de padecerla ni una forma de evaluar la susceptibilidad de los individuos con factores de riesgo cardiovascular. Teniendo en cuenta que incluso cuando la enfermedad progresa de moderada a severa esta puede seguir siendo asintomática [111], la investigación dirigida a prevenir la CAVD es de vital necesidad.

1.2.2.2. Enfermedad renal crónica y estenosis aórtica

Al igual que ocurre con la calcificación de las arterias, el proceso de calcificación de la válvula aórtica puede verse influenciado por la ERC. Se ha estimado que la prevalencia de la calcificación valvular es entre 5 y 10 veces mayor en los individuos con una función renal disminuida [112]. De hecho, hasta un 85% de los pacientes dializados puede presentar algún grado de CAVD y entre un 6 y un 13% de los pacientes en hemodiálisis presentan estenosis aórtica severa [113]. Además, se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre la cantidad de calcio medido por tomografía computarizada (CT) en la válvula aórtica y la GFR estimada [114]. Es importante destacar también que la calcificación de las válvulas posee factores de riesgo similares a los clásicos de la aterosclerosis, encontrándose asociada con hallazgos patológicos en la íntima de las arterias en pacientes con ERC [115].

La relevancia de esta asociación radica en el aumento en la mortalidad y presencia de eventos cardiovasculares que provoca la calcificación de la válvula aórtica en pacientes con ERC. En un estudio realizado en pacientes en hemodiálisis se demostró un incremento de dos veces en el riesgo de mortalidad en aquellos individuos con calcificación en las válvulas aórtica y mitral con respecto a los individuos que no la tenían [116]. En otro estudio, se describió una tasa de supervivencia a 5 años

para los pacientes con estenosis aórtica severa de solamente un 42% en pacientes con ERC, frente a un 67% en pacientes con función renal normal [117]. Por último, en un trabajo para el cual se realizó un seguimiento de pacientes con ERC durante varios años, el 13,2% presentaron algún evento cardiovascular en ausencia de calcificación valvular, mientras que un 37% y hasta un 75% de los pacientes con calcificación de grado moderado o severo, respectivamente, presentaron un evento durante el estudio [118].

1.3. Estudios genéticos en la enfermedad renal crónica y la calcificación cardiovascular

Al igual que sucede con otras muchas enfermedades, el desarrollo y progresión de la ERC y los distintos tipos de calcificación en el aparato cardiovascular tienen un cierto componente genético. Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) son las variantes genéticas más estudiadas a la hora de buscar predictores de la susceptibilidad de un individuo a desarrollar cierta enfermedad o del riesgo de un paciente de tener un determinado pronóstico. Se han realizado un gran número de investigaciones con el objetivo de encontrar SNPs asociados con la ERC y la calcificación cardiovascular. Por ejemplo, estudios genéticos a gran escala (GWAS, *Genome-Wide Association Study*) han conseguido identificar variantes de este tipo asociadas con la calcificación de las arterias coronarias [119-121] o con la disminución en la GFR [122, 123]. Generalmente este tipo de estudios permiten identificar genes que *a priori* no parecerían relacionados con la enfermedad, ampliando el conocimiento de las rutas implicadas.

Es el caso de los polimorfismos relacionados con el gen *PALMD*, que recientemente han sido asociados con la CAVD en sendos GWAS llevados a cabo en los últimos años [124, 125]. Se trata de un gen expresado mayoritariamente en el tejido muscular cardíaco y esquelético que codifica una proteína cuyas funciones son poco conocidas [126]. La palmdelfina se localiza en el citosol, donde se asocia a los filamentos de actina y podría controlar la dinámica de la membrana plasmática y la forma de las células [127, 128]. También promueve la diferenciación de los mioblastos y la regeneración muscular [129], además de intervenir en la apoptosis en respuesta a daños en el DNA en líneas celulares de osteosarcoma [130].

Entre las investigaciones realizadas en los últimos años destaca asimismo un GWAS en el cual se identificó la implicación del polimorfismo rs10455872, situado en una región intrónica del gen *LPA*, en la calcificación de la válvula aórtica a través de su influencia en los niveles plasmáticos de Lp(a) [131]. El gen *LPA* codifica la apolipoproteína(a), la cual forma parte de Lp(a) junto con una partícula de LDL y una molécula de apolipoproteína B100 [132]. Niveles plasmáticos elevados de Lp(a) son un conocido factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y también están determinados genéticamente por la variación en el número de repeticiones de un dominio *Kringle* en el gen *LPA* [132]. De hecho, ya se ha demostrado la asociación causal de los niveles de Lp(a)

Introducción

determinados por estas variantes genéticas con incrementos en el riesgo a sufrir infartos de miocardio [133] o enfermedad arterial coronaria [134].

Otro tipo de estudios genéticos son los centrados en genes candidatos seleccionados a partir del conocimiento de la fisiopatología de una enfermedad. Es el caso del gen *MMP1*, que codifica una proteína perteneciente a una familia de enzimas capaces de degradar componentes de la matriz extracelular, citoquinas, péptidos antimicrobianos o proteínas de la superficie celular [135] y que intervienen en diversas enfermedades asociadas a procesos inflamatorios [136]. La expresión del gen *MMP1* está controlada por diversas variantes genéticas. En concreto, se han descrito una serie de SNPs en su región promotora capaces de modificar su actividad transcripcional: el alelo de la inserción (2G) del polimorfismo -1607 1G>2G la incrementa [137], produciéndose también este efecto con ciertos haplotipos de los polimorfismos -519 A>T y -340 T>C [138]. Además, el genotipo 2G2G₋₁₆₀₇ se ha asociado con una mayor mortalidad de los pacientes en hemodiálisis [139], y se ha propuesto la posesión del alelo G₋₅₁₉ como factor de riesgo para el desarrollo de ERC [140]. Sin embargo, aún no se han asociado estos SNPs con patologías relacionadas con la calcificación cardiovascular.

De entre las investigaciones centradas en genes candidatos llevadas a cabo en nuestro país, destacan las realizadas recientemente en la población del estudio NEFRONA (Observatorio Nacional de Aterosclerosis en Nefrología): se han asociado 5 SNPs relacionados con proteínas implicadas en alteraciones del metabolismo mineral con un incremento en el riesgo de padecer ERC [141], y un polimorfismo del gen *KL* (que codifica la proteína Klotho) con un descenso en el riesgo de progresión de la aterosclerosis asociada a la ERC [142].

1.4. MicroRNAs en la enfermedad renal crónica y la calcificación cardiovascular

Puesto que los miRNAs regulan al menos el 50% de los genes codificantes de proteínas [143], estos son cruciales en prácticamente todos los procesos celulares. Por tanto, perfiles de expresión anómalos se han asociado con condiciones patológicas de muy diversa índole, como hipertrofia cardíaca [144], cáncer [145], infarto de miocardio [146], enfermedad hepática [147] o lupus eritematoso sistémico [148], entre otras. Los miRNAs también intervienen en numerosos aspectos de la calcificación cardiovascular [149]. Desde el primer estudio al respecto, en el cual se demostró que la desregulación del miR-125b conduce a la diferenciación osteoblástica de VSMCs humanas a través de la modulación del factor de transcripción Osterix [150], se han llevado a cabo grandes avances. Por ejemplo, se ha descrito el incremento en la expresión de cuatro miRNAs en la media arterial de ratones con alteraciones del metabolismo óseo y mineral similares a las producidas por la ERC [151, 152] y, más recientemente, se han identificado cinco miRNAs diferencialmente expresados en válvulas aórticas estenóticas procedentes de cirugías de reemplazo [153].

Además de expresarse en todos los tejidos, los miRNAs circulan libremente y de forma muy estable en el suero y plasma humanos, lo que ha disparado el interés en ellos al convertirlos en potenciales biomarcadores mínimamente invasivos [154, 155]. Su estructura química es mucho más simple que la de otros biomarcadores, generalmente proteicos, cuya detección es más dificultosa al requerir la generación de anticuerpos. Puesto que existen miRNAs específicos de tejido [156], su aparición en sangre podría indicar un daño en el tejido correspondiente [157]. Se ha propuesto el uso de miRNAs circulantes como biomarcadores de la calcificación cardiovascular: miR-21, miR-27, miR-34a, miR-126, miR-146a, miR-155 y miR-210 aparecen en varias investigaciones que tienen como objetivo buscar miRNAs indicadores de enfermedad en las arterias coronarias, diabetes tipo 2 o ERC, siendo el miR-21, el cual participa en el proceso aterosclerótico, el único común a las tres enfermedades [149]. Por otro lado, se ha descrito la reducción en los niveles circulantes del total de miRNAs, así como de miRNAs específicos, en pacientes con ERC [158]. Particularmente, algunos de estos miRNAs podrían estar relacionados con las alteraciones cardiovasculares que sufren estos individuos [159]. Además, los niveles plasmáticos del miR-210 son capaces de predecir supervivencia en enfermos con daño renal agudo [160].

1.5. Tratamiento de la calcificación cardiovascular

Por el momento, el único tratamiento farmacológico dirigido a prevenir la calcificación vascular que ha conseguido llegar a la fase de ensayo clínico es el consistente en la administración intravenosa de SNF472 [161]. El tratamiento incluye en su formulación *mio*-inositol hexakisfosfato o ácido fítico, un compuesto que ha demostrado ser capaz de evitar la cristalización de fosfatos de calcio en forma de hidroxapatita *in vitro* [162] y la formación de depósitos minerales en las aortas y corazones de ratas a las que se inyectaron dosis suprafisiológicas de vitamina D [163, 164]. A pesar de ser bien tolerado por las personas a las que fue administrado y de tener una efectividad demostrada, no se ha estudiado su efecto sobre el fenotipo de las VSMCs.

Un compuesto químico que ya ha sido utilizado en la clínica es la mitramicina, concretamente en la enfermedad ósea de Paget u osteítis deformante [165]. Se trata de una enfermedad en la cual un incremento en la actividad celular ósea conduce a una elevada fragilidad de los huesos acompañada de la formación de nuevo tejido óseo desorganizado [166]. La naturaleza similar a una neoplasia de bajo grado de la osteítis deformante y la observación de hipocalcemia en numerosos pacientes con cáncer tratados con mitramicina [167] sugirieron la utilidad de este compuesto para el tratamiento de la enfermedad. Aunque las dosis necesarias eran más bajas que las empleadas en quimioterapia y los efectos secundarios más leves, los bisfosfonatos, alternativa terapéutica más potente, acabaron sustituyendo a la mitramicina para este uso [165].

La mitramicina, ácido aureólico o plicamicina es un antibiótico policétido producido de forma natural por cepas de microorganismos del género *Streptomyces* [168]. Debido a sus propiedades antitumorales, se ha usado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, especialmente el de

Introducción

testículo [169]. Su capacidad para unirse reversiblemente al surco menor de la hélice del DNA en regiones ricas en G/C bloquea la unión de factores de transcripción a promotores de genes que contienen en su secuencia este tipo de regiones [170]. Más concretamente, el factor de transcripción SP1 se une a este tipo de secuencias y su sobreexpresión en numerosos tipos de tumores activa diversos genes oncogénicos [171]. Sin embargo, el uso de la mitramicina se ha visto reducido como consecuencia de los graves efectos secundarios que puede producir [172].

La implicación del metabolismo óseo en la osteítis deformante puede llevar a pensar que la mitramicina también podría actuar contra la calcificación cardiovascular. De hecho, Zhang y colaboradores describen en una publicación reciente la implicación de SP1 (*Specificity protein 1*) en este proceso de forma que el aumento de su expresión en condiciones calcificantes desencadena un aumento en la expresión de BMP2 y, consecuentemente, el cambio osteogénico de las VSMCs [173]. Sin embargo, aunque la mitramicina es útil para demostrar que la inhibición de SP1 bloquea la calcificación, su potencial uso clínico queda anulado por la toxicidad del compuesto, aunque abre la puerta al estudio de análogos que mantengan su actividad biológica pero carezcan de los efectos secundarios.

Adicionalmente, se ha planteado el uso de los RNAs de pequeño tamaño para el tratamiento de distintas enfermedades humanas [174]. En efecto, el avance en el conocimiento de la implicación de los miRNAs en la fisiopatología de las enfermedades también los está haciendo candidatos a servir como dianas terapéuticas. Así, el uso de inhibidores de miRNAs basados en ácidos nucleicos bloqueados (LNA-anti-miR) inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer [175] y bloquea miRNAs sobreexpresados como consecuencia de infecciones [176]. De hecho, miravirsen, una terapia contra la hepatitis C actualmente en fase de ensayo clínico, utiliza esta tecnología para inhibir el miR-122 [177]. Asimismo, se han podido reducir con mucha eficiencia y especificidad los niveles del miR-192 en el riñón de ratones diabéticos, y con ellos la fibrosis renal y la proteinuria, apoyando la posibilidad de una aproximación traslacional basada en anti-miRNAs para evitar la progresión de la ERC en la nefropatía diabética [178]. Adicionalmente, la administración de moléculas que mimetizan funcionalmente los miRNAs naturales (*mimics*, secuencias nucleotídicas cortas artificiales que se asemejan a los precursores de los miRNAs o pre-miRNAs) permite la reposición de los miRNAs poco expresados y la regulación del RNA mensajero (mRNA) diana tal y como harían los miRNAs endógenos [179, 180].

2. Hipótesis y objetivos

El envejecimiento de la población en los países desarrollados ha provocado un notable incremento en la prevalencia de enfermedades de naturaleza no transmisible. Como consecuencia, hasta un 10% de la población española tiene disminuida su función renal, pudiendo considerarse además un 4% de la población como enfermos con ERC. La falta de biomarcadores precoces del descenso en la GFR y de tratamientos contra una de sus complicaciones más importantes, la calcificación cardiovascular, pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos métodos de diagnóstico y dianas terapéuticas.

Los miRNAs presentes en la circulación podrían servir como indicadores de las alteraciones que se producen en el riñón, los vasos o las válvulas cardíacas, jugando también un papel en los mecanismos que regulan la expresión de los genes alterados en estas enfermedades. Por otro lado, el genotipo de un individuo para polimorfismos de genes implicados en los procesos de calcificación podría ser capaz de predecir la susceptibilidad de pacientes de riesgo, como aquellos con ERC, a desarrollar estas alteraciones.

Se formulan, por tanto, las siguientes hipótesis:

1. Existen diferencias en el perfil de miRNAs circulantes entre los distintos estadios de la ERC. Estas diferencias se relacionan además con el proceso de calcificación vascular y pueden servir como dianas terapéuticas del mismo.
2. Existen numerosas similitudes entre el proceso de calcificación de las arterias, el proceso de calcificación cardiovascular más estudiado, y el de las válvulas cardíacas. Mecanismos que controlan el primero pueden igualmente dirigir la calcificación de la válvula y viceversa, estando en consecuencia ambos procesos producidos por los mismos mecanismos moleculares, celulares y genéticos.

Para confirmar la validez de estas hipótesis, se proponen los siguientes objetivos:

1. Determinar qué miRNAs se encuentran diferencialmente representados en el plasma de pacientes en diferentes estadios de ERC con respecto a controles sanos.
2. Analizar los niveles de expresión de los miRNAs desregulados por la ERC en una línea celular de VSMCs cultivada con concentraciones elevadas de calcio y fosfato, así como con un compuesto potencialmente inhibidor de la calcificación.
3. Estudiar el proceso de calcificación de la válvula aórtica mediante la cuantificación de los depósitos de calcio presentes en velos obtenidos mediante cirugía y correlacionar estas medidas con los niveles de genes y proteínas que acompañan al cambio osteogénico.
4. Determinar si los genotipos para polimorfismos de *LPA*, *MMP1* y *PALMD* de individuos con valvulopatías o calcificación vascular asociada a ERC se asocian con el nivel de la calcificación de sus válvulas o arterias.

3. Pacientes y métodos

3.1. Pacientes y recogida de muestras

3.1.1. Pacientes con enfermedad renal crónica

Se partió de la población recogida en el estudio NEFRONA [181]. Este proyecto, de naturaleza observacional y prospectiva, tiene como objetivo principal evaluar la carga aterosclerótica subclínica de pacientes con ERC. Para ello, el proyecto reclutó un total de 2.445 pacientes en distintos estadios de la enfermedad procedentes de 81 centros sanitarios de España, así como 559 controles sin ERC. El diagnóstico se basó en los criterios detallados por las guías KDIGO [2].

El proyecto cuenta con numerosos datos de los pacientes incorporados en una base de datos anonimizada. Se recogieron variables antropométricas y bioquímicas (Tabla 2), datos específicos de la enfermedad renal (en el caso de que el sujeto perteneciera al grupo de ERC), datos de comorbilidades y de tratamientos médicos en el momento de la inclusión de todos los individuos incluidos en el estudio. A todos ellos se les habían realizado, además, ecografías de las arterias femoral y carótida al comienzo del estudio, las cuales se repitieron a los 24 meses en los enfermos para valorar su evolución.

Además de los datos, el proyecto se encargó de recopilar muestras de sangre que se enviaron al Biobanco de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) Red de Investigación Renal (REDinREN) en la Universidad de Alcalá de Henares para su posterior procesamiento para la extracción de plasma y DNA, entre otros productos [182].

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de la población del estudio NEFRONA.

		Total N = 3004	Controles N = 559	ERC N = 2445	p-valor
Edad		57,3 (12,6)	54,6 (11,6)	58,0 (12,8)	< 0,0001
Sexo	Hombre	1806 (60,1)	298 (53,3)	1508 (61,7)	0,0003
	Mujer	1198 (39,9)	261 (46,7)	937 (38,3)	
Tabaquismo	No fumador	1296 (43,1)	222 (39,7)	1074 (43,9)	0,094
	Ex-fumador	1109 (36,9)	228 (40,8)	881 (36,0)	
	Fumador	599 (19,9)	109 (19,5)	490 (20,0)	
Dislipemia	No	1193 (39,7)	362 (30,3)	831 (69,7)	< 0,0001
	Sí	1811 (60,3)	197 (10,9)	1614 (89,1)	
Diabetes	No	2323 (77,3)	499 (89,3)	1824 (74,6)	< 0,0001
	Sí	681 (22,7)	60 (10,7)	621 (25,4)	
Hipertensión	No	579 (19,3)	361 (64,6)	218 (8,9)	< 0,0001
	Sí	2425 (80,7)	198 (35,4)	2227 (91,1)	
Raza	Blanca	2910 (96,9)	549 (98,2)	2361 (96,6)	0,044
	Otra	94 (3,1)	10 (1,8)	84 (3,4)	

Las variables cualitativas se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en controles y enfermos se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado. Las variables cuantitativas se expresan como media (desviación estándar) y las diferencias entre los grupos de controles y enfermos se analizaron mediante la prueba t de Student.

3.1.2. Pacientes con valvulopatía aórtica

Todos los pacientes con valvulopatía aórtica fueron diagnosticados en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) siguiendo los criterios recogidos en las guías de práctica clínica de la *American Society of Echocardiography* [183, 184] tras el estudio ecocardiográfico de sus válvulas. Se muestran en la Tabla 3 los valores de los parámetros ecocardiográficos utilizados para clasificar los grados de severidad de la estenosis aórtica. Asimismo, se recogieron diversos parámetros antropométricos y clínicos de todos ellos, incluyendo la anatomía de su válvula aórtica.

Tabla 3. Grado de severidad de la estenosis valvular aórtica de acuerdo con parámetros ecocardiográficos.

	Grado de severidad de la estenosis		
	Leve	Moderada	Severa
Velocidad del chorro (m/s)	< 3	3 - 4	> 4
Gradiente medio (mmHg)	< 25	25 - 40	> 40
Gradiente máximo (mmHg)	< 40	40 - 60	> 60
Área valvular (cm²/m²)	> 1,5	1 - 1,5	< 1

En una primera población se estudiaron pacientes derivados al Laboratorio de Imagen del Área del Corazón del HUCA por sospecha de valvulopatía entre los años 2008 y 2014 (Tabla 4). Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de válvula aórtica normofuncionante (13,8%), estenosis aórtica (47,1%), insuficiencia aórtica (15,2%) o doble lesión aórtica (23,9%). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado tanto para su participación en el estudio como para la cesión de sus muestras al Biobanco del Principado de Asturias. Un total de 348 muestras de sangre (extraídas precirugía en caso de haberla) fueron remitidas al Biobanco para la separación de plasma y DNA y, además, de los 119 pacientes sometidos a reemplazo valvular aórtico se obtuvieron las válvulas explantadas (Figura 7), que fueron depositadas en tubos con RNA^{later} (Ambion) en el propio quirófano para preservar el RNA celular antes de ser procesadas en el Biobanco.

Se utilizó una segunda población de pacientes con valvulopatía aórtica, procedentes también del HUCA, pero esta vez con el criterio de incluir a todos los pacientes sometidos a sustitución quirúrgica de la válvula aórtica en el citado hospital durante un año (Tabla 5). Los criterios de exclusión fueron: pacientes con diagnóstico de endocarditis, pacientes reintervenidos que porten prótesis aórticas y pacientes intervenidos de forma urgente. Así, la población de pacientes candidatos entre noviembre de 2016 y noviembre de 2017 fue de 308 (72,4% con estenosis, 13,3% con insuficiencia y 14,3% con doble lesión). Todos ellos firmaron los consentimientos informados requeridos como justificante de la donación de sangre y tejido que realizaron, documentos que fueron igualmente enviados al Biobanco.

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de la primera población de pacientes con valvulopatía aórtica.

		Diagnóstico valvular aórtico					p-valor
		Total N = 348	Normofuncionante N = 48	Insuficiencia N = 53	Estenosis N = 164	Doble lesión N = 83	
Edad		64,5 (15,0)	60,5 (14,9)	51,7 (15,5)	68,6 (13,4)	66,7 (12,5)	< 0,0001
Sexo	Hombre	224 (64,4)	32 (66,7)	40 (75,5)	97 (59,1)	55 (66,3)	0,169
	Mujer	124 (35,6)	16 (33,3)	13 (24,5)	67 (40,9)	28 (33,7)	
Tabaquismo	No fumador	226 (64,9)	27 (56,3)	36 (67,9)	113 (68,9)	50 (60,2)	0,0001
	Ex-fumador	24 (6,9)	0 (0,0)	3 (5,7)	6 (3,7)	15 (18,1)	
	Fumador	98 (28,2)	21 (43,8)	14 (26,4)	45 (27,4)	18 (21,7)	
Dislipemia	No	188 (54,0)	34 (70,8)	40 (75,5)	74 (45,1)	40 (48,2)	< 0,0001
	Sí	160 (46,0)	14 (29,2)	13 (24,5)	90 (54,9)	43 (51,8)	
Diabetes	No	271 (77,9)	39 (81,3)	49 (92,5)	116 (70,7)	67 (80,7)	0,007
	Sí	77 (22,1)	9 (18,7)	4 (7,5)	48 (29,3)	16 (19,3)	
Hipertensión	No	142 (40,8)	22 (45,8)	32 (60,4)	64 (39,0)	24 (28,9)	0,003
	Sí	206 (59,2)	26 (54,2)	21 (39,6)	100 (61,0)	59 (71,1)	
Anatomía valvular	Tricúspide	202 (58,0)	37 (77,1)	12 (22,6)	108 (65,9)	45 (54,2)	< 0,0001
	Bicúspide	134 (38,5)	11 (22,9)	41 (77,4)	52 (31,7)	30 (36,1)	
	Otra	12 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (2,4)	8 (9,6)	

Las variables cualitativas se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Las variables cuantitativas se expresan como media (desviación estándar) y las diferencias entre los grupos de distinto diagnóstico se analizaron mediante la prueba ANOVA.

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de la segunda población de pacientes con valvulopatía aórtica.

		Diagnóstico valvular aórtico				p-valor
		Total N = 308	Insuficiencia N = 41	Estenosis N = 223	Doble lesión N = 44	
Edad		72,6 (9,8)	69,7 (10,6)	73,2 (9,0)	72,0 (12,0)	0,094
Sexo	Hombre	180 (58,4)	25 (61,0)	135 (60,5)	20 (45,5)	0,168
	Mujer	128 (41,6)	16 (39,0)	88 (39,5)	24 (54,5)	
Tabaquismo	No fumador	188 (61,0)	26 (63,4)	136 (61,0)	26 (59,1)	0,258
	Ex-fumador	93 (30,2)	9 (22,0)	72 (32,3)	12 (27,3)	
	Fumador	27 (8,8)	6 (14,6)	15 (6,7)	6 (13,6)	
Dislipemia	No	130 (42,2)	22 (53,7)	88 (39,5)	20 (45,5)	0,308
	Sí	178 (57,8)	19 (46,3)	135 (60,5)	24 (54,5)	
Diabetes	No	228 (74,0)	36 (87,8)	157 (70,4)	35 (79,5)	0,044
	Sí	80 (26,0)	5 (12,2)	66 (29,6)	9 (20,5)	
Hipertensión	No	86 (27,9)	17 (41,5)	57 (25,6)	12 (27,3)	0,113
	Sí	222 (72,1)	24 (58,5)	166 (74,4)	32 (72,7)	
Anatomía valvular	Tricúspide	261 (84,7)	31 (75,6)	193 (86,5)	37 (84,1)	0,128
	Bicúspide	43 (14,0)	8 (19,5)	29 (13,0)	6 (13,6)	
	Otra	4 (1,3)	2 (4,9)	1 (0,5)	1 (2,3)	

Las variables cualitativas se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado. Las variables cuantitativas se expresan como media (desviación estándar) y las diferencias entre los grupos de controles y enfermos se analizaron mediante la prueba ANOVA.

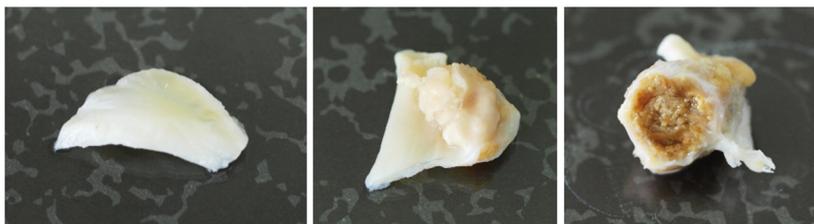


Figura 7. Velos valvulares procedentes de válvulas aórticas reemplazadas quirúrgicamente. Se muestran como ejemplo tres velos con diferente grado de degeneración.

3.2. Modelo animal de insuficiencia renal crónica

Se utilizaron también muestras de suero procedentes de un modelo animal de insuficiencia renal crónica (IRC) desarrollado en el laboratorio de la UGC Metabolismo Óseo del HUCA [185]. En él se emplearon ratas Wistar macho que se mantuvieron en el Bioterio de la Universidad de Oviedo a una temperatura controlada y bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y a las cuales se les facilitaron agua y pienso *ad libitum*. A la mitad de ellas se les realizaron nefrectomías 7/8 para inducir la IRC, manteniéndose el resto como un grupo *Sham* que se utilizó a modo de control. En la Tabla 6 se recogen las características bioquímicas relativas a la IRC de estos animales.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos de las ratas cuyos sueros fueron utilizados en este trabajo.

	Sham N = 7	IRC N = 7
Aclaramiento de creatinina (mL/min)	2,01 (0,32)	0,71 (0,30)*
Calcio (mg/dL)	10,9 (0,3)	11,8 (0,5)
Fósforo (mg/dL)	6,9 (1,0)	5,6 (2,2)
PTH (pg/mL)	5,0 (2,6)	20,7 (33,2)*
FGF-23 (pg/mL)	368 (55)	792 (214)*

Datos presentados como media (desviación estándar). Las comparaciones entre los grupos Sham e IRC se llevaron a cabo utilizando la prueba t de Student (* = $p < 0,05$ vs *Sham*).

3.3. Cultivo celular y modelo *in vitro* de calcificación vascular

Se utilizó la línea celular A7r5 de VSMCs embrionarias de rata (CRL-1444; *American Type Culture Collection*) para la realización de todos los experimentos de cultivo celular. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y se utilizó como medio de mantenimiento *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, GE Healthcare Life Sciences) con 4,5 g/L de glucosa y sin piruvato de sodio suplementado con 2 mM de L-glutamina (Merck), 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomina (Lonza), así como con un 10% de suero fetal bovino (GE Healthcare Life Sciences). El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días.

Para la realización de los experimentos, las células se sembraron a una concentración tal que a las 24 h su confluencia era de alrededor del 80%, tras lo cual el medio de cultivo se sustituyó por otro de idéntica formulación al de mantenimiento pero con un menor contenido de suero fetal bovino (5%), el cual sirvió de condición control. En otros dos grupos de células, a este medio se adicionaron diferentes concentraciones (10, 100 y 500 nM) de mitramicina o su análogo demicariosil-3D- β -D-digitoxosil-mitramicina SK (EC-8042, Figura 8), ambos proporcionados por EntreChem S.L. Se incluyó además un cuarto grupo de células a cuyo medio se adicionaron volúmenes de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, vehículo en el cual iban disueltos los compuestos) equivalentes a los necesarios para aplicar las concentraciones elegidas de mitramicina y EC-8042. Las células se recogieron a las 72 h para realizar los diferentes análisis.

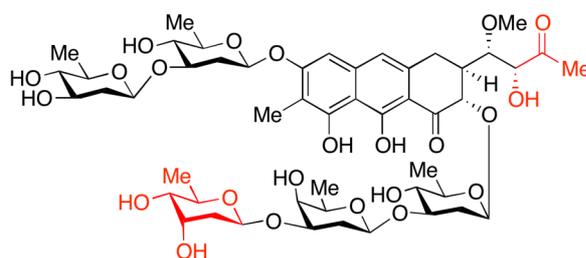


Figura 8. Estructura química del compuesto EC-8042. Se muestran en color rojo los grupos modificados con respecto a la molécula de la mitramicina.

Una vez elegida la concentración de EC-8042 que produjo los efectos deseados sobre las células (100 nM), esta se aplicó a un modelo *in vitro* de calcificación vascular. En este caso, aparte de la condición control, se aplicó a un grupo de células un medio calcificante (CaP) con la misma formulación que el control al que se añadieron CaCl_2 (Sigma-Aldrich) y NaH_2PO_4 (Merck) para conseguir unas concentraciones finales de calcio y fosfato de 2,7 y 2,0 mM, respectivamente, según un modelo descrito [186], frente a 1,8 y 0,9 mM presentes en el DMEM. Se comprobó la capacidad de este medio para inducir la formación de depósitos de calcio sobre las células mediante la realización de tinciones de Rojo Alizarina (Figura 9). En los experimentos en los que se añadió EC-8042, los pocillos tratados con CaP se dividieron, pasados 5 días, en tres grupos: en uno se mantuvo el medio CaP, a otro se le añadió EC-8042, y a otro un volumen equivalente de vehículo. Las células se recogieron a los 9-10 días para realizar los diferentes análisis.

3.4. Análisis de los depósitos de calcio

3.4.1. Tinción de Rojo Alizarina

Se llevaron a cabo tinciones de Rojo Alizarina para visualizar los depósitos de calcio formados sobre las células en cultivo (Figura 9). Se siguió para ello un protocolo descrito previamente [187], al cual se introdujo alguna modificación para realizarlo a temperatura ambiente. Tras lavar las células con tampón PBS (*Phosphate buffered saline*, Sigma-Aldrich), se les aplicó una disolución de formaldehído (Merck) al 10% en PBS durante 10 min para fijarlas a las placas de cultivo.

Pacientes y métodos

Seguidamente, las células se lavaron con agua destilada y se cubrieron durante 5 min con una disolución al 2% de Rojo Alizarina S (Sigma-Aldrich) pH = 4,2. Una vez eliminado el exceso de tinción con agua destilada, las placas se mantuvieron secas para proceder a su observación.

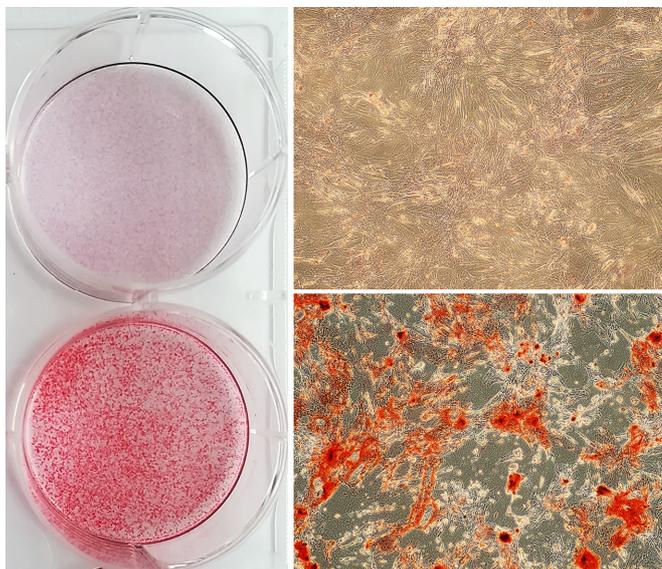


Figura 9. Comprobación de la capacidad del medio CaP para inducir la formación de depósitos de calcio sobre las células mediante tinción de Rojo Alizarina. A la izquierda: aspecto de dos pocillos en los cuales se cultivaron células A7r5 en condiciones control (en la parte superior de la imagen) y CaP (en la parte inferior). A la derecha, junto a cada pocillo: imágenes tomadas con el microscopio de las células en dichas condiciones (aumento: 100X).

3.4.2. Cuantificación del calcio depositado sobre monocapas celulares

La cantidad de calcio depositado sobre las células sometidas a estímulos calcificantes se determinó mediante un método colorimétrico. En primer lugar, tras lavar las células con tampón PBS, se les aplicó HCl 0,6 N durante una noche a 4 °C para disolver el calcio, tras lo cual se siguió un protocolo basado en el método de la *o*-cresolftaleína complexona [188, 189] que incluye el uso de un compuesto destinado a eliminar posibles interferencias del magnesio y el hierro [190]. Se mezclaron, en el siguiente orden, 100 μ L de una disolución de hidrocloreuro de etanolamina (Sigma-Aldrich) 880 mM (pH = 11), 5 μ L del sobrenadante recogido de cada muestra, y 100 μ L de una disolución con *o*-cresolftaleína complexona (Sigma-Aldrich) 0,1 mM y hemisulfato de 8-quinolinol (Sigma-Aldrich) 11 mM. Tras 5 min de incubación, se midió la absorbancia de cada mezcla a 570 nm con un espectrofotómetro *Multiskan GO* (ThermoFisher).

La cantidad de calcio de cada muestra se normalizó en función de la proteína total de las células sobre las que estaba depositado (μ g calcio/mg proteína), que fue extraída con una disolución 0,1 N de NaOH (Merck) con un 0,1% de SDS (dodecilsulfato sódico, Sigma-Aldrich) [191]. La concentración proteica de estos extractos fue determinada mediante el método colorimétrico *DC Protein Assay* (BioRad), utilizando nuevamente el equipo *Multiskan GO* para medir absorbancia.

3.4.3. Cuantificación del contenido en calcio de los velos valvulares

Se determinó el contenido en calcio de muestras de tejido valvular conservadas en etanol mediante microtomografía computarizada (microCT) en un equipo *SkyScan 1174* (Bruker) de la Unidad de Imagen Preclínica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Las imágenes fueron obtenidas utilizando unos parámetros de 50 kV y 800 μ A. Se obtuvieron unas 1.300 imágenes de cada una de las muestras con un paso de rotación de 0,3° y un promedio de marco de 2 para un escaneo de 180°. El escaneo de cada una de ellas duró entre 10 y 20 min (dependiendo del tamaño de la válvula) usando un tiempo de exposición de 6.200 ms. Se realizó la corrección de campo plano al principio de cada escaneo.

Las imágenes obtenidas fueron reconstruidas con el programa NRecon (Bruker, Figura 10). Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, dureza del rayo, suavizado y artefactos de anillo fueron los mismos en todas las muestras.

El análisis morfométrico en 3D fue realizado mediante el software CTAn (Bruker). El volumen de interés fue delimitado manualmente en cada una de las muestras. El umbral que se usó para todas ellas fue de 0,74 a 3,39 g/cm^3 de BMD (*bone mineral density*, densidad mineral ósea), habiéndose calibrado esta medida con respecto a dos fantasmas con 0,25 y 0,75 g/cm^3 de hidroxapatita.

Se consideraron los parámetros BMD y BV/TV (*bone volume/tissue volume*, volumen óseo/volumen de tejido) como medidas de la cantidad de calcio depositado.

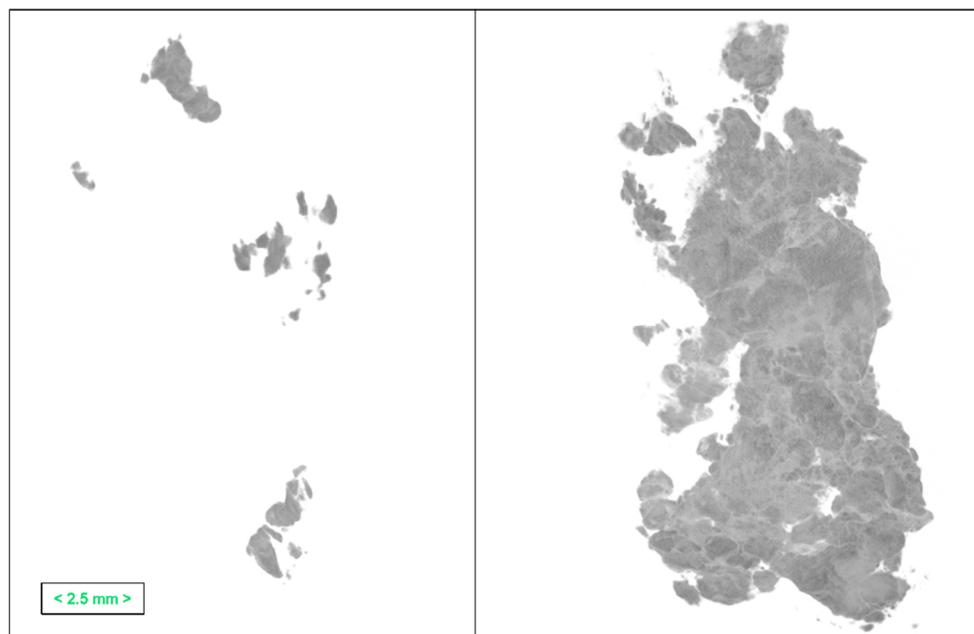


Figura 10. Imágenes de los depósitos minerales obtenidas tras el análisis mediante microtomografía computarizada (microCT) de los velos valvulares aórticos. A la izquierda se muestra un velo con una calcificación menos extensa que el de la derecha, severamente calcificado.

3.5. Tinciones histológicas

Tras la realización del microCT, algunas de las muestras de tejido valvular fueron enviadas al Biobanco del Principado de Asturias, donde se descalcificaron con una disolución de ácido fórmico al 10% para posteriormente incluirse en bloques de parafina. Se realizaron secciones de 5 µm de grosor que se colocaron sobre portaobjetos para su posterior análisis histológico.

3.5.1. Tinción de hematoxilina y eosina

Los cortes se desparafinaron con xileno (VWR) y se rehidrataron en disoluciones con concentraciones decrecientes de etanol (PanReac), tras lo que se aplicó a estos hematoxilina de Mayer (5% alumbre potásico, Labkem; 2% ácido acético glacial, Merck; 0,1% hematoxilina, Sigma-Aldrich; $2 \cdot 10^{-4}$ % KIO₃, Sigma-Aldrich) durante 5 min. Los cortes se lavaron con agua del grifo hasta que la tinción obtuviese un color azulado. A continuación, se aplicó eosina A (Merck) al 1% durante 1,5 min. Para quitar el exceso de este colorante, se realizaron lavados rápidos con etanol 95% y 100%, cuyos restos fueron eliminados con xileno. Finalmente, se les aplicó medio de montaje *Entellan* (Merck) para fijar el cubreobjetos.

3.5.2. Tinción de orceína

Se realizó una tinción de orceína en las muestras para poder diferenciar fácilmente las fibras elásticas del resto de los componentes de la matriz extracelular de las válvulas. La tinción se llevó a cabo en la Unidad de Histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer del Instituto Universitario de Oncología del Principado Asturias (IUOPA), siguiendo un protocolo descrito previamente [192]. Una vez se desparafinaron e hidrataron los cortes, se les aplicó una disolución ácida de orceína en etanol al 70% durante 30 min, cuyo exceso se eliminó mediante un lavado rápido en agua destilada. A continuación, los cortes se tiñeron durante 20 s con carmín de índigo en una disolución saturada de ácido pícrico. Por último, se diferenciaron las fibras elásticas teñidas con orceína mediante una deshidratación prolongada en etanol y se colocó un cubreobjetos.

3.6. Inmunohistoquímicas

Para la realización de inmunohistoquímicas, los cortes de tejido valvular fueron igualmente desparafinados con xileno y rehidratados en disoluciones con concentración decreciente de etanol. A continuación se utilizaron reactivos del kit *EnVision FLEX High pH* (Dako), con lavados intermedios con PBS. En caso de necesitarse el desenmascaramiento de los antígenos, los cortes se desparafinaron y rehidrataron con el tampón *Target Retrieval Solution* a 96 °C durante 20 min utilizando el equipo *PT Link* (Dako). Seguidamente, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena aplicando *Peroxidase-blocking reagent* durante 5 min y las uniones inespecíficas aplicando albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) al 3% en PBS durante 10 min. Los cortes se incubaron a continuación con una dilución del anticuerpo contra la proteína de interés (Tabla 7) durante 30 min, y con un anticuerpo secundario *Envision/HRP* contra ratón y conejo con peroxidasa de rábano (HRP)

conjugada durante otros 30 min. Se aplicó también un amplificador de la señal del anticuerpo primario (*Linker*, Dako) durante 15 min cuando fue necesario. Para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos en el tejido valvular, se aplicó una disolución de diaminobencidina (DAB, preparada en el momento a partir de *DAB+ Chromogen* y *Substrate Buffer*) durante 10 min. Se realizó asimismo una contratinción con hematoxilina de Mayer para destacar los núcleos celulares. Finalmente, se deshidrataron los cortes y se les colocó un portaobjetos con medio de montaje.

Tabla 7. Anticuerpos y condiciones utilizados en las inmunohistoquímicas.

Proteína	Casa comercial y referencia	Dilución	Desenmascaramiento
Alix	Santa Cruz, sc-53540	1:50	pH 9
BMP2	Abcam, ab6285	1:100	No
CD31	Dako, GA610	*	pH 9
CD63	Santa Cruz, sc-5275	1:200	No
CD68	Dako, M0876	1:500	pH 9

Alix: *Apoptosis Linked Gene-2 (ALG-2) interacting protein X*; CD: *Cluster of Differentiation*. * anticuerpo prediluido comercialmente, al que además se aplicó *Linker*.

Se llevaron a cabo optimizaciones del protocolo anteriormente descrito en el Biobanco del Principado de Asturias para cada anticuerpo utilizado. Se ensayaron en cada caso combinaciones de diferentes diluciones de anticuerpo y condiciones de desenmascaramiento, empleándose para ello controles positivos, es decir, tejidos donde la presencia de la proteína de interés está demostrada. En la Figura 11 se muestran las inmunohistoquímicas realizadas en las condiciones que se consideraron óptimas.

La cuantificación del área teñida con DAB se realizó con el programa *Fiji* [193]. Se tomaron para ello imágenes de los portabjetos completos con la resolución de un objetivo 20X con el equipo *SCN 400 Slide Scanner* (Leica) de la Unidad de Histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer del IUOPA. A partir de ellas se obtuvieron capturas equivalentes a imágenes de campos aleatorios de un microscopio óptico con el programa *SlidePath Gateway* (Leica), las cuales generaron archivos de imagen con el mismo tamaño. Sobre estos archivos se aplicó el complemento *Colour Deconvolution* [194] para separar el color marrón de la DAB del azul de la hematoxilina. Se generaron así imágenes monocromáticas a las que se aplicó un umbral de intensidad con el que se pudieron discriminar las áreas de positividad con respecto al fondo. Se obtuvo el valor aproximado del área total teñida con DAB en cada muestra calculando la media de las áreas medidas en las capturas.

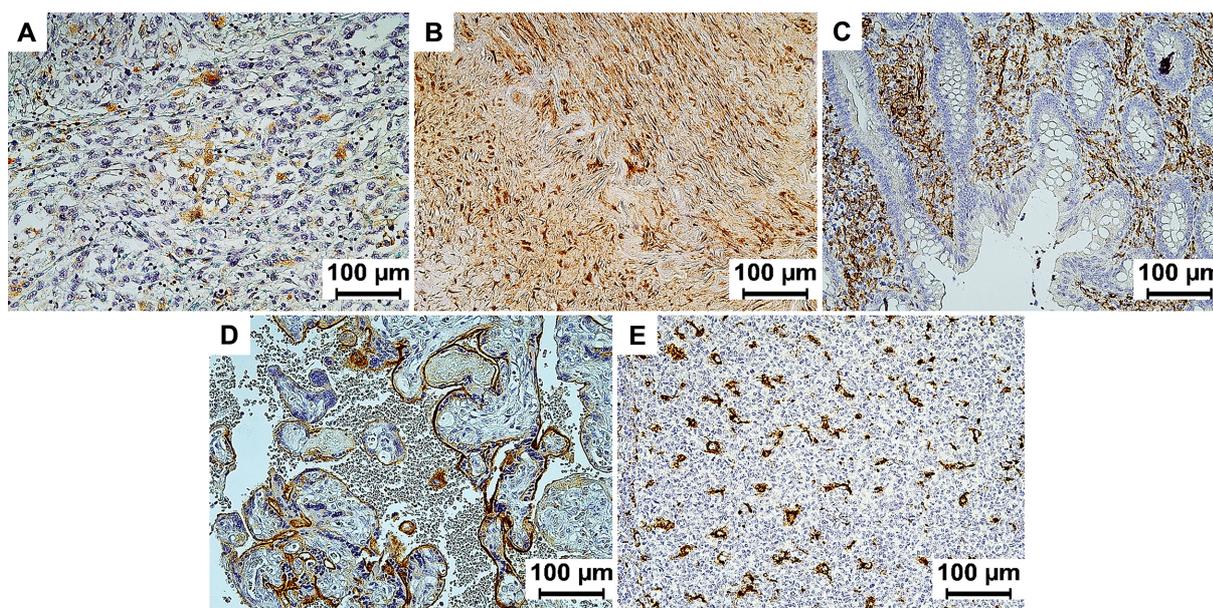


Figura 11. Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas realizadas en los controles positivos con las que se determinaron las condiciones adecuadas para cada anticuerpo. A: Alix – melanoma; B: BMP2 – pared arterial patológica; C: CD31 – apéndice; D: CD63 – placenta; E: CD68 – amígdala.

3.7. Cuantificación de los niveles de apoptosis

El marcaje de las células apoptóticas se llevó a cabo con el *FITC Annexin V Detection Kit* (BioLegend). Se utilizó para ello una suspensión de las células cultivadas en las diferentes condiciones en las que se quería determinar el nivel de apoptosis. Puesto que se trabajó con células adherentes, estas fueron tripsinizadas y posteriormente sedimentadas por centrifugación junto con aquellas que ya se encontrasen en suspensión. Tras realizar dos lavados del pellet con 1 mL de tampón *Cell Staining Buffer*, las células se resuspendieron en 100 µL de tampón *Annexin V Binding Buffer* a los que se añadieron 5 µL de *FITC-Annexin V*. Tras agitar en vórtex se incubó en oscuridad durante 15 min. Se realizó un lavado con 1 mL de *Annexin V Binding Buffer* para eliminar el exceso del fluoróforo y se resuspendió el pellet resultante en 400 µL del mismo buffer.

La adquisición se realizó en un citómetro *FACS Aria III* (BD Biosciences) de la Plataforma de Citometría del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Se utilizó el porcentaje de células marcadas con FITC (isotiocianato de fluoresceína) con respecto al total para expresar los niveles de apoptosis provocados por cada condición estudiada.

3.8. Cuantificación de exosomas circulantes

Se utilizó el kit *ExoStep Plasma* (Immunostep) con modificaciones. El kit se basa en el reconocimiento de dos antígenos propios de exosomas. Se realizó un pretratamiento del suero mediante dos centrifugaciones de 10 min a 500 g y 2.000 g y una tercera a 14.000 g durante 30 min recogiendo el sobrenadante en los tres casos. De esta forma se eliminaron restos celulares y otras vesículas de mayor tamaño. El último sobrenadante se diluyó 1:1 con un tampón salino con HEPES y 2% de BSA y se añadieron 100 µL de una disolución de cuentas microscópicas o *beads* conjugadas con un anticuerpo anti-CD63. La detección se hizo tras la adición de un anticuerpo anti-CD9 biotinilado y, posteriormente, estreptavidina-ficoeritrina.

La adquisición se realizó en un citómetro *FACS Canto II*, 3 láseres configuración 4-2-2 (BD Biosciences) del Área de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. Para expresar la cantidad de exosomas se utilizó el valor de la media de la intensidad de fluorescencia (ficoeritrina) de las *beads* en cada muestra.

3.9. Análisis de la expresión de genes y microRNAs

3.9.1. Extracción de microRNAs circulantes

Los miRNAs presentes en el plasma humano se extrajeron con el kit *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada extracción se emplearon 250 µL de plasma a los cuales se añadieron una cantidad fija del miR-39 de *Caenorhabditis elegans* (Qiagen) a modo de control exógeno (*spike-in*) y 20 µg glicógeno (Roche) a modo de *carrier* o portador de los miRNAs.

La concentración de miRNAs en cada muestra fue determinada con un equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent) y un *Small RNA Chip* (Agilent) en el laboratorio de Biotecnología y Cultivos Celulares de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

3.9.2. Secuenciación masiva de microRNAs

Posteriormente, en el laboratorio de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo se llevó a cabo la secuenciación masiva de los miRNAs circulantes, extraídos de las muestras de plasma, mediante el método de alto rendimiento *Ion Torrent*. Se emplearon equipos y reactivos de la casa comercial ThermoFisher siguiendo en todo momento sus especificaciones. El protocolo incluye, en primer lugar, la construcción de una biblioteca de secuenciación con el *AB Library Builder System*, proceso por el cual se ligan oligonucleótidos adaptadores a los miRNAs y se realiza una retrotranscripción para generar DNA copia de los productos de esta hibridación. Seguidamente se lleva a cabo una amplificación clonal de las secuencias con el tamaño adecuado mediante una PCR en emulsión en el *Ion One Touch 2 System*. A continuación se procede a la secuenciación de estos fragmentos en el equipo *Ion Personal Genome*

Pacientes y métodos

Machine (PGM) utilizándose, en este caso, un chip semiconductor *Ion Chip 318*. Este sistema tiene capacidad para generar hasta 1.500.000 lecturas. Mientras que otros métodos de secuenciación emplean nucleótidos modificados químicamente, en este caso el equipo detecta los cambios en el pH generados por los protones liberados durante el proceso de polimerización del DNA, el cual tiene lugar en micropocillos donde se aplica un único nucleótido a cada secuencia por determinar. Finalmente, la información así generada se analizó con el programa *Torrent Suite Software*, que comparó las secuencias obtenidas con las depositadas en la edición 20 de la base de datos miRBase (www.mirbase.org) de la Universidad de Mánchester, en la cual están recogidos cerca de 2.000 miRNAs humanos diferentes.

3.9.3. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total a partir de suero de rata, monocapas celulares o válvulas aórticas humanas se realizó siguiendo un protocolo estándar para el uso de reactivo *TRI* (Sigma-Aldrich). En el caso de los sueros se realizó a partir de 400 μ L a los que se añadió una cantidad fija del RNA pequeño nuclear (snRNA) 4,5S (Teknokroma) como *spike-in*. El RNA valvular se extrajo a partir de fragmentos de tejido de aproximadamente 1 cm^2 que fueron triturados con un homogeneizador de tejidos *TH* (Omni).

Se utilizó además un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher) para determinar la concentración de RNA en las muestras resultantes mediante la medida de la absorbancia a 260 nm y su pureza mediante los cocientes entre las absorbancias medidas a 260 y 280 nm, así como a 260 y 230 nm.

3.9.4. Retrotranscripción y PCR cuantitativa

Los niveles relativos de RNAs mensajeros (mRNAs) y miRNAs se determinaron mediante PCR cuantitativa. Para ello, se obtuvo el DNA copia a partir de 1 μ g o 100 ng de RNA total, respectivamente, utilizando el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se utilizaron *Fast Start Universal Probe Master* (Roche) con el fluoróforo ROX, sondas *TaqMan* con el fluoróforo FAM específicas para cada mRNA o miRNA (Tabla 8) y un termociclador *Stratagene Mx3005P* (Agilent Technologies) para llevar a cabo las amplificaciones y registrar las lecturas de ciclos umbral. La fluorescencia de las sondas *TaqMan* fue relativizada con respecto a ROX y la interpretación de los valores así obtenidos se llevó a cabo por la comparación de diferencias de ciclos umbral con respecto a un control, descrito como el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [195]. Como normalizador se utilizó GAPDH para los mRNAs, el snRNA 4,5S para miRNAs circulantes en suero y la media de los ciclos umbral del snRNA U6 y el RNA pequeño nucleolar SNORD87 para miRNAs en células.

Tabla 8. Sondas TaqMan utilizadas en la PCR cuantitativa.

miRNAs y RNAs pequeños		Genes			
<i>Rattus norvegicus/Homo sapiens</i>		<i>R. norvegicus</i>		<i>H. sapiens</i>	
miR-29b-3p	000413	ACTA2	Rn01759928_g1	BMP2	Hs00154192_m1
miR-30c-1-3p	002108	BMP2	Rn00567818_m1	MGP	Hs00969490_m1
snRNA U6	001973		500792 (Roche)	GAPDH	Hs99999905_m1
<i>R. norvegicus</i>		COL1A1	Rn01463848_m1		
snRNA 4,5S	001716	HDAC4	Rn01427040_m1		
SNORD87	001712	Osterix	Rn02769744_s1		
		RUNX2	504281 (Roche)		
		SP1	Rn00561953_m1		
		TGF- β 3	Rn00565937_m1		
		GAPDH	Rn99999916_s1		

Todos los ensayos son de la casa comercial Applied Biosystems, salvo que se haya indicado lo contrario.

3.10. Western Blot

Se obtuvieron extractos de la proteína total de las monocapas celulares con *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA: 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% NP-40; 0,5% desoxicolato de sodio; 0,1% SDS; reactivos de Sigma-Aldrich) al que se añadió *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche). La concentración proteica de estos extractos fue determinada mediante el método colorimétrico *DC Protein Assay* en el equipo *Multiskan GO*.

Las proteínas extraídas fueron separadas en función de su peso molecular en geles de acrilamida/bisacrilamida (BioRad) al 10% en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE) siguiendo un protocolo estándar. Se empleó para ello el buffer de carga *Laemmli Sample Buffer 4x* (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 40% glicerol; 20% β -mercaptoetanol; 8% SDS; 0,2% azul de bromofenol; todos los reactivos de Sigma-Aldrich). Una vez separadas en el gel, las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) *Hybond P* (GE Healthcare) siguiendo también un protocolo estándar, tras lo cual se bloquearon con una disolución de leche desnatada en polvo (Santa Cruz) al 5% en *Tris-buffered saline* (TBS: 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; reactivos de Sigma-Aldrich) con Tween-20 (Sigma-Aldrich) al 0,1% (TBS-T) durante una hora para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación, las membranas se incubaron con diluciones de los anticuerpos primarios en leche desnatada al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, haciendo lo mismo con los secundarios conjugados con HRP (Tabla 9).

Pacientes y métodos

Las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando *Clarity Western ECL Substrate* (BioRad) y obteniendo imágenes de las mismas con un equipo *Chemidoc XRS+* y el programa *ImageLab* (ambos de BioRad). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó con la función *Analyze Gels* del programa de análisis de imagen *Fiji*, dividiéndose los valores obtenidos para la proteína problema entre los de GAPDH, que se utilizó como control constitutivo.

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en el Western Blot.

Proteína	Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario	
	Casa comercial y referencia	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia	Dilución
SP1	Santa Cruz, sc-420	Ratón	1:250	Calbiochem, 401215	1:10.000
GAPDH	Santa Cruz, sc-25778	Conejo	1:10.000	Santa Cruz, sc-2004	1:20.000

3.11. Genotipado

3.11.1. Genotipado por PCR-RFLP

A partir de DNA genómico obtenido de sangre periférica, se caracterizó el genotipo para tres polimorfismos en individuos con valvulopatía aórtica. Los fragmentos de DNA que contenían los polimorfismos se amplificaron por PCR utilizando la polimerasa *Taq* (Biotools) con una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato, oligonucleótidos cebadores y $MgCl_2$ a concentraciones finales de 200 μ M, 1 μ M y 2mM, respectivamente. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (BioRad) siguiendo un programa estándar. Seguidamente, los productos de la PCR se digirieron con enzimas de restricción cuya secuencia de corte específica contenía la variante a estudiar. Finalmente, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Sigma-Aldrich) al 2% y se visualizaron con SYBR Safe (Invitrogen) en el equipo *Chemidoc XRS+*.

En la Tabla 10 se recogen las secuencias de los oligonucleótidos, temperaturas de anillamiento y enzimas de restricción utilizadas para cada uno de los polimorfismos estudiados. En la Figura 12 se muestran los patrones de bandas resultantes de la electroforesis posterior a la digestión para cada uno de los genotipos.

3.11.2. Genotipado por PCR cuantitativa

El genotipado de otros dos polimorfismos se realizó utilizando sondas *TaqMan* (Applied Biosystems, Tabla 11) y *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems) según las especificaciones del fabricante, en un termociclador *Stratagene Mx3005P*.

Tabla 10. Pares de oligonucleótidos usadas en las PCRs para el estudio de los polimorfismos.

Gen	SNP	Oligonucleótidos	Ta (°C)	Producto (pb)	Enzima	Fragmentos (pb)
MMP1	- 1607 1G > 2G rs1799750	F: AAGTGTTC TTTGGTCTCTGC R: GGATTGATTTGAGATAAGTCAGATC	58	209	Bgl II	2G: 209 1G: 176
	- 519 A > G rs1144393	F: TTACAGAGATGGGGTCTCAC R: CCATGGAGTACTCTTTGACC	62	399	Kpn I	A: 234+175 G: 399
	- 340 T > C rs514921	F: TGTGTGGAGAAACCTGTAGGA R: TCACTTGGTGTGCAATGTC	60	209	Sau96 I	T: 209 C: 189

Se muestran subrayadas las bases desapareadas; Ta: temperatura de anillamiento; pb: pares de bases; F=Forward (sentido); R=Reverse (antisentido). Todas las enzimas de restricción son de la casa comercial New England BioLabs.

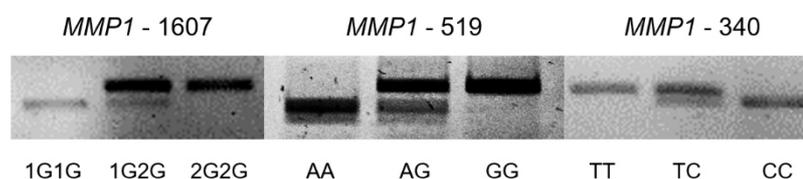


Figura 12. Patrones de bandas resultantes de la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR y digeridos con enzimas de restricción para cada genotipo de los tres polimorfismos estudiados.

Tabla 11. Sondas TaqMan utilizadas en el genotipado por PCR cuantitativa.

Gen	SNP	Referencia	Fluoróforo
LPA	rs10455872	C__30016089_10	A: VIC G: FAM
PALMD	rs6702619	C__26334289_10	G: VIC T: FAM

3.11.3. Genotipado masivo

Las muestras de DNA de la población NEFRONA se enviaron al Centro de Genotipado-Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos (CEGEN-PRB2) del Instituto de Salud Carlos III (Nodo de la Universidad de Santiago de Compostela), donde se utilizó la técnica iPLEX GOLD MassARRAY (Agena Bioscience, antes Sequenom MassARRAY) y el programa Assay Design v4 para determinar los genotipos de diversos polimorfismos. Esta técnica se basa en la amplificación de las secuencias que preceden a la variante a estudiar, tras la cual se realiza una extensión de una única base correspondiente a aquella que discrimina los alelos. Se obtienen así secuencias que difieren solamente en una base, las cuales son identificadas mediante espectrometría de masas.

Como control de calidad, en el CEGEN se revisaron los datos para cada polimorfismo y se eliminaron los que tenían bajo porcentaje de genotipado o que no estaban en equilibrio de Hardy-

Pacientes y métodos

Weinberg. Se comprobó también la consistencia en los resultados para muestras repetidas, dentro de la misma placa y entre placas. Además, en cada chip se incluyó un trío de muestras de DNA del biorepositorio Coriell, para las que existen datos publicados y con las que se pueden comparar los resultados obtenidos y así comprobar la fiabilidad del genotipado.

3.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa *IBM SPSS Statistics* (IBM) versión 20. La comparación entre frecuencias de variables cualitativas se realizó mediante la prueba Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando la cantidad de datos así lo requería. En el caso de las variables cuantitativas, su tratamiento estadístico fue diferente según estas se ajustasen o no a una distribución normal, lo cual se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para las variables con distribución normal, las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo con la prueba t de Student, y entre más de dos grupos con la prueba ANOVA, con análisis *post hoc* de Bonferroni. Para el resto de variables se usaron las pruebas U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis, respectivamente. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la existencia de correlaciones entre variables con distribución normal, utilizándose el coeficiente de correlación de Spearman para el resto. Los p-valores menores de 0,05 fueron considerados como significativos.

4. Resultados y discusión

4.1. La secuenciación de microRNAs circulantes en plasma de pacientes con enfermedad renal crónica no dio resultados óptimos

Como primera aproximación al estudio de posibles nuevos biomarcadores tempranos y no invasivos para el desarrollo de ERC, se llevó a cabo un experimento de secuenciación masiva de miRNAs circulantes. Con el objetivo de encontrar un perfil característico de los mismos asociado a la pérdida de función renal, se seleccionó una pequeña muestra de 32 individuos de entre los incluidos en la población del proyecto NEFRONA: ocho controles sin ERC, ocho en estadio 2-3, ocho en estadio 4-5 y ocho en diálisis; siendo en todos ellos la etiología una nefropatía glomerular.

En un primer ensayo se analizaron cuatro muestras, habiéndose agrupado en cada una, tras la extracción, el RNA de dos individuos de uno de los cuatro grupos citados. Los resultados de la secuenciación no fueron óptimos: solo se consiguieron identificar 120 miRNAs maduros diferentes en el grupo control y unos 80 en los distintos grupos de ERC y, además, se registró un total de 3.304 lecturas en la muestra control, descendiendo esta cifra hasta alrededor de 1.000 en el resto de muestras. A pesar de tratarse de un número muy reducido de lecturas, este último dato concuerda con la observación de que los niveles generales de miRNAs se ven reducidos con la ERC [158]. También se obtuvo un número extremadamente bajo de lecturas del miR-39 de *C. elegans*, el cual fue añadido exógenamente para ser usado a modo de normalizador. Aunque en sucesivos ensayos se introdujeron modificaciones sobre el protocolo recomendado por la casa comercial y se probaron otros métodos, no se consiguieron mejorar los resultados. Puesto que estos datos no permiten llevar a cabo una comparación de la abundancia de los miRNAs detectados entre las diferentes muestras, solamente podemos describir cuáles están presentes en los plasmas analizados. En la Tabla 12 se recogen los 30 miRNAs para los que se registró un mayor número de lecturas en cada una de las cuatro muestras.

Una investigación realizada en 2011 demostró que una notable proporción de los miRNAs circulantes identificados hasta entonces como biomarcadores del desarrollo de tumores sólidos proceden de las células sanguíneas [196]. Puesto que este hallazgo tiene una repercusión muy importante sobre la interpretación de los resultados de estudios de secuenciación masiva como el que nos ocupa, comprobamos si los miRNAs presentes en nuestras muestras estaban recogidos en la literatura como procedentes de estas células. Efectivamente, muchos de los miRNAs para los que se registró un mayor número de lecturas pueden provenir de los glóbulos rojos: let-7a-5p, let-7f-5p, miR-16-5p, miR-22-3p, miR-92a-3p, miR-451a y miR-486-5p. Los eritrocitos son, de hecho, las células que más RNAs pequeños aportan a la circulación [197, 198]. Asimismo, el miRNA procedente de células de origen mielóide miR-223 también estaba presente.

Entre los miRNAs que no proceden de este tipo de células se encuentran algunos implicados en procesos relacionados con la ERC o la calcificación vascular: por ejemplo, miR-9 altera el equilibrio entre fosfato y pirofosfato en condrocitos [199] e inhibe la proliferación de las VSMCs y la formación de una “neoíntima” en las arterias [200], miR-34a suprime la autofagia en células del riñón [201] y

Resultados y discusión

promueve la calcificación [202], miR-155 regula la sintasa de ácido nítrico endotelial [203] y sus niveles en circulación se asocian a enfermedad de las arterias coronarias [204], y los niveles de miR-423-5p, que interviene en la vía de señalización del TGF- β , se han visto reducidos en plasma de pacientes con ERC, en un modelo animal de fibrosis renal y en cultivos *in vitro* de células renales tratadas con TGF- β 1 [205]. Es importante mencionar que entre los miRNAs que pueden ser liberados por las células sanguíneas también hay algunos que intervienen en la fisiología de las VSMCs, lo cual requeriría determinar su origen exacto. Así, miR-22 interviene en la modulación del fenotipo de las VMSCs [206] y miR-223 es un potencial biomarcador del daño que las concentraciones elevadas de fosfato producen en las mismas [207].

Tabla 12. MicroRNAs que produjeron un mayor número de lecturas en cada muestra analizada mediante secuenciación masiva.

CONTROL		ERC 2-3		ERC 4-5		DIÁLISIS	
miRNA	Lecturas	miRNA	Lecturas	miRNA	Lecturas	miRNA	Lecturas
hsa-miR-451a	1122	hsa-miR-451a	267	hsa-miR-451a	202	hsa-miR-9-3p	335
hsa-miR-9-3p	411	hsa-miR-9-3p	178	hsa-miR-9-3p	103	hsa-miR-380-5p	193
hsa-miR-486-3p	366	hsa-miR-486-3p	133	hsa-miR-486-3p	87	hsa-miR-34a-5p	88
hsa-miR-486-5p	366	hsa-miR-486-5p	133	hsa-miR-486-5p	87	hsa-miR-451a	67
hsa-miR-380-5p	208	hsa-miR-380-5p	95	hsa-miR-380-5p	87	hsa-miR-155-5p	55
hsa-miR-34a-5p	102	hsa-miR-34a-5p	58	hsa-miR-34a-5p	37	hsa-miR-486-3p	49
hsa-miR-21-5p	83	hsa-miR-21-5p	38	hsa-miR-155-5p	26	hsa-miR-486-5p	49
hsa-miR-155-5p	59	hsa-miR-155-5p	29	hsa-miR-21-5p	21	hsa-miR-21-5p	44
hsa-let-7b-5p	38	hsa-miR-223-3p	13	hsa-let-7b-5p	9	hsa-miR-223-3p	13
hsa-miR-484	35	hsa-miR-191-5p	12	hsa-miR-223-3p	9	hsa-miR-423-5p	10
hsa-miR-423-5p	25	hsa-miR-423-5p	11	hsa-miR-484	8	hsa-miR-3184-3p	10
hsa-miR-3184-3p	25	hsa-miR-3184-3p	11	hsa-miR-143-3p	7	hsa-miR-140-3p	9
hsa-let-7i-5p	23	hsa-let-7b-5p	11	hsa-let-7i-5p	6	hsa-miR-22-3p	8
hsa-miR-223-3p	20	hsa-let-7i-5p	8	hsa-miR-140-3p	6	hsa-miR-145-5p	7
hsa-miR-15a-5p	18	hsa-miR-140-3p	8	hsa-miR-22-3p	6	hsa-let-7b-5p	6
hsa-miR-103a-3p	17	hsa-miR-22-3p	8	hsa-miR-425-5p	6	hsa-let-7c-5p	5
hsa-miR-103b	17	hsa-miR-425-5p	8	hsa-miR-103a-3p	5	hsa-miR-143-3p	5
hsa-miR-30d-5p	16	hsa-miR-16-5p	7	hsa-miR-103b	5	hsa-miR-34c-5p	4
hsa-miR-15b-5p	15	hsa-miR-29b-3p	7	hsa-miR-31-3p	5	hsa-miR-101-3p	3
hsa-let-7c-5p	14	hsa-miR-484	7	hsa-miR-101-3p	4	hsa-miR-1260a	3
hsa-miR-16-5p	22	hsa-miR-145-5p	6	hsa-miR-191-5p	4	hsa-miR-134-5p	3
hsa-let-7d-5p	11	hsa-let-7a-5p	5	hsa-miR-145-5p	4	hsa-miR-484	3
hsa-miR-22-3p	10	hsa-miR-24-3p	5	hsa-miR-16-5p	4	hsa-miR-24-3p	3
hsa-let-7g-5p	10	hsa-miR-15b-5p	5	hsa-miR-144-3p	3	hsa-miR-191-5p	3
hsa-miR-122-5p	9	hsa-miR-107	4	hsa-miR-23a-3p	3	hsa-miR-29a-3p	3
hsa-miR-3591-3p	9	hsa-miR-1	4	hsa-let-7c-5p	3	hsa-miR-450a-5p	3
hsa-miR-425-5p	9	hsa-miR-30d-5p	4	hsa-miR-101-3p	3	hsa-miR-181a-5p	2
hsa-miR-191-5p	9	hsa-miR-3074-5p	4	hsa-let-7a-5p	2	hsa-let-7i-5p	2
hsa-miR-19a-3p	8	hsa-miR-24-3p	4	hsa-miR-15a-5p	2	hsa-miR-16-5p	2
hsa-let-7a-5p	8	hsa-miR-192-5p	3	hsa-miR-19b-3p	2	hsa-miR-15a-5p	2
cel-miR-39	1	cel-miR-39	1	cel-miR-39	0	cel-miR-39	9
Total	3304	Total	1162	Total	802	Total	1044

Es difícil identificar la causa exacta de la ineficacia del protocolo seguido para registrar un número de lecturas que permitiese analizar los cambios en la cantidad en la que se presentan los miRNAs en las distintas muestras. El kit *miRNeasy* aparece mencionado en numerosas ocasiones en la literatura científica como una opción óptima para obtener cantidades suficientes de miRNAs a partir de suero o plasma [208-210], aunque se han propuesto modificaciones como su uso junto con colector de vacío para poder emplear un mayor volumen de muestra [211], la adición de moléculas de RNA que actúen a modo de *carriers* o portadores de los miRNAs [212, 213], o la realización previa de una ultracentrifugación [214]. Por otro lado, el uso de plasma en lugar de suero es más adecuado pues la presencia de miRNAs liberados durante la coagulación, a pesar de incrementar el rendimiento de la extracción, puede alterar el auténtico perfil de los mismos en la circulación [215]. Quizás una excesiva manipulación de los productos de la extracción, que tuvieron que pasar por dos laboratorios adicionales a aquel en el cual se procesaron los plasmas, pudo contribuir a la degradación del RNA. Dado que no se disponía de otro tipo de muestras con que probar más métodos para extraer el RNA, se abandonó el uso de técnicas de secuenciación masiva para detectar cambios en los niveles de miRNAs circulantes.

4.2. Los niveles circulantes de miR-29b y miR-30c se encuentran desregulados en un modelo animal de insuficiencia renal crónica

Puesto que no se pudo obtener ningún resultado concluyente del análisis de los plasmas humanos, se decidió adoptar una estrategia diferente para abordar el objetivo de encontrar un perfil de expresión diferencial de miRNAs asociado a la ERC. Así, se optó por estudiar los niveles de miRNAs circulantes en muestras de suero procedentes de un modelo animal de IRC desarrollado en el laboratorio de la UGC Metabolismo Óseo del HUCA [216].

En este caso, en lugar de buscar miRNAs diferencialmente expresados mediante métodos de secuenciación masiva, se estudió la expresión de miRNAs candidatos elegidos tras la realización de consultas bibliográficas. Se seleccionaron dos miRNAs (miR-29b y miR-30c) involucrados tanto en procesos fibróticos como de diferenciación osteoblástica, los cuales juegan un papel clave en el camino hacia la fase terminal de la ERC así como en sus complicaciones más frecuentes. Concretamente, el miR-29b participa en la fibrosis renal inducida por TGF- β y su mediador Smad3, quienes regulan negativamente la expresión del miRNA en el riñón [217]. Además, contribuye de forma positiva a la regulación de la diferenciación osteoblástica impidiendo la traducción de numerosos genes inhibidores del proceso y modulando la expresión de proteínas de la matriz extracelular [218]. Por su parte, el miR-30c reduce los niveles de mRNA y proteína del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, *connective tissue growth factor*), viéndose la expresión del miRNA reducida en el tejido renal fibrótico [219]. También participa en la diferenciación osteoblástica, en este caso regulándola de forma negativa, pues inhibe la expresión proteica de RUNX2 [220].

En el análisis de los sueros de los dos tipos de ratas que constituyen el modelo animal se detectaron incrementos significativos en los niveles de ambos miRNAs en las muestras del grupo al que se indujo la IRC con respecto a las del grupo *Sham* (alrededor de tres veces en el caso del miR-29b y alrededor de dos en el caso del miR-30c) (Figura 13).

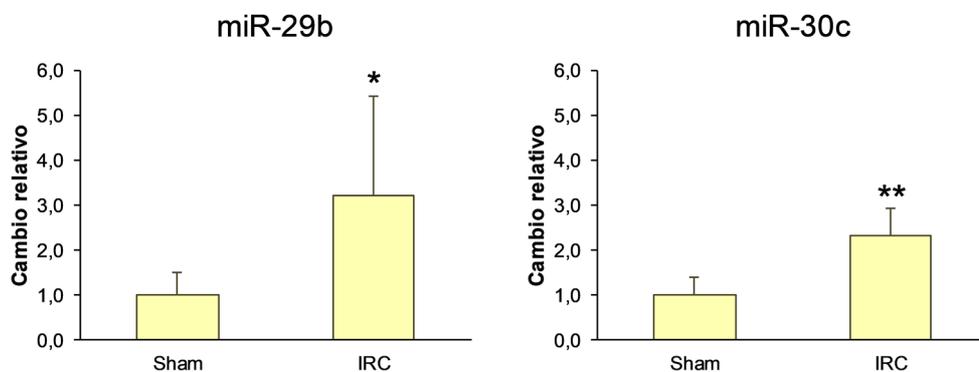


Figura 13. Niveles de miR-29b y miR-30c en el suero de ratas con insuficiencia renal crónica con respecto a un grupo Sham. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para comparar los valores del nivel de expresión de los microRNAs (p vs. Sham: * < 0,05; ** < 0,01).

Se ha descrito previamente en nuestro laboratorio que los niveles de expresión en el tejido cardiaco del miR-29b y el miR-30c se ven disminuidos en estas ratas con IRC, cambios que irían a favor de un aumento en la expresión de genes diana profibróticos [185]. Se pudo demostrar además, mediante el análisis de distintos marcadores como el área teñida por Rojo Sirio y la expresión génica de colágeno y CTGF, que los animales nefrectomizados presentaban, en efecto, fibrosis cardiaca. Aunque con los resultados conocidos hasta ahora no es posible determinar a qué tipo celular se debe la desregulación de los miRNAs estudiados, se comprobó que los cambios producidos en el corazón se correlacionan con los cambios en sentido inverso en el suero. Los niveles circulantes de miR-29b y miR-30c podrían, por tanto, utilizarse como biomarcadores del proceso de fibrosis. El origen de las discrepancias entre lo observado en la circulación y en el tejido podría ser debido a la eliminación activa de estos miRNAs de los órganos en los cuales esté teniendo lugar la fibrosis mediante su internalización en vesículas extracelulares como los exosomas, que posteriormente se secretarían a distintos fluidos biológicos [221].

Tanto el miR-29b como el miR-30c han aparecido propuestos en sendos estudios recientes como potenciales biomarcadores para la nefropatía diabética [222, 223]. A pesar de que las citadas investigaciones utilizan orina en lugar de suero como fluido en el cual analizar la expresión de los miRNAs, los cambios detectados en sus niveles van en la misma dirección que los presentados en este apartado. En el caso del miR-29b, su aumento en la orina de pacientes con nefropatía diabética es atribuido a su producción por células del riñón, en particular las células endoteliales del glomérulo, las cuales liberan el miRNA al medio al ser cultivadas con TGF- β añadido exógenamente [222]. Por el contrario, una investigación anteriormente mencionada y otras posteriores y con objetivos similares, detectaron descensos de la expresión de este miRNA en tejidos procedentes de modelos animales de fibrosis renal [217, 224, 225]. Adicionalmente, nuestro laboratorio describió un aumento en la expresión del miR-29b en VSMCs cultivadas con suero urémico o concentraciones elevadas de calcio y fosfato, así como en las aortas de ratas nefrectomizadas y con dieta rica en fosfato, aunque estos hallazgos no se correlacionaron con niveles circulantes [226]. En cuanto al miR-30c, el incremento de sus niveles en los exosomas aislados a partir de la orina en pacientes con nefropatía diabética no se atribuye a ningún tipo celular concreto [223].

4.3. El compuesto EC-8042 atenúa el cambio osteogénico en un modelo *in vitro* de calcificación vascular, posiblemente a través de la regulación de microRNAs

Recientemente se han sintetizado numerosos análogos de la mitramicina (mitrálogos) con el fin de encontrar un compuesto con la misma o mejor actividad antitumoral y toxicidad reducida, es decir, con una mayor ventana terapéutica [227]. Uno de estos mitrálogos es el compuesto EC-8042, el cual posee una toxicidad entre 16 y 32 veces menor que la mitramicina manteniendo su bioactividad en el rango del compuesto original [228]. Se ha demostrado también su potencial utilidad en el tratamiento del cáncer de ovario [229], mama [230] o sarcomas [231]. Es, por tanto, un buen candidato para tratar de desarrollar un tratamiento farmacológico dirigido a prevenir la calcificación cardiovascular.

4.3.1. EC-8042 a la concentración 100 nM inhibe la transcripción de genes diana de SP1 sin modificar los niveles de RNA mensajero y proteína del mismo, así como sin provocar muerte celular por apoptosis, en células de músculo liso vascular

Puesto que el compuesto EC-8042 aún no se ha utilizado en modelos de enfermedades distintas al cáncer, no hay constancia en la literatura de ningún ensayo en el cual se haya aplicado a VSMCs. Por ello, en primer lugar se realizaron una serie de experimentos destinados a elegir la dosis adecuada del compuesto para frenar el proceso de calcificación vascular sin provocar daños a las células. Con este objetivo, se cultivó una línea de VSMCs de rata con tres concentraciones diferentes del mitrálogo y de mitramicina en el rango de las ya utilizadas para inhibir la calcificación con esta última [173], así como con volúmenes equivalentes de vehículo. Se buscaba también de esta manera comparar la efectividad del compuesto original con la de EC-8042.

Tras la aplicación del tratamiento, las células mantuvieron una confluencia muy similar a la del control con la exposición a la concentración más baja de los compuestos (10 nM) (Figura 14). Sin embargo, estos provocaron una disminución importante de la cantidad de células a partir de una determinada concentración (100 nM en el caso de la mitramicina, y 500 nM en caso de EC-8042). Por tanto, en el caso del mitrálogo, 100 nM podría ser la máxima dosis de entre las ensayadas que no provoca efectos tóxicos a las células. Además, las diferencias observadas con respecto a la mitramicina sugieren una ventana terapéutica para EC-8042 en torno a la concentración 100 nM, razón que llevó a realizar análisis encaminados a confirmarlo.

4.3.1.2. EC-8042 100 nM no provoca un aumento de la muerte celular por apoptosis

Se determinó el porcentaje de células apoptóticas presentes en cada una de las condiciones descritas anteriormente mediante la detección por citometría de flujo de las células marcadas con anexina V-FITC.

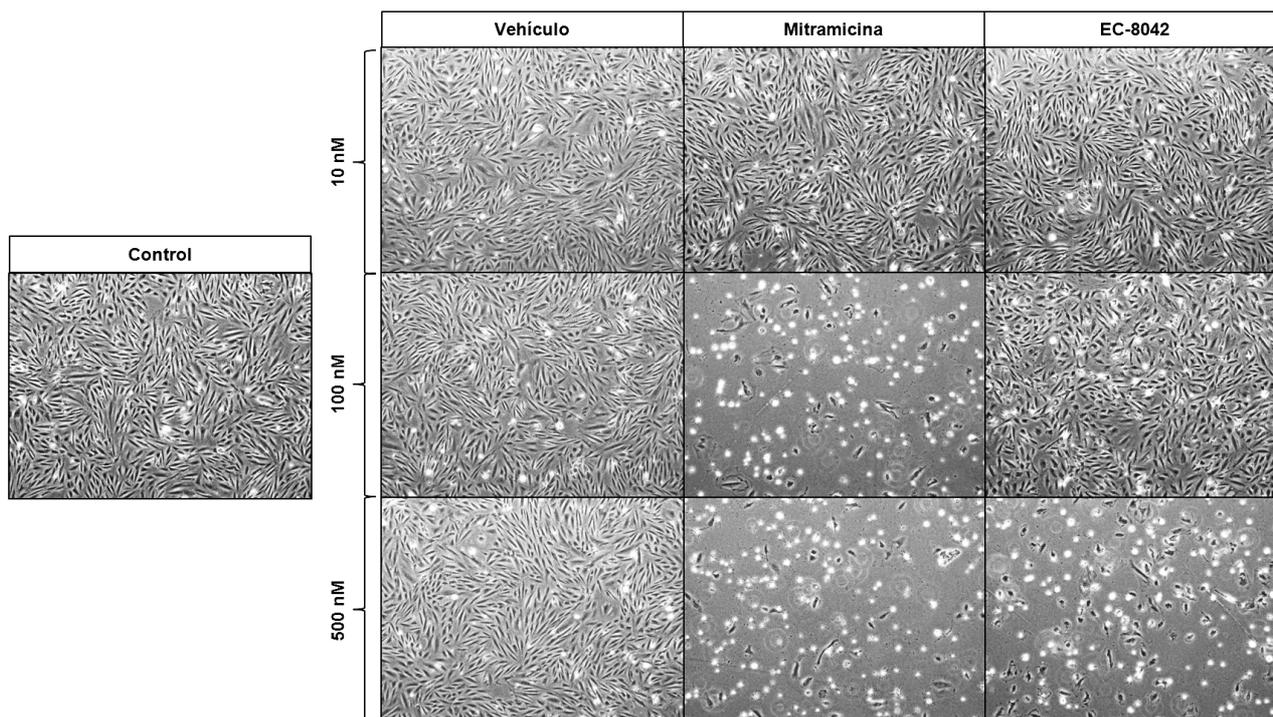


Figura 14. Aspecto al microscopio de las células A7r5 cultivadas con diferentes concentraciones de EC-8042 y mitramicina, así como con volúmenes equivalentes de vehículo. Aumento: 40X.

Mientras que ninguno de los compuestos produjo cambios en los niveles de apoptosis con respecto al control o al vehículo a la concentración 10 nM, esto no fue así para las concentraciones 100 y 500 nM (Figura 15). Se detectó un 75% de células apoptóticas entre las cultivadas con mitramicina a las mencionadas concentraciones, mientras que con EC-8042 solamente se alcanzaron porcentajes tan elevados a 500 nM, lo cual se corresponde con las observaciones al microscopio de la confluencia de las células (Figura 14). Estos resultados podrían deberse a la acción directa de los compuestos, pues la mitramicina es capaz de inducir apoptosis en algunas líneas celulares neoplásicas a través de la activación de caspasas [232]. Sorprendentemente, Zhang y colaboradores describieron la reducción por parte de la mitramicina a la concentración 100 nM de los niveles de apoptosis provocados por un medio calcificante en la misma línea celular que la utilizada en los experimentos aquí presentados [173]. Asimismo es curioso que EC-8042 a 100 nM no solo no provocase un incremento en la apoptosis de las VSMCs, sino que además redujese el porcentaje de células muertas por este mecanismo. Adicionalmente, se detectaron cambios en el tamaño y complejidad interna o granularidad de las células bajo el efecto de las condiciones que produjeron efectos tóxicos sobre las mismas (Figura 16).

Los resultados recogidos en este apartado serían, por tanto, una justificación adicional a los cambios en la confluencia de las células en cultivo para elegir la concentración 100 nM de EC-8042 como la más adecuada para aplicar a las VSMCs con el objetivo de evitar el cambio osteogénico bajo estímulos calcificantes.

Resultados y discusión

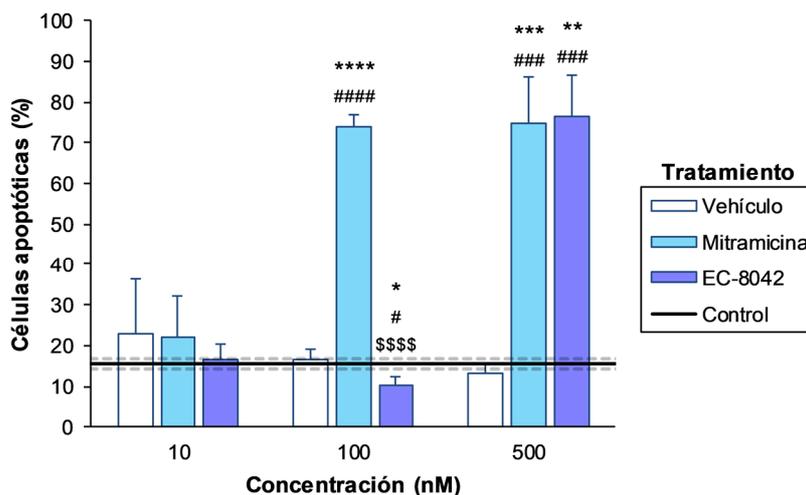


Figura 15. Efecto de EC-8042 y mitramicina a diferentes concentraciones sobre la muerte por apoptosis de las células A7r5. Resultados procedentes de tres experimentos independientes. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para realizar las comparaciones (p vs. Control: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001. p vs. Vehículo: # < 0,05; ### < 0,001; #### < 0,0001. p vs. Mitramicina: \$\$\$\$ < 0,0001).

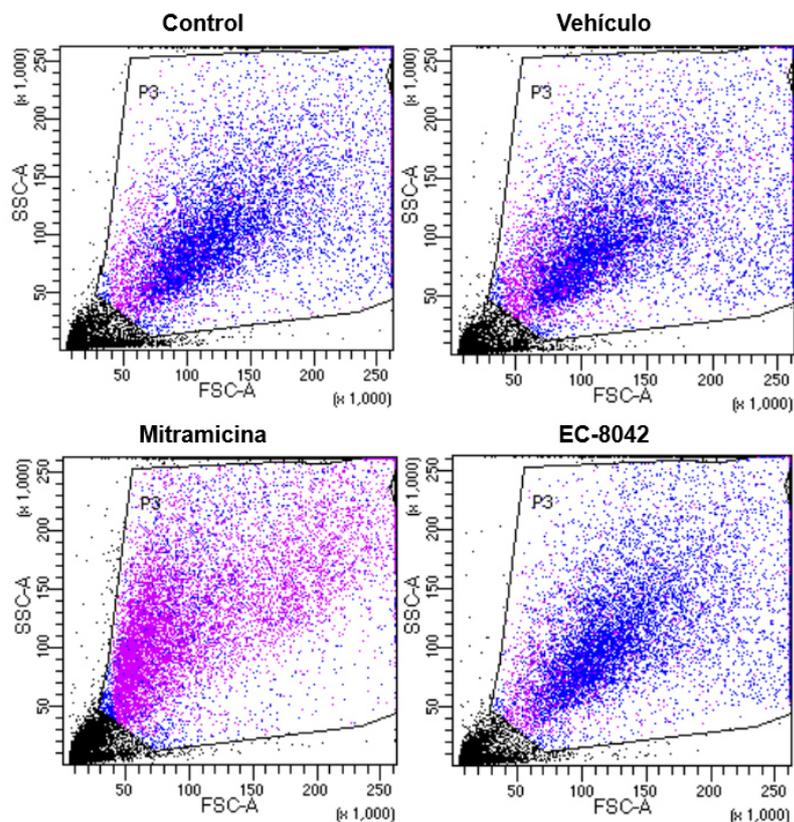


Figura 16. Tamaño y complejidad interna de las células A7r5 cultivadas con los diferentes tratamientos a la concentración 100 nM. FSC: forward scatter, parámetro indicador del tamaño celular. SSC: side scatter, parámetro indicador de la complejidad interna o granularidad celular. Los puntos azules representan las células viables; los morados, las apoptóticas; y los negros, los restos celulares.

4.3.1.1. EC-8042 100 nM bloquea la transcripción de COL1A1 sin alterar la de SP1

Se determinaron, mediante PCR cuantitativa, los niveles de expresión del mRNA del factor de transcripción SP1 en las células cultivadas bajo las condiciones ya mencionadas. El compuesto EC-8042 produjo un descenso significativo en la expresión de SP1 a la concentración 500 nM con respecto al control y el vehículo, el cual se corresponde con aproximadamente un 30% de los niveles de expresión del control, pero no produjo ningún cambio a la concentración de 100 nM (Figura 17). La mitramicina, en cambio, produjo un descenso significativo de entre el 40 y el 50% tanto a la concentración 100 nM como a 500 nM. Las condiciones que produjeron un descenso significativo en la expresión de SP1 son aquellas a las que se observó una reducción importante del número de células en cultivo (Figura 14), así como un incremento en la muerte por apoptosis (Figura 15).

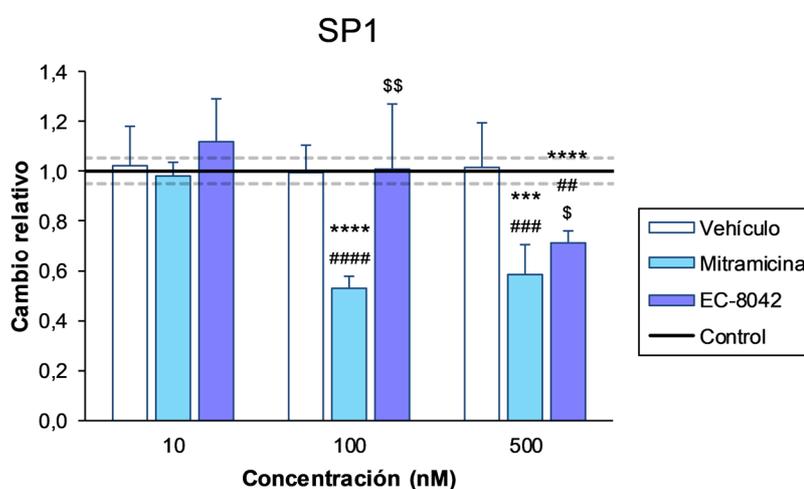


Figura 17. Efecto de EC-8042 y mitramicina a diferentes concentraciones sobre la expresión de SP1 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: *** < 0,001; **** < 0,0001. p vs. Vehículo: ### < 0,01; #### < 0,001; ##### < 0,0001. p vs. Mitramicina: \$ < 0,05; \$\$ < 0,01).

Seguidamente se determinaron, también por PCR cuantitativa, los niveles de expresión del mRNA del colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1). El gen que codifica esta proteína es una diana de SP1, ya que se ha descrito la presencia de secuencias ricas en G/C en su promotor a las cuales es capaz de unirse SP1 para regular positivamente su actividad transcripcional [233]. Además, se trata de un gen comúnmente expresado por las VSMCs, pues los diferentes tipos de colágeno son los componentes más abundantes de la matriz extracelular sintetizada por estas células en las paredes arteriales [234].

Las tres concentraciones de EC-8042 ensayadas produjeron cambios significativos en los niveles del mRNA de COL1A1 (Figura 18). Aunque la concentración más baja produjo un aumento significativo con respecto al control, pero no con respecto al vehículo, los cambios en la expresión de COL1A1 fueron significativos con respecto a ambos a 100 y 500 nM. Mientras que la concentración más alta redujo un 85% los niveles del mRNA con respecto al control, la concentración 100 nM produjo un descenso de alrededor del 30%. Con la mitramicina sucedió algo similar a lo descrito para

Resultados y discusión

SP1: mientras que el descenso en la expresión fue moderado a la concentración más baja, este fue muy notable a las dos concentraciones restantes, produciéndose una reducción de los niveles del mRNA de COL1A1 de aproximadamente un 85% con respecto a los del control. Se produjo un ligero incremento en la expresión de COL1A1 con el volumen de vehículo correspondiente a la concentración 10 nM, aunque no se observaron cambios significativos al aplicar los otros dos volúmenes de DMSO. En este caso, las condiciones que producen un mayor descenso en los niveles de expresión de COL1A1 se corresponden con aquellas en las que se observó un efecto tóxico para las células (Figuras 14 y 15), no asociándose a ningún efecto sobre la confluencia celular o la muerte por apoptosis el descenso más moderado registrado a 100 nM.

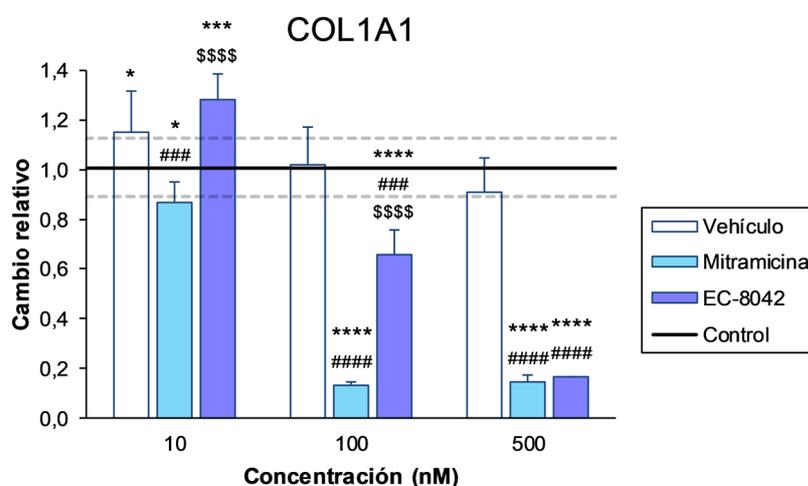


Figura 18. Efecto de EC-8042 y mitramicina a diferentes concentraciones sobre la expresión de COL1A1 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: * < 0,05; *** < 0,001; **** < 0,0001. p vs. Vehículo: ### < 0,001; #### < 0,0001. p vs. Mitramicina: \$\$\$\$ < 0,0001).

Por lo tanto, los efectos del compuesto EC-8042 sobre la transcripción de genes en las VSMCs son dependientes de la concentración al igual que sucede con la mitramicina [173], produciéndose con el mitralógico a 100 nM una inhibición de la expresión de dianas de SP1 como COL1A1 sin afectar al factor de transcripción, la cual no parece repercutir sobre la viabilidad celular. Por consiguiente, el efecto producido por EC-8042 a la concentración 100 nM podría ser útil a la hora de bloquear la transcripción dependiente de SP1 de genes osteogénicos durante la calcificación vascular.

La reducción de la expresión de COL1A1 por parte de la mitramicina y su análogo EC-8042 se explica por el mecanismo de acción de estos compuestos, es decir, su unión a regiones ricas en G/C tales como aquellas a las que se une el factor de transcripción SP1 para regular la expresión de sus genes diana. Los compuestos se unen al sitio al que se uniría SP1, impidiendo así que tenga lugar la activación de la transcripción promovida por este.

En principio, no se esperaría que la reducción observada en los niveles del mRNA de SP1 se interpretase por esta explicación. Sin embargo, se ha descrito la presencia de secuencias SP1 en el promotor del gen que codifica esta proteína, lo cual provoca su autorregulación positiva [235]. Los compuestos estarían, por tanto, bloqueando este fenómeno. El menor efecto de los mismos en este caso podría explicarse por la compleja regulación transcripcional de SP1. Se trata de una proteína expresada de forma ubicua y con multitud de genes diana, en cuya expresión intervienen también otros miembros de la familia *specificity protein* [236].

4.3.1.2. EC-8042 100 nM no altera los niveles proteicos de SP1

A continuación, se comprobaron también los efectos del mitralógo sobre la expresión de SP1 a nivel proteico mediante *Western Blot*. El compuesto EC-8042 a la concentración 500 nM provocó una reducción del 60% de los niveles de proteína SP1 con respecto a los de las células cultivadas con un volumen equivalente de vehículo (Figura 19). En cambio, la expresión proteica de SP1 se mantuvo similar a la del grupo tratado con vehículo con las dos concentraciones restantes. Asimismo, se determinó que la mitramicina a 100 nM reducía los niveles de proteína SP1, confirmando las diferencias observadas a esta concentración a nivel de mRNA. En realidad, todos estos resultados concuerdan con los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa (Figura 17). Se puede descartar, por tanto, que las concentraciones ensayadas del compuesto EC-8042 o la mitramicina hayan provocado la degradación de SP1 dependiente de proteasoma como se ha descrito previamente [232].

Por último, contrastando estos resultados con los de los apartados anteriores se puede ver cómo las condiciones en las que se detectaron aumentos en el porcentaje de células apoptóticas (Figura 15) acompañadas de reducciones en la confluencia de las VSMCs en cultivo (Figura 14) son, además, aquellas en las que se inhibió la transcripción de SP1 y se redujeron sus niveles proteicos. Efectivamente, la reducción de la expresión de la proteína SP1 en células tratadas con RNAs de interferencia se ha visto acompañada de descensos en la viabilidad y tasas elevadas de apoptosis mediada por caspasas [232]. Por tanto, la mitramicina a las concentraciones 100 y 500 nM y el análogo a 500 nM provocarían los incrementos observados en el porcentaje de células apoptóticas por este mecanismo, siendo entonces el mantenimiento del mensajero y proteína del factor de transcripción SP1 con EC-8042 a 100 nM una garantía para el uso terapéutico del mitralógo.

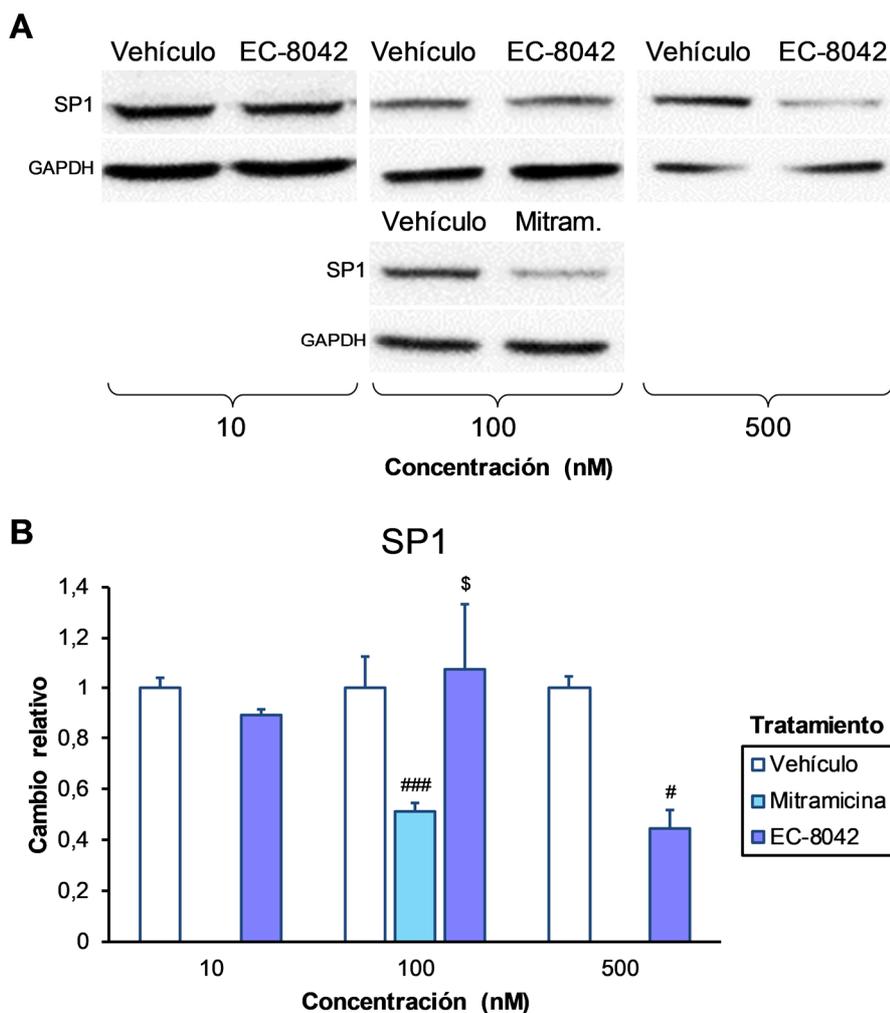


Figura 19. Efecto de EC-8042 a diferentes concentraciones sobre los niveles proteicos de SP1 en las células A7r5. A: bandas representativas del Western Blot. B: cuantificación de la intensidad de las bandas. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Vehículo: # < 0,05; ### < 0,001. p vs. Mitramicina: \$ < 0,05).

4.3.2. EC-8042 es capaz de prevenir los cambios en los niveles de expresión de RUNX2 y TGF-β3 de las VSMCs en condiciones calcificantes, probablemente a través de la regulación de miRNAs osteogénicos en lugar de dianas de SP1

Una vez elegida una concentración del mitralógico con la que tratar las VSMCs, se pasó a aplicar este compuesto a un modelo *in vitro* de calcificación vascular. Puesto que en un paciente con calcificación en sus arterias (o con riesgo elevado de tenerla) el estímulo necesario para que esto se produzca ya estaría presente antes de recibir un tratamiento, el compuesto no se aplicó desde el momento en el cual se comenzó a tratar la línea celular de VSMCs con medio calcificante. El mitralógico se administró a partir de la mitad del tiempo necesario para que las células adquiriesen un fenotipo osteogénico. Se aplicó también al modelo un volumen equivalente de DMSO para descartar la influencia del vehículo.

Los experimentos de calcificación se finalizaron cuando se observaron cambios morfológicos en las VSMCs al microscopio (Figura 20). Como se puede ver, las células presentaron en todas las condiciones en las cuales había un estímulo calcificante un aspecto diferente a las cultivadas con medio control. Sin embargo, su confluencia en las condiciones CaP y CaP + Vehículo era menor que en la condición en la cual se añadió EC-8042 al medio CaP. Esto sugiere que el mitralógo fue capaz de contrarrestar, al menos en parte, el efecto tóxico que producen el calcio y el fosfato sobre las VSMCs.

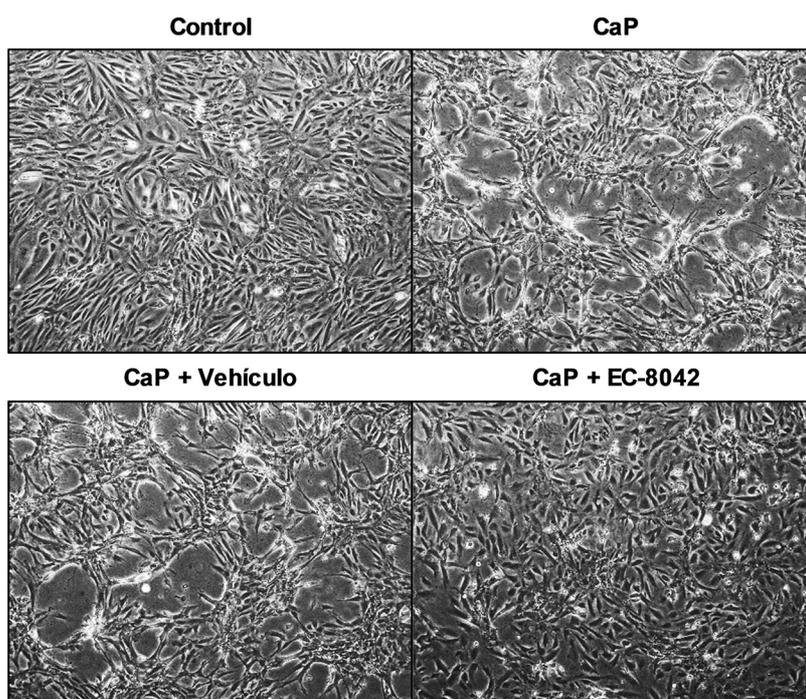


Figura 20. Morfología al microscopio de las células A7r5 cultivadas con las diferentes condiciones aplicadas al modelo de calcificación. Las imágenes se tomaron en el momento en el que se finalizó el experimento. Aumento: 40X.

Se cuantificó a continuación el calcio depositado sobre las células cultivadas con las diferentes condiciones. La concentración elevada de calcio y de fosfato provocó un incremento significativo del calcio depositado con respecto al control en todos los casos en los cuales estaba presente (entre 130 y 230 $\mu\text{g Ca/mg}$ proteína total, frente a 3 $\mu\text{g Ca/mg}$ proteína total, Figura 21). En cambio, la adición del mitralógo al estímulo calcificante no consiguió equiparar la cantidad de calcio depositada a la de las células con medio control, siendo el depósito de calcio en la condición CaP + EC-8042 similar al de la condición CaP. Además, esta tendencia no se corresponde con las marcadas diferencias morfológicas que se podían observar al microscopio entre las células tratadas con el mitralógo y el resto de las cultivadas con medio calcificante (Figura 20), por lo que la acción de EC-8042 sobre las VSMCs parece ser independiente de la formación de depósitos de calcio.

Al contrario de lo aquí descrito, Zhang y colaboradores documentaron la capacidad de la mitramicina para reducir significativamente la cantidad de calcio depositado por VSMCs cultivadas en condiciones calcificantes [173]. En la citada investigación, el compuesto no solo redujo drásticamente

Resultados y discusión

la cantidad de calcio depositado, sino que además consiguió que la magnitud de los depósitos se asemejase más a la del grupo control que a la de un grupo tratado solamente con el estímulo calcificante. No obstante, es importante mencionar que en la antedicha publicación este estímulo es diferente (β -glicerofosfato) y la mitramicina se añadió desde el inicio del experimento de calcificación, pues en ese caso no se querían emular los efectos de una posible terapia contra la calcificación vascular.

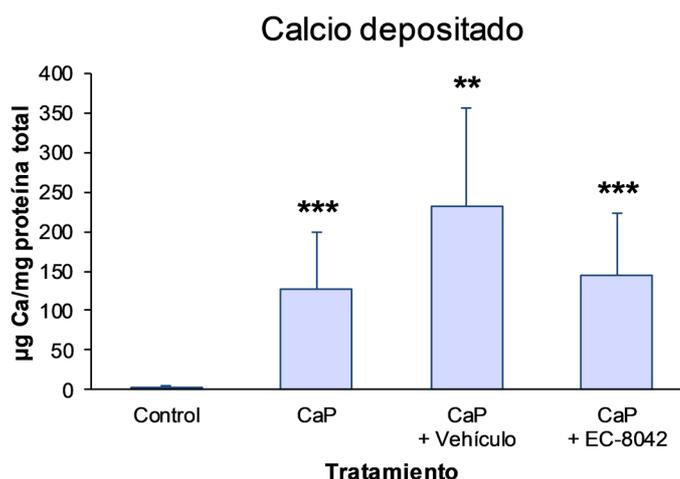


Figura 21. Efecto del compuesto EC-8042 en la cantidad de calcio depositado sobre las células A7r5 cultivadas con medio calcificante. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: ** < 0,01; *** < 0,001).

Posteriormente se analizaron los cambios a nivel génico que puede ejercer el compuesto EC-8042 en las células sometidas a estímulo calcificante. En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de tres promotores de la diferenciación osteoblástica y del cambio osteogénico asociado a la calcificación vascular: BMP2, Osterix y RUNX2. Mientras que no se pudo detectar el mRNA de BMP2 con el método utilizado (datos no mostrados), los niveles de expresión de Osterix y RUNX2 sí pudieron ser determinados. Así, el compuesto EC-8042 fue capaz de prevenir el aumento en la expresión de RUNX2 producido por el estímulo osteogénico (Figura 22), como ya está descrito con la mitramicina [173]. En este caso, se pasó de un incremento en los niveles del mRNA con respecto al control de alrededor de 2,5 o 3 veces con CaP o CaP + Vehículo a uno de aproximadamente 1,5 veces, una diferencia que ya no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, los niveles de expresión de Osterix parecieron responder únicamente a las concentraciones elevadas de calcio y fosfato y no se vieron afectadas por la exposición a EC-8042.

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de la histona deacetilasa 4 (HDAC4) y la isoforma 3 del TGF- β (TGF- β 3), también por PCR cuantitativa. Ambas proteínas actúan como inhibidoras de la diferenciación osteoblástica: TGF- β 3 es capaz de reprimir la actividad transcripcional de RUNX2 con la mediación de Smad3 [237], proceso en el cual colaboran histona

deacetilasas como HDAC4 [238]. Mientras que, al igual que sucedió con Osterix, los descensos en la expresión de HDAC4 solo respondieron al estímulo calcificante, el compuesto EC-8042 fue capaz de equiparar los niveles del mRNA de TGF- β 3 a los medidos en la condición control, contrarrestando el descenso del 40% producido por el medio CaP (Figura 23).

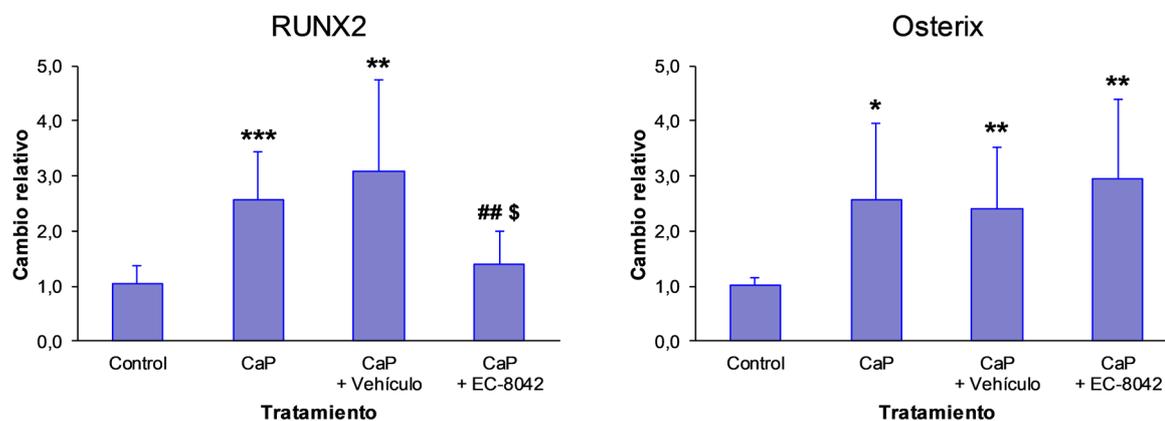


Figura 22. Efecto de EC-8042 sobre la expresión de promotores de la diferenciación osteoblástica medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001. p vs. CaP: ## < 0,01. p vs. CaP + Vehículo: \$ < 0,05).

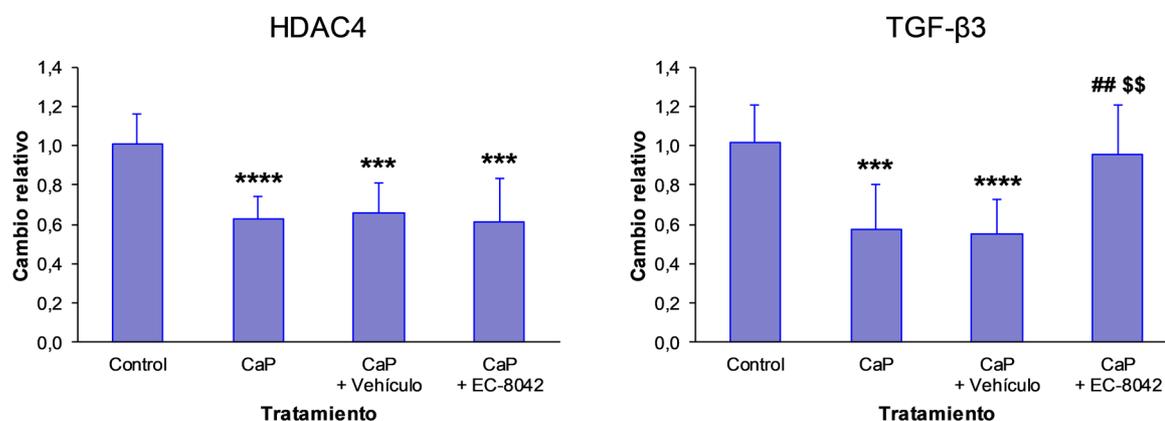


Figura 23. Efecto de EC-8042 sobre la expresión de inhibidores de la diferenciación osteoblástica medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: *** < 0,001; **** < 0,0001. p vs. CaP: ## < 0,01. p vs. CaP + Vehículo: \$\$ < 0,01).

Se determinaron también los niveles del mRNA de la alfa actina de músculo liso (ACTA2), clásico marcador de VSMCs cuya expresión se ve reducida en las células calcificadas, en las VSMCs cultivadas con las cuatro condiciones ya mencionadas. EC-8042 es capaz de prevenir parcialmente el descenso del 50% en la expresión de ACTA2 provocado por las concentraciones elevadas de calcio y fosfato (Figura 24), de nuevo como ya se ha descrito para la mitramicina [173].

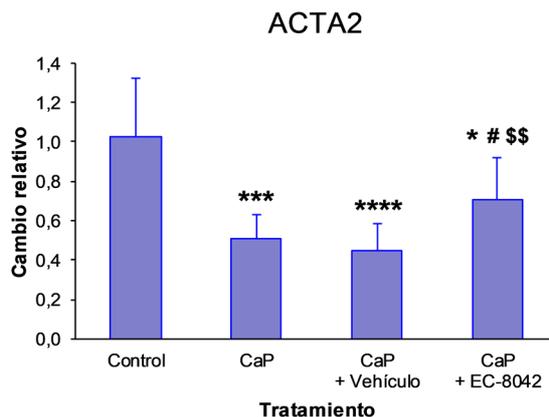


Figura 24. Efecto de EC-8042 sobre la expresión del marcador de VSMCs ACTA2 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: * < 0,05; *** < 0,001; **** < 0,0001. p vs. CaP: # < 0,05. p vs. CaP + Vehículo: \$\$ < 0,01).

Se analizaron después los niveles de expresión de SP1 y de su diana COL1A1. Curiosamente los niveles del mRNA de SP1 no se vieron alterados ni por el estímulo calcificante ni por el compuesto EC-8042 (Figura 25). Estos resultados contradicen lo descrito por Zhang y colaboradores en la única publicación de la que tenemos constancia que haya utilizado mitramicina para bloquear la calcificación [173], por la ausencia tanto de un incremento en la expresión de SP1 en condiciones calcificantes, como de la inhibición del mismo por parte del mitrólogo en las VSMCs. Es asimismo sorprendente que el mitrólogo no solamente no reduzca la expresión de COL1A1 en el modelo de calcificación como se esperaba a la vista de los resultados publicados, sino que además esta aumente con EC-8042 con respecto a CaP, condición que produjo un descenso del 60% en los niveles del mRNA.

Los datos mostrados hasta ahora estarían indicando, por un lado, que EC-8042 es capaz de prevenir, al menos parcialmente, el cambio osteogénico producido en las VSMCs sometidas a un estímulo calcificante como son las altas concentraciones de calcio y fosfato. Los cambios en la expresión de genes relacionados con este cambio fenotípico de las células coincide además con las diferencias en su morfología y confluencia observadas al microscopio: una menor confluencia y morfología en “valle y colina” con el medio CaP y CaP + Vehículo, y una mayor confluencia y morfología más similar a la del control con el medio CaP al que se añadió EC-8042. Esto convertiría a EC-8042 en candidato para ser utilizado a modo de terapia contra la calcificación vascular, pues la expresión de marcadores osteogénicos como RUNX2 y la morfología en “valle y colina” de las VSMCs se ha observado en asociación con una fase presenescente de estas células en modelos *in vitro* de envejecimiento vascular [239]. En caso de utilizarse con este propósito, no obstante, EC-8042 debería complementarse con otros métodos capaces de eliminar los depósitos minerales para evitar también la rigidez que estos provocan en los vasos de los pacientes con calcificación.

Por otro lado, los datos recogidos en este apartado indican también que los niveles de expresión del factor de transcripción SP1 no parecen influir en el cambio hacia un fenotipo osteoblástico de las VSMCs en el proceso de calcificación de las arterias. Esta observación, a pesar de haber sido documentada por una publicación científica reciente, es llamativa por el hecho de que, hasta entonces, la sobreexpresión de SP1 se había visto asociada a enfermedades de naturaleza neoplásica, las cuales implican hiperproliferación, y no un cambio fenotípico como el que se produce durante la transdiferenciación de las VSMCs hacia osteoblastos.

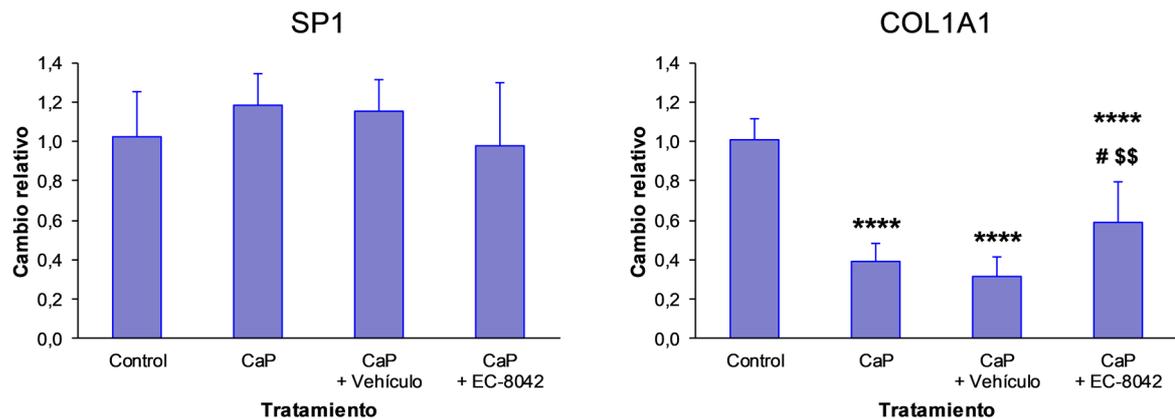


Figura 25. Efecto de EC-8042 sobre la expresión de SP1 y su diana COL1A1 medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: **** < 0,0001. p vs. CaP: # < 0,05. p vs. CaP + Vehículo: \$\$ < 0,01).

Finalmente, se analizaron también los niveles de expresión de los miRNAs que resultaron desregulados en el modelo animal de IRC. Tanto la expresión del miR-29b como la del miR-30c se vieron afectadas por la adición al medio de cultivo de concentraciones elevadas de calcio y fosfato (Figura 26). Los niveles de ambos miRNAs se vieron alterados por el medio CaP en la dirección que favorece el cambio osteogénico (aumento de alrededor del 60% sobre los niveles del control para el miR-29b y descenso del 30% sobre los niveles del control para el miR-30c). Por tanto, hay miRNAs cuya expresión se ve desregulada tanto por la ERC como por la calcificación vascular. Sin embargo, puesto que el estímulo en las ratas es diferente al aplicado a las células (no se les había proporcionado una dieta con alto contenido en fósforo a los animales) los cambios que los miRNAs sufren en cada modelo pueden ir en sentido opuesto. Además, la expresión de los dos miRNAs se vio modificada por el compuesto EC-8042, haciendo el mitrólogo que el miR-29b redujese sus niveles de expresión hasta equipararse al control y el miR-30c los aumentase, llegando a prevenir el cambio provocado por la condición CaP.

Más concretamente, en relación al miR-29b, estos resultados confirmarían la implicación del mismo en la calcificación vascular *in vitro* ya descrita por nuestro grupo [226]. También podrían explicar el descenso en la expresión de COL1A1 con CaP y la recuperación parcial de sus niveles de

Resultados y discusión

expresión con EC-8042, pues este tipo de colágeno no solamente ve disminuidos sus niveles proteicos con el miRNA, sino que la estabilidad de su mRNA se ve asimismo afectada [218].

Sin embargo, todos estos datos son insuficientes para establecer una relación causa-efecto entre la aplicación del compuesto y la regulación a la baja de la expresión del miR-29b y la regulación al alza del miR-30c, lo cual daría a los miRNAs la categoría de dianas terapéuticas. Además, sería necesario llevar a cabo un estudio que permitiese correlacionar los niveles circulantes de los miRNAs con los celulares, así como determinar si las VSMCs son capaces de liberarlos al ambiente extracelular para poder afirmar definitivamente que también sirven como biomarcadores.

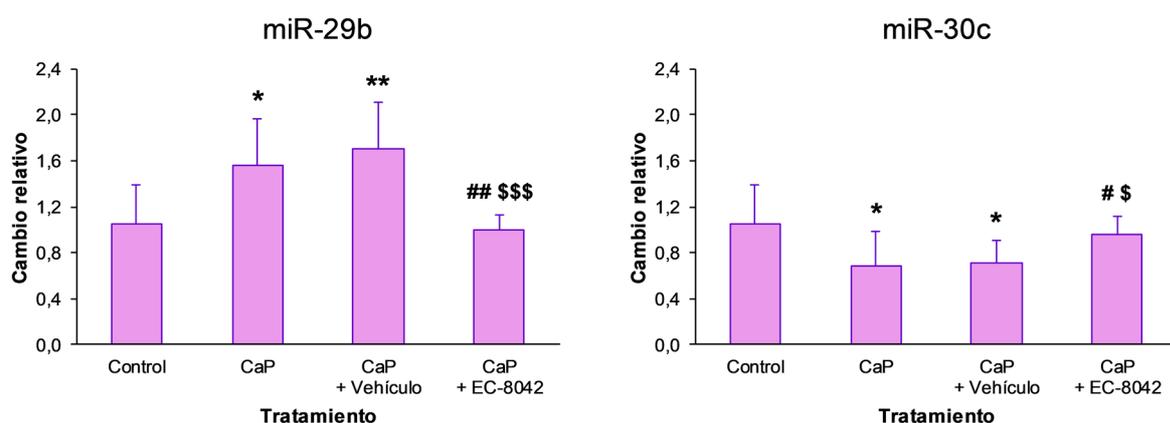


Figura 26. Efecto de EC-8042 sobre la expresión de miR-29b y miR-30c medida por PCR cuantitativa en las células A7r5 cultivadas con medio calcificante. Resultados procedentes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan las medias y las desviaciones estándar. Se utilizó la prueba t de Student para llevar a cabo las comparaciones (p vs. Control: * < 0,05; ** < 0,01. p vs. CaP: # < 0,05; ## < 0,01. p vs. CaP + Vehículo: \$ < 0,05; \$\$\$ < 0,001).

Por tanto, aunque sería necesario realizar más experimentos para determinar cuál es el mecanismo exacto por el cual el compuesto EC-8042 atenúa el cambio osteogénico de las VSMCs, los datos recogidos en la presente Tesis Doctoral parecen indicar que el mitrálogo actúa a través de la regulación de miRNAs implicados en este proceso, encontrándose entre ellos, al menos, el miR-29b y el miR-30c. Es importante destacar que miR-29b también promueve la calcificación de las VICs [240], lo cual abre la puerta al traslado de nuestros resultados a otros tipos de calcificación ectópica, como por ejemplo la que ocurre en las válvulas cardiacas.

Para comprobar si la regulación de estos dos miRNAs por parte del mitrálogo podría producirse por la unión del compuesto a regiones ricas en G/C como las que reconoce SP1, se buscó la presencia de este tipo de secuencias en los promotores de los genes que codifican los miRNAs. Se obtuvieron para ello las secuencias de referencia de las regiones 3.000 pares de bases aguas arriba del inicio de la transcripción del gen *Mir29b1* y las dos copias del gen *Mir29b2* (en los cromosomas 1 y 13, respectivamente), que producen el miRNA maduro miR-29b-3p en la rata, y *Mir30c1*, que produce el miR-30c-5p en este animal, en el navegador del genoma de la Universidad de California en Santa Cruz

(<https://genome.ucsc.edu/>) [241]. En efecto, la base de datos de JASPAR 2018 (<http://jaspar.genereg.net/>) [242] identificó al menos un sitio consenso de unión de SP1 en cada una de las regiones promotoras analizadas (Figura 27).

Sin embargo, y a la vista de nuestros resultados, aunque es probable que EC-8042 se esté uniendo a tales secuencias, el efecto que ejerce sobre la transcripción de los miRNAs regulados por las mismas no puede deberse al bloqueo de la unión de la proteína SP1 al DNA. Esta regulación transcripcional quizás esté mediada por algún otro factor de transcripción, activador o represor, capaz de reconocer las mismas secuencias que SP1. Algunos autores han descrito que Osterix, miembro de la familia *specificity protein* y también conocido como SP7, ejerce sus funciones mediante la unión a regiones ricas en G/C [243-246], aunque recientemente se ha sugerido que este actúa de forma diferente, uniéndose a regiones ricas en A/T a través de la formación de complejos con proteínas de la familia DLX [247]. Además, se han identificado una serie de miRNAs controlados por Osterix entre los cuales se encuentran algunos que tienen a RUNX2 como diana [248]. Por otro lado, factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs), pertenecientes a la misma familia que SP1 y SP7, regulan el cambio osteogénico de las VSMCs inducido por concentraciones elevadas de fosfato [249, 250], pudiendo asimismo estar participando en la regulación de la expresión génica que hemos observado en nuestros experimentos. Es necesario, en consecuencia, continuar realizando experimentos encaminados a dilucidar la manera por la que EC-8042 atenúa el cambio osteogénico de las VSMCs durante la calcificación si se quisiese desarrollar un tratamiento farmacológico basado en este compuesto.

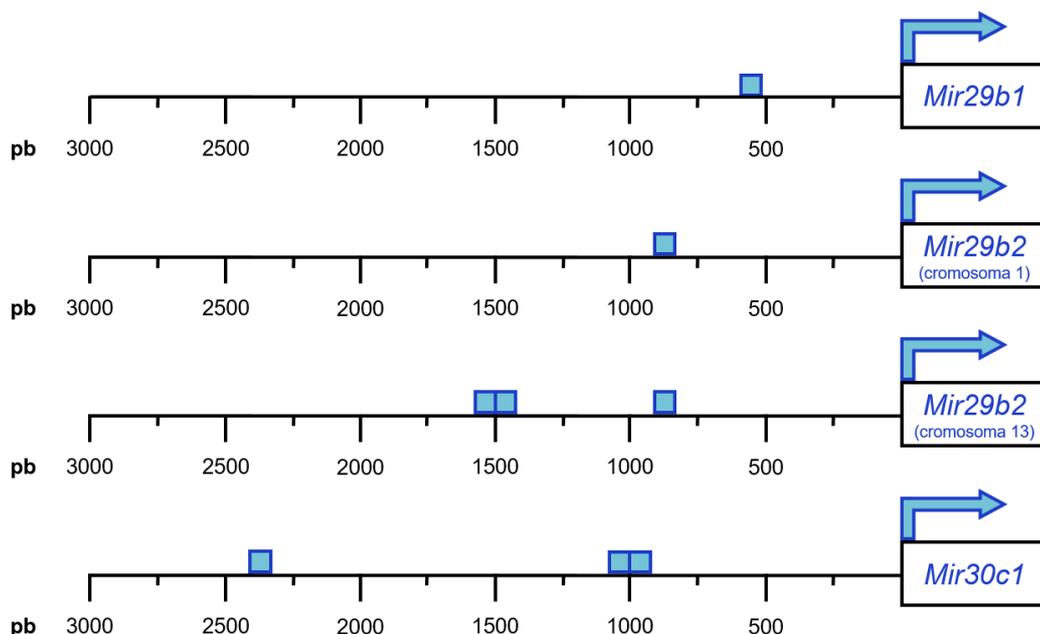


Figura 27. Posición de los sitios consenso de unión del factor de transcripción SP1 en los promotores de los genes Mir29b1, Mir29b2 (en los cromosomas 1 y 13) y Mir30c1 de *R. norvegicus*. pb= pares de bases.

4.4. La calcificación de las válvulas aórticas podría estar dirigida por exosomas producidos por los macrófagos, viéndose además la cantidad de estas vesículas incrementada en la circulación de los pacientes con calcio en sus velos

Aparte de las células de las paredes arteriales, las células de otros tejidos blandos también ven modificado su fenotipo a uno con características similares a las de las células del hueso a la par que se produce el depósito de calcio. Como ya se explicó en la introducción, la válvula aórtica sufre estos cambios patológicos bajo determinadas circunstancias como pueden ser la edad avanzada o la ERC. Se recogen a continuación una serie de experimentos realizados con el objetivo de estudiar con mayor profundidad este proceso.

4.4.1. La cuantificación de la extensión de los depósitos minerales presentes en los velos valvulares por medio de parámetros de histomorfometría ósea es indicativa de su grado de degeneración tisular

4.4.1.1. Hay una elevada correlación entre BMD y BV/TV en las válvulas a pesar de existir diferencias en la distribución de sus valores

Con el objetivo de estudiar el proceso de calcificación de la válvula aórtica, se cuantificó la extensión de los depósitos de calcio de velos procedentes de cirugías de reemplazo mediante microCT [251]. Esta técnica se ha aplicado previamente a válvulas extirpadas, permitiendo así demostrar la similitud entre los depósitos presentes en las mismas y el hueso [252] o la existencia de un mayor número de estos en las válvulas estenóticas de anatomía tricúspide que en las bicúspides [253]. Asimismo, se ha demostrado la correlación de las medidas que pueden obtenerse a partir de microCT con la evaluación ecocardiográfica de la severidad de la estenosis [253, 254]. En nuestro caso se tuvieron en cuenta dos variables: la densidad mineral ósea (BMD) y el ratio volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV), parámetros clásicamente utilizados en el campo de la histomorfometría ósea para determinar la calidad del tejido óseo [255]. Mientras que BMD es indicativa de la densidad promedio a la cual se presenta la hidroxiapatita en el volumen total del velo, BV/TV indica qué proporción de este volumen es ocupada por el mineral.

Puesto que las muestras estudiadas proceden de 57 pacientes con diversos tipos de valvulopatía aórtica, no únicamente estenosis severas, se esperaba conseguir una colección de muestras que fuese representativa de todo el espectro posible de calcificación de la válvula aórtica. Por ello, y antes de comenzar a trabajar con las mencionadas variables, se determinó si la distribución de las medidas tomadas para las mismas se ajustaba a la normal, para lo cual se hicieron sendas representaciones de los valores de BMD y BV/TV frente a los que tomaría una distribución normal estándar, es decir, cuyo valor promedio es cero (Figura 28). Este tipo de gráfico se denomina gráfico cuantil-cuantil o *QQ-plot*, y permite observar con facilidad cuánto se acerca la distribución de un determinado conjunto de datos a una distribución ideal.

La elevada frecuencia de ceros con los que cuenta la variable BMD impide que su distribución pueda considerarse normal, mientras que la variable BV/TV se ajusta bastante mejor a este tipo de distribución. Además, y como consecuencia del límite de sensibilidad con el que el tomógrafo es capaz de medir la densidad de hidroxapatita, los valores que alejan a BMD de la normalidad son ceros absolutos en lugar de valores muy pequeños próximos al cero. Por tanto, la normalización de la variable por medio de una transformación de sus valores (por ejemplo, $\log [x+1]$) no facilitaría su manejo estadístico, pues lo único que conseguiría sería desplazar la cola de ceros a otro punto del eje de ordenadas.

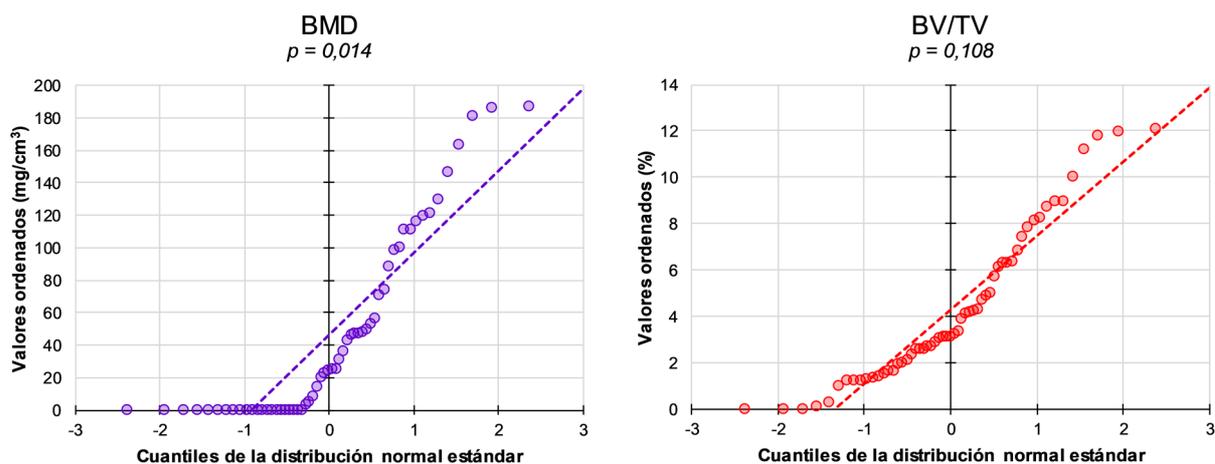


Figura 28. Ajuste a la distribución normal estándar de los valores registrados para BMD y BV/TV de los velos valvulares aórticos. Cada punto de los gráficos representa el velo de un paciente. La proximidad entre los puntos, así como la posición de los mismos con respecto a la línea discontinua, indican la similitud existente entre la distribución de los datos y una campana de Gauss centrada en el valor 0. Se muestra también la significación estadística (p -valor) del ajuste a la distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov.

Se comprobó a continuación que existe una correlación positiva entre BMD y BV/TV (Figura 29). Esto restaría importancia al hecho de que BMD no siga una distribución normal, pudiendo servir como justificante para realizar el mismo tratamiento estadístico de los datos con las dos variables cuando se maneje la muestra completa.

Por otro lado, es importante destacar el hecho de que la línea de tendencia resultante cruce el eje de abscisas, es decir, que el modelo de regresión lineal no contemple la existencia de válvulas con ausencia total de un volumen correspondiente a depósitos de calcio ($BV/TV = 0$) entre las extirpadas y, por tanto, enfermas. Esto indica también que hasta que los depósitos no alcanzan un determinado volumen (alrededor del 1,5% del total del velo), la BMD es tan pequeña que el tomógrafo no es capaz de detectarla. Según esta hipótesis, una vez hayan alcanzado este tamaño mínimo, la densidad media de hidroxapatita en las válvulas irá incrementando de manera proporcional al volumen de sus depósitos. Podría deducirse de esto que la calcificación en las válvulas tiene un origen disperso, afectando a la BMD solamente cuando los núcleos donde se haya depositado hidroxapatita cobren una cierta entidad. Es necesario, no obstante, corroborar la validez de esta hipótesis mediante la correlación de las medidas de BMD y BV/TV con los cambios ocurridos en el tejido.

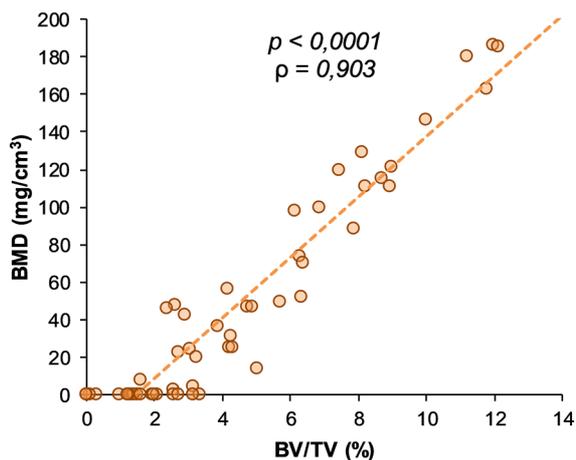


Figura 29. Correlación entre las variables BMD y BV/TV. Cada punto del gráfico representa un velo de un paciente. La línea discontinua se corresponde con el modelo de regresión lineal que explica la relación de los valores que toman las variables. Se muestra la significación estadística de la correlación (p -valor), así como el valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ).

4.4.1.2. BV/TV aumenta de manera paralela a la progresión de la degeneración del tejido valvular, mientras que BMD solamente discrimina las válvulas más calcificadas del resto

Se seleccionaron los 20 velos situados en los extremos del espectro de calcificación de acuerdo con los dos parámetros de histomorfometría ósea (10 de entre los más calcificados y 10 de los menos calcificados) para determinar si existe una relación entre estas medidas y los cambios sufridos por el tejido valvular aórtico durante la calcificación. Una vez incluidos en parafina y realizados los cortes, se realizó una tinción de orceína de las muestras seleccionadas para seguidamente realizar una gradación de la degeneración tisular de los velos con respecto a las pautas descritas por Warren y Yong [87], ya mencionadas en la introducción, atendiendo principalmente a los componentes de la matriz extracelular. Como se observa en la Figura 30, las válvulas a las cuales se asignó el grado 1 de la escala mantenían intacta la característica estructura en tres capas de su matriz extracelular. Las clasificadas como de grado 2 presentaban, en cambio, algún depósito en la capa fibrosa, aunque sus dimensiones no llegaban a afectar a las demás capas. En los velos de las válvulas de grado 3, el tamaño de los depósitos era tal que estos provocaban un engrosamiento notable de las capas fibrosa y esponjosa, aunque no llegaban a afectar al tejido elástico, que aun así se veía deformado y desplazado. Por último, en los velos de las válvulas en el último estadio de degeneración (grado 4) la capa ventricular también se veía afectada, pudiendo encontrarse en ellos algún punto en el cual se perdía la continuidad de las fibras de elastina a lo largo del eje longitudinal del velo.

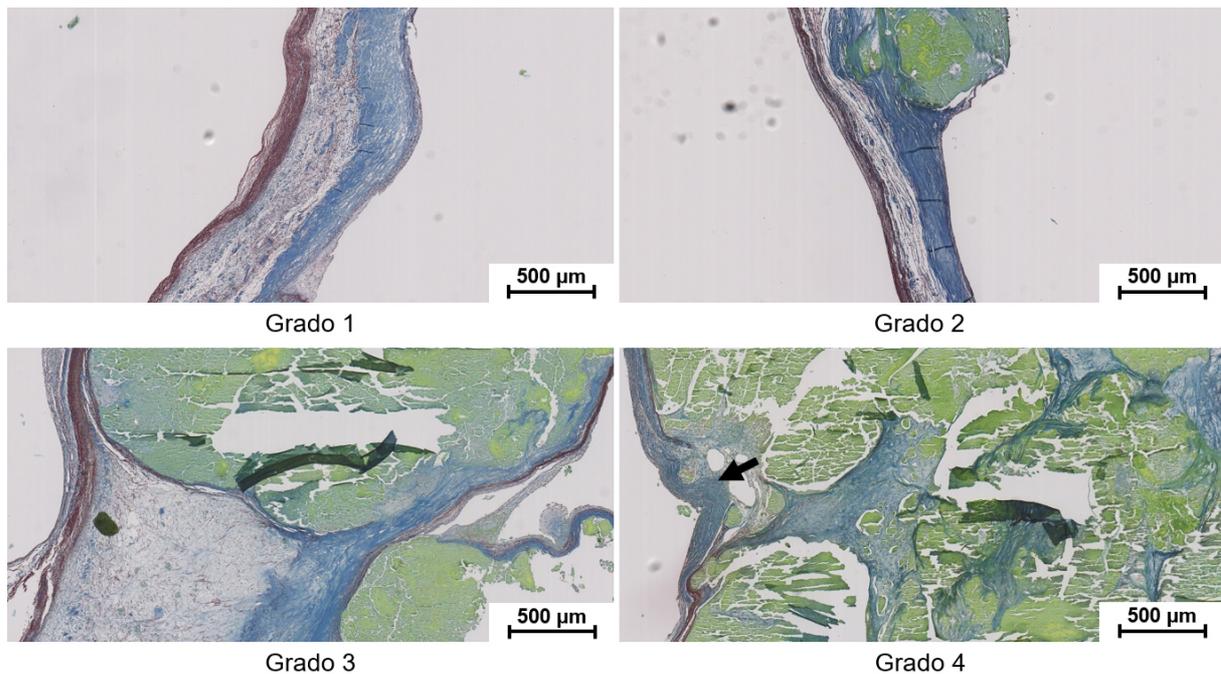


Figura 30. Estado de la matriz extracelular de cuatro válvulas aórticas correspondientes a cada estadio de la escala de Warren y Yong. Los componentes de la matriz extracelular de las válvulas se diferenciaron gracias a la tinción de orceína: las fibras elásticas muestran un tono morado; el colágeno, azul; y la matriz que soportaba el mineral depositado en los velos, un tono verdoso. Esto permite localizar la capa ventricular en el lado izquierdo de cada imagen. La flecha indica un punto de ruptura de las fibras elásticas en esta capa. Las imágenes fueron tomadas con los mismos aumentos.

Puesto que siguiendo este criterio se obtuvo un número muy reducido de válvulas en los dos primeros grados de la escala, probablemente como consecuencia del carácter patológico de todas las muestras, los velos se agruparon en tres grupos para que hubiese un número similar de muestras en cada uno de ellos (6, 7 y 7).

Se encontraron diferencias significativas entre los tres grados de degeneración del tejido con respecto a la extensión de sus depósitos de calcio (BMD: la mediana para el grado 1-2 fue 0,0; para el grado 3 fue también 0,0 y para el grado 4 fue 129,1 mg/cm³. BVTV: la mediana para el grado 1-2 fue 0,2; para el grado 3 fue 1,5 y para el grado 4 fue 9,0%. Figura 31). Sin embargo, y atendiendo a las diferencias estadísticas entre parejas de grupos, mientras que los tres grados son diferentes con respecto a BV/TV, la diferencias globales en la BMD solamente se deben a las diferencias entre el grado 4 y el resto de grupos. Por ello, los velos podrían agruparse en dos categorías según su BMD, tal y como se muestra en la Figura 32. Podría decirse entonces que la cuantificación de la extensión de los depósitos de calcio mediante BV/TV es más útil a la hora de clasificar los velos en relación a la progresión de la calcificación, pues fue capaz de discriminar los grupos en los cuales se dividieron las muestras mejor que BMD. Además, estos datos otorgan validez a los parámetros de histomorfometría ósea a la hora de asignar un valor numérico a la extensión de los depósitos de calcio en el tejido blando, ya que los valores aportados por las dos variables elegidas en esta Tesis Doctoral guardan relación con lo sucedido en el tejido valvular.

Resultados y discusión

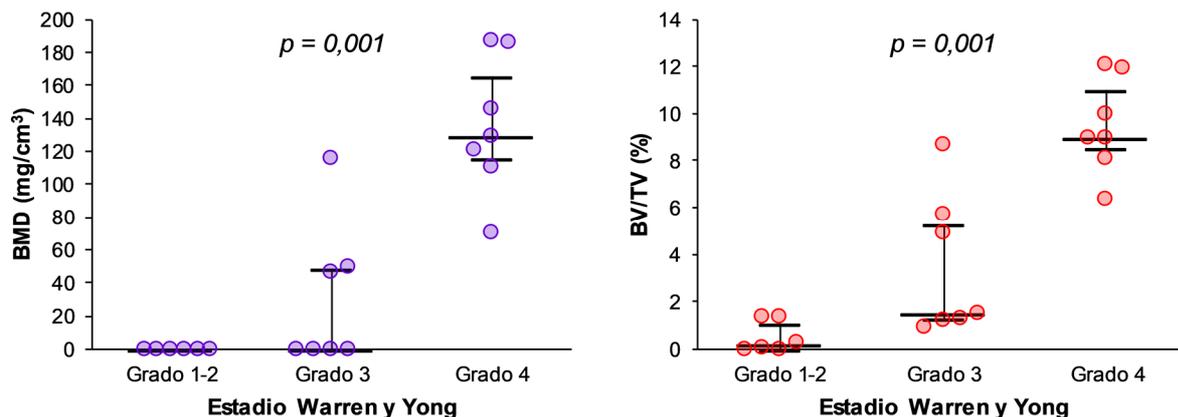


Figura 31. Valores de BMD y BV/TV según el grado de degeneración del tejido valvular evaluado mediante la escala de Warren y Yong. Cada punto del gráfico indica el valor de la variable en el velo de un paciente. Se representan la mediana y el rango intercuartílico. Se muestra la significación estadística (p-valor) de las diferencias entre los tres grupos según la prueba de Kruskal-Wallis.

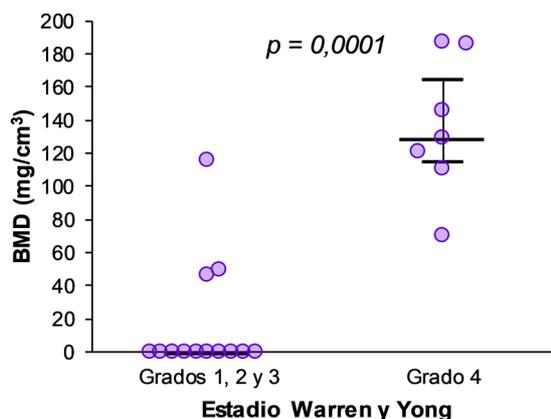


Figura 32. Valores de BMD para los dos grados de degeneración del tejido según los estadios de Warren y Yong agrupados. Cada punto del gráfico indica el valor de la variable en el velo de un paciente. Se representan la mediana y el rango intercuartílico. Se muestra la significación estadística (p-valor) de las diferencias entre los dos grupos según la prueba U de Mann-Whitney.

La distinta forma en que BMD y BV/TV se relacionan con la degeneración de la matriz extracelular viene a confirmar lo que sugería la distribución comentada en el apartado anterior, es decir, un posible origen disperso de la calcificación en las válvulas. Este podría ser uno de los aspectos similares entre la calcificación de las válvulas y las arterias, pues se ha descrito en numerosas ocasiones la presencia de microcalcificaciones en las paredes arteriales, las cuales pueden estar compuestas por cristales con un tamaño de solamente unos pocos nanómetros, como se ha observado en la túnica media de arterias procedentes de pacientes en diálisis [256]. Estas calcificaciones de pequeño tamaño también se encuentran en las lesiones ateroscleróticas, incluyendo las más tempranas, donde preceden al incremento en la expresión de proteínas reguladoras de la calcificación [257].

4.4.2. Proteínas indicadoras de diferenciación osteoblástica, neovascularización, inflamación y presencia de exosomas están presentes en las regiones próximas a los depósitos de calcio de los velos valvulares

Para profundizar en el estudio de los cambios que se producen en el tejido valvular durante el transcurso de la CAVD, se localizaron mediante inmunohistoquímica proteínas representativas de diferentes procesos celulares que acompañan a la formación de los depósitos de calcio en las válvulas. Se utilizaron con este motivo los mismos 20 velos seleccionados en el apartado anterior, los cuales también se tiñeron con hematoxilina y eosina para facilitar la observación de la morfología general del tejido.

Como se puede ver en la Figura 33, los depósitos de calcio (columna central, muestra de grado 3 de Warren y Yong) se presentaron como regiones con una matriz extracelular compacta y amorfa, de gran afinidad para la eosina, en contraposición a la matriz de naturaleza fibrilar y organizada en capas del resto del velo. Los depósitos eran, además, mayoritariamente acelulares. En las válvulas sin depósitos detectables (columna de la izquierda, muestra de grado 1 de Warren y Yong) o en las regiones libres de los mismos de las válvulas en estado más avanzado de degeneración se observó una escasa positividad para todas las proteínas seleccionadas. En las válvulas con depósitos, por el contrario, se pudo observar la colocalización de todas las proteínas estudiadas en regiones vecinas a los depósitos de calcio, estando presentes algunas de ellas en cantidades muy abundantes.

Se aplicó a estas muestras un anticuerpo contra BMP2, proteína de conocida implicación en el cambio osteogénico asociado a los diferentes tipos de calcificación cardiovascular. En la segunda fila de la Figura 33 se puede observar cómo la mayoría de la positividad para BMP2 se detectó en grupos de células adyacentes a los depósitos.

Se localizó asimismo CD31 (*Cluster of Differentiation 31*), clásico marcador de células endoteliales y que, por tanto, permite distinguir los vasos neoformados de otras estructuras similares. En la tercera fila de la Figura 33 se aprecia cómo en ocasiones no se detectó CD31 ni siquiera en los bordes de los velos, aunque esta ausencia podría deberse al procesamiento de las muestras en lugar de al daño del endotelio, pues este está formado por una monocapa de células. Se observaron también acúmulos de vasos neoformados en las zonas próximas a los depósitos.

Se hizo igualmente en estos 20 velos una inmunohistoquímica para detectar CD68, comúnmente empleado como marcador de macrófagos, células presentes en los infiltrados inflamatorios de las válvulas (cuarta fila de la Figura 33). Se pudo observar algo de positividad para esta proteína en las regiones no mineralizadas, aunque se presentó de forma muy dispersa. En cuanto a las zonas cercanas a los depósitos, la tinción positiva para CD68 fue muy abundante en células que formaban acúmulos situados alrededor de las zonas con neovascularización. El hecho de que el grueso del marcaje para esta última proteína no colocalizase con las zonas con mayor concentración de tinción para BMP2 podría indicar que las células que expresan el marcador osteogénico son VICs y no procederían, por tanto, del sistema inmune.

Resultados y discusión

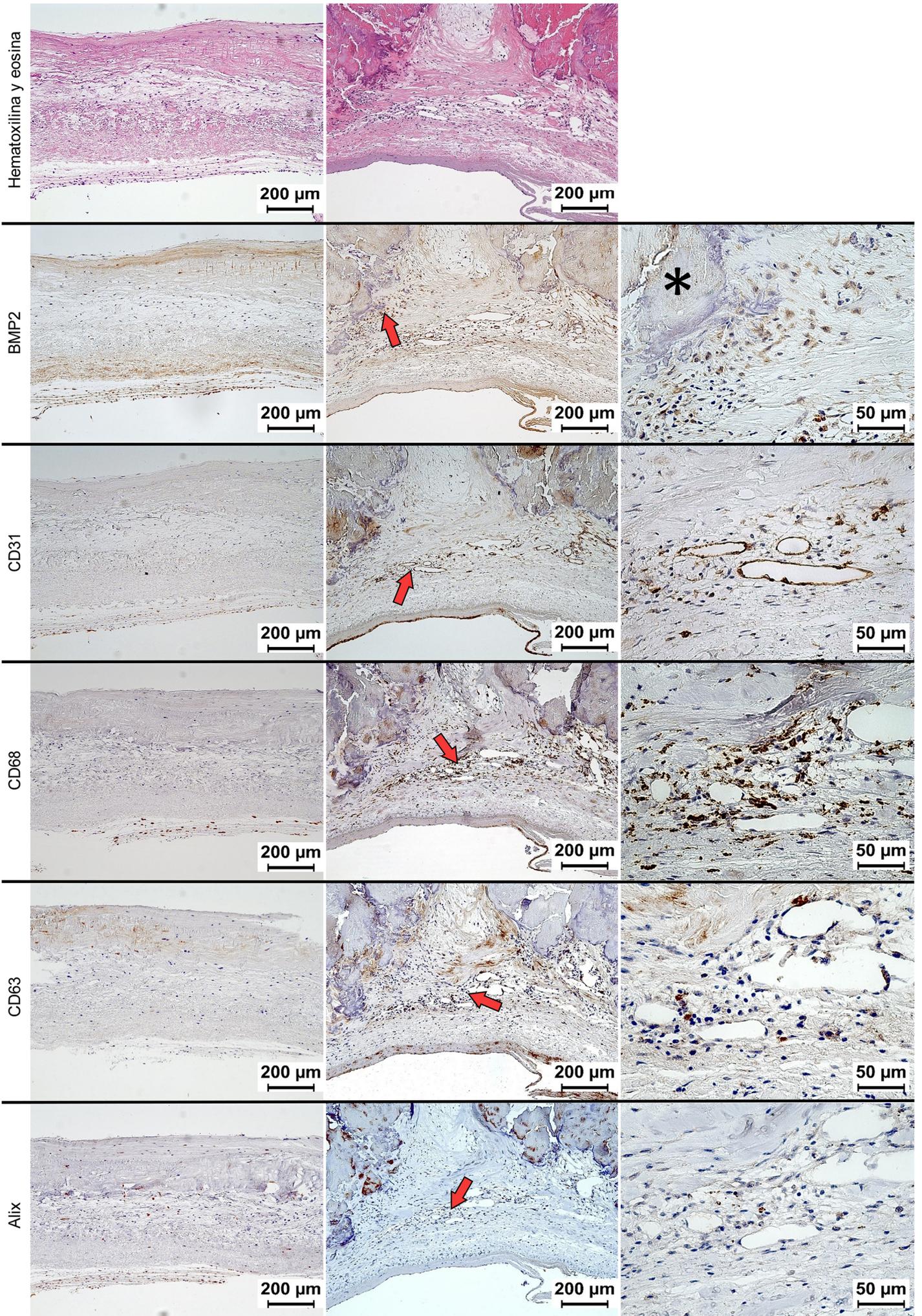
Por último, se localizaron en los velos valvulares CD63 y Alix, reconocidos marcadores de vesículas extracelulares [258]. Mientras que CD63 pertenece a la familia de las tetraspaninas, proteínas transmembrana presentes en estas vesículas e implicadas en la transducción de señales, Alix participa en la biogénesis de los exosomas [259]. Ambas proteínas se detectaron en las mismas regiones en las cuales se detectó el marcador de macrófagos, aunque su tinción positiva fue mucho más escasa (quinta y sexta filas de la Figura 33).

La actividad osteogénica, la neovascularización y la presencia de infiltrados inflamatorios en las válvulas aórticas patológicas son fenómenos bien caracterizados de la CAVD, como ya se mencionó en la introducción. Gracias a los resultados aquí descritos hemos podido demostrar la ocurrencia simultánea de todos ellos en las mismas regiones del tejido valvular. La presencia de BMP2 corrobora la necesidad de la vía de señalización mediada por la familia de las BMPs para el desarrollo de la calcificación de la válvula aórtica, la cual se ha verificado al inactivar genéticamente uno de sus receptores en un modelo animal y al cultivar VICs *in vitro* junto con un inhibidor específico [260]. En cuanto a la neovascularización, se ha demostrado la presencia de células progenitoras endoteliales en el tejido valvular patológico que promueven el remodelado del mismo y contribuyen a que el proceso de neovascularización tenga lugar [261, 262]. Además, se ha descrito previamente una estrecha relación de la inflamación con los vasos neoformados en las válvulas, favoreciendo estos últimos la llegada de los monocitos al tejido donde se transformarán en macrófagos [98].

Adicionalmente, nuestros resultados corroboran la implicación de las vesículas extracelulares en la calcificación de las válvulas. Aunque esto ya era conocido [263], en una investigación reciente se ha conseguido demostrar la colocalización de la proteína capaz de unir calcio anexina A6, enriquecida en los exosomas producidos por VICs cultivadas *in vitro* bajo estímulos calcificantes, con zonas de acumulación de vesículas en la matriz extracelular [264]. Asimismo, se sabe que los macrófagos infiltrados en las lesiones ateroscleróticas tienen la capacidad de secretar vesículas identificadas como exosomas [53], proceso que nosotros hemos localizado en el tejido valvular.

Todo esto podría estar indicando, por un lado, que los macrófagos juegan un papel importante en la calcificación de las válvulas, accediendo al tejido valvular desde la circulación a través de los vasos neoformados para secretar vesículas a la matriz extracelular que influyen sobre el fenotipo de las VICs. Por otro lado, también indicaría que el cambio osteogénico de las VICs estaría dirigiendo la formación de los nidos de calcificación. De hecho, BMP2, junto con el calcio y la PTH, es capaz de inducir la sobreexpresión de PiT-1 [265], transportador de fosfatos presente en las membranas de las vesículas procalcificantes.

Figura 33 (en la página siguiente). Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de proteínas implicadas en la enfermedad de la válvula aórtica calcificada. En la columna de la izquierda se recogen imágenes de una válvula en el grado 1 de la escala de Warren y Yong; en el centro, una región próxima a un depósito de calcio de una válvula en el grado 3; y a la derecha, un mayor aumento de la región mostrada en la columna central. Las flechas indican la situación de la región mostrada a más aumentos. El asterisco señala la posición del depósito de calcio.



4.4.3. Los niveles de expresión de BMP2 en el tejido valvular no se correlacionaron con la calcificación de los velos, pero sí con los niveles de expresión de MGP

Tras comprobar que BMP2 estaba presente en el tejido valvular, se decidió estudiar la correlación entre el grado de calcificación de las válvulas y la expresión de su mRNA determinada por PCR cuantitativa. Se extrajo para ello RNA de 22 válvulas elegidas de forma aleatoria de entre aquellas que contaban con la medida de la extensión de sus depósitos de calcio mediante microCT. Se analizaron también por PCR cuantitativa los niveles de expresión de MGP, uno de los más reconocidos e importantes inhibidores endógenos de la calcificación en los tejidos blandos [266] que ejerce sus funciones, en parte, gracias a la inhibición de BMP2 [267].

No hubo correlación entre la expresión de los genes y las dos variables indicativas de la cantidad de calcio depositada en las válvulas (Figura 34). Esto quizás pueda deberse al hecho de que los velos de los cuales se extrajo el RNA no eran los mismos en los que se realizaron el microCT y las inmunohistoquímicas, puesto que el tratamiento de las muestras requerido por estas técnicas las inhabilita para la correcta conservación del RNA. De hecho, se ha descrito la presencia de depósitos de calcio en diferentes estadios de desarrollo en cada uno de los velos de una válvula tricúspide [268], fenómeno que pudo haberse dado en los individuos cuyas válvulas fueron utilizadas en estos experimentos. De todas formas, también ha podido ocurrir que la proteína que aparece en el tejido valvular se haya sintetizado en otra localización y llegue a la válvula a través de los vasos neoformados. Como consecuencia, no se ha podido establecer una relación entre BMD y BV/TV y los niveles de expresión de genes implicados en la CAVD a pesar de la correspondencia con los cambios producidos a nivel tisular que demostraron los valores medidos para estas variables.

Seguidamente, para aumentar el tamaño muestral y tratar de ver correlación entre la expresión de BMP2 y MGP, se amplió la muestra con otras 14 válvulas procedentes de la segunda población de pacientes con valvulopatías. Se pudo observar una correlación positiva entre los niveles de expresión de ambos genes, la cual tiene además una elevada significación estadística (Figura 35).

A pesar de la contradicción que puede suponer el detectar niveles elevados de un inhibidor de la calcificación como MGP en muestras que también muestran una expresión elevada de un promotor del cambio osteogénico como BMP2, se han descrito previamente resultados similares. Se ha detectado en numerosas ocasiones un incremento en la expresión de MGP en placas ateroscleróticas en las paredes de las arterias [269-271], el cual se ha explicado por la existencia de un desfase entre la síntesis de la proteína y la γ -carboxilación de la misma, proceso que la vuelve biológicamente activa [257]. De hecho, se han detectado concentraciones elevadas de MGP en lesiones calcificadas de la pared aórtica de ratas envejecidas que, como consecuencia de sus bajos niveles de γ -carboxilación, no eran capaces de unir BMP2 para contrarrestar su actividad [272]. Por tanto, al igual que sucede en las arterias, la calcificación de las válvulas podría verse favorecida por la falta de γ -carboxilación de la MGP y, de hecho, se han detectado diferencias entre los niveles de la proteína descarboxilada en el plasma de individuos sanos y en el de pacientes con estenosis aórtica severa [273].

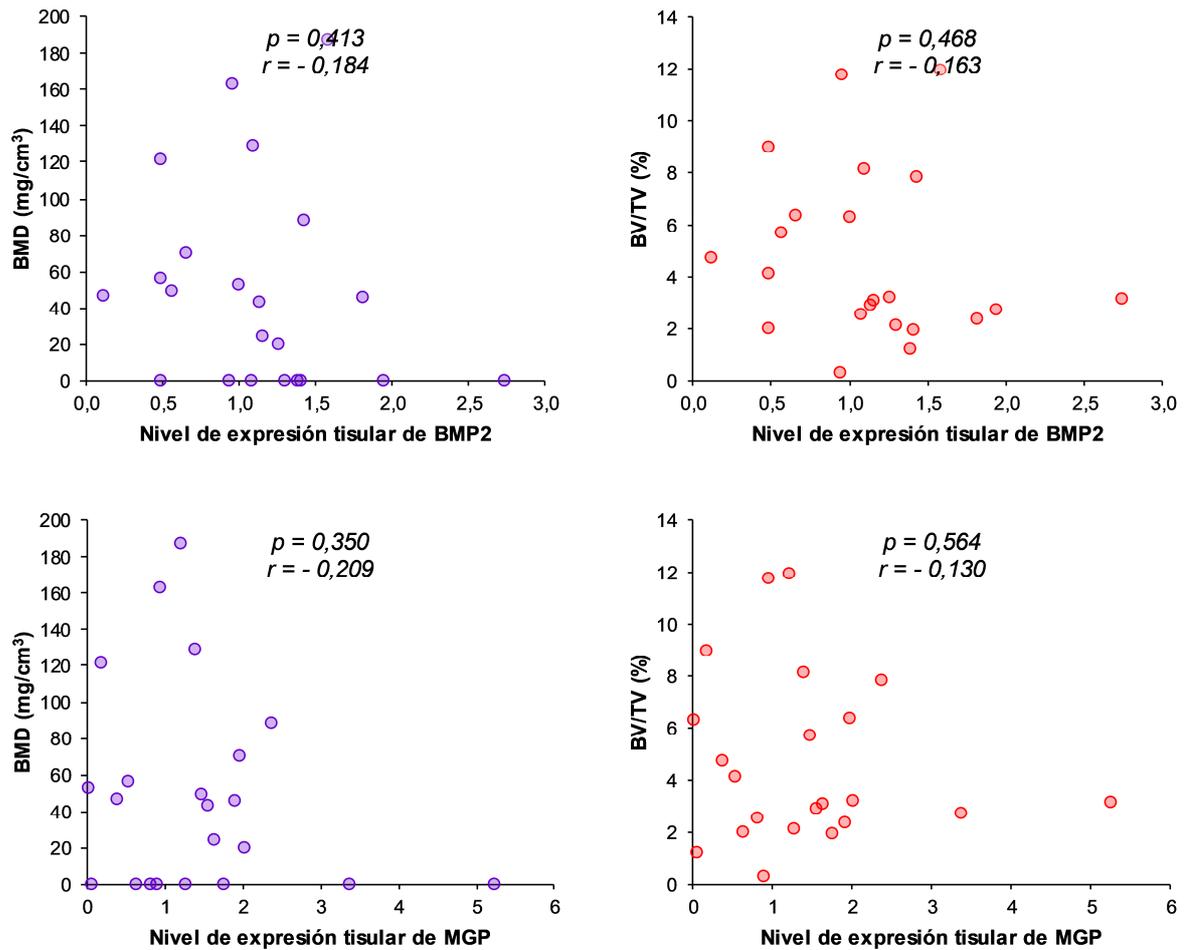


Figura 34. Correlación de los niveles de expresión de BMP2 y MGP en el tejido valvular con las variables BMD y BV/TV. Cada punto del gráfico representa el velo de un paciente. Se muestra la significación estadística de la correlación (p-valor), así como el valor del coeficiente de correlación de Pearson (r).

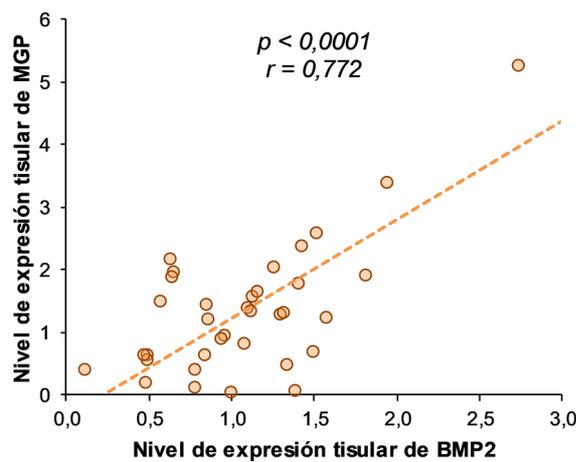


Figura 35. Correlación entre los niveles de expresión de BMP2 y MGP en el tejido valvular. Cada punto del gráfico representa el velo de un paciente. La línea discontinua se corresponde con el modelo de regresión lineal que explica la relación de los valores que toman las variables. Se muestra la significación estadística de la correlación (p-valor), así como el valor del coeficiente de correlación de Pearson (r).

4.4.4. El área ocupada por los macrófagos en los velos valvulares se asocia con la extensión de la calcificación

Para comprobar si, como las inmunohistoquímicas sugieren, los macrófagos están dirigiendo el proceso de mineralización, se decidió estudiar la asociación entre los mismos y la extensión de los depósitos de calcio presentes en las válvulas. Se cuantificó la tinción para CD68 como medida indicativa de la cantidad de macrófagos presentes en el tejido, pero también indirectamente como estimación de la cantidad de exosomas al colocarse el marcaje para CD68 con el de CD63 y Alix. No hay diferencias significativas en el área teñida entre los tres grados de degeneración, aunque sí se aprecia una tendencia a un aumento a medida que aumenta el grado de degeneración rozando la significación (mediana grado 1-2: 1,0%; grado 3: 1,8% y grado 4: 1,8 %. Figura 36).

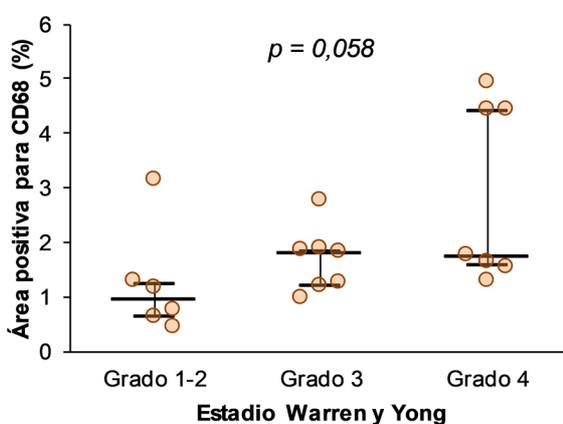


Figura 36. Relación entre el área con tinción positiva para CD68 y el grado de degeneración del tejido valvular evaluado mediante la escala de Warren y Yong. Cada punto del gráfico representa el velo de un paciente. Se han representado la mediana y el rango intercuartílico. Se muestra la significación estadística (p-valor) de las diferencias entre los grupos según la prueba de Kruskal-Wallis.

Se determinó a continuación si existía una correlación entre el área teñida mediante esta inmunohistoquímica y los parámetros de histomorfometría ósea y se vio que tanto BMD como BV/TV se correlacionan positivamente con el porcentaje del área con marcaje para CD68, aunque la significación estadística fue mayor con la primera variable (Figura 37).

Por tanto, los macrófagos, y por extensión la inflamación, podrían estar dirigiendo la mineralización en la CAVD. De hecho, es sabido que estas células son capaces de agravar la calcificación aterosclerótica y de las válvulas aórticas a través de la secreción de citoquinas inflamatorias como IL-6 o TNF- α , así como de favorecer la degradación y el remodelado de la matriz extracelular mediante la síntesis de diversas enzimas proteolíticas [274]. Además, como ya se ha mencionado, se ha descrito la presencia de exosomas derivados de macrófagos en placas ateroscleróticas. Adicionalmente, gracias a estudios *in vitro*, se ha podido determinar que las vesículas liberadas por estas células cuentan con la capacidad para nuclear hidroxipatita [53]. Asimismo, y gracias a la observación mediante microscopía electrónica de geles de colágeno a los

que se añadieron vesículas extracelulares procedentes de VSMCs cultivadas en condiciones osteogénicas, se pudo determinar que la agregación de estas vesículas origina calcificaciones [275]. Por estas razones, los exosomas derivados de macrófagos ya se han postulado como un factor que favorece la progresión de la calcificación [274] y se ha llegado a afirmar que la agregación de vesículas extracelulares derivadas de ellos resultaría en la acumulación de mineral en las placas ateroscleróticas [276].

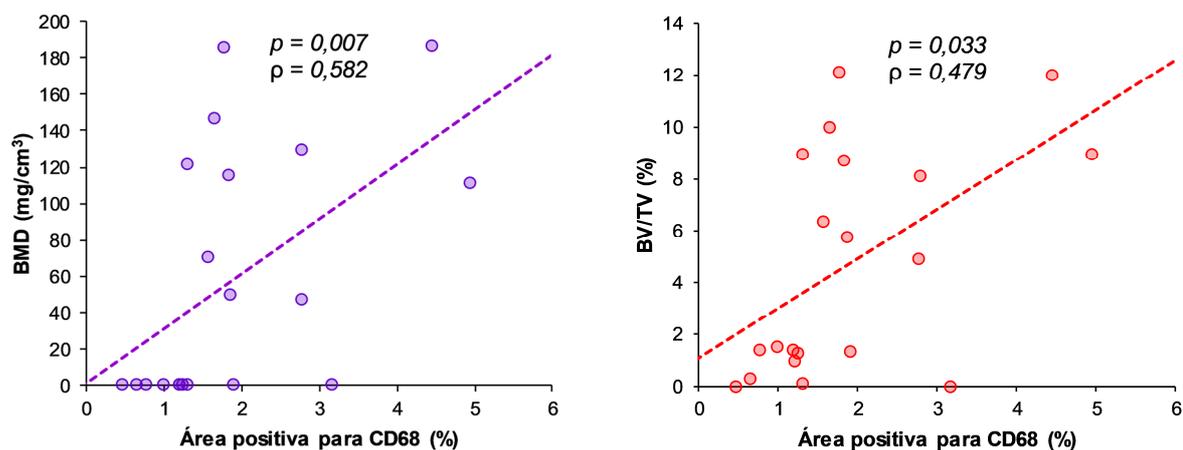


Figura 37. Correlación del área con tinción positiva para CD68 con BMD y BV/TV en el tejido valvular. Cada punto del gráfico representa el velo de un paciente. La línea discontinua se corresponde con el modelo de regresión lineal que explica la relación de los valores que toman las variables. Se muestra la significación estadística (p -valor) de la correlación, así como el valor del coeficiente de correlación de Spearman (ρ).

4.4.5. La cantidad de exosomas circulantes en el suero de los pacientes con valvulopatía aórtica se asocia con la presencia de depósitos de calcio en sus válvulas

Los resultados descritos en los apartados anteriores sugieren un papel central para los macrófagos en la progresión de la calcificación en las válvulas, el cual quizás tenga que ver con su capacidad para secretar vesículas extracelulares. Debido a la importancia que tendría este proceso, las vesículas extracelulares liberadas a la circulación podrían ser utilizadas como biomarcadores de la progresión de la CAVD. Por ello, se decidió cuantificar la cantidad de exosomas circulantes presentes en pacientes con valvulopatía aórtica.

En primer lugar, se probó el método elegido para detectar los exosomas en suero y plasma con el objetivo de determinar cuál de los dos tipos de muestras proporcionaba los mejores resultados. Este método se basa en la unión de las vesículas a *beads* o cuentas microscópicas capaces de captar exosomas mediante su unión a anticuerpos específicos anclados a su superficie. Una vez atrapados, los exosomas son cuantificados mediante la detección de la fluorescencia emitida por fluoróforos conjugados a otros anticuerpos específicos contra proteínas exosomales. Los valores de intensidad de fluorescencia detectados mediante citometría de flujo en suero estaban más concentrados en torno a un valor central, mientras que los valores detectados en plasma presentaban una mayor

Resultados y discusión

dispersión (Figura 38). Estas diferencias pueden ser debidas a uniones inespecíficas de las *beads* con partículas presentes en el plasma que no están en el suero, fluido que en general tiene menos residuos. Por lo tanto, la fluorescencia detectada en el suero es más representativa de la cantidad de exosomas en la circulación.

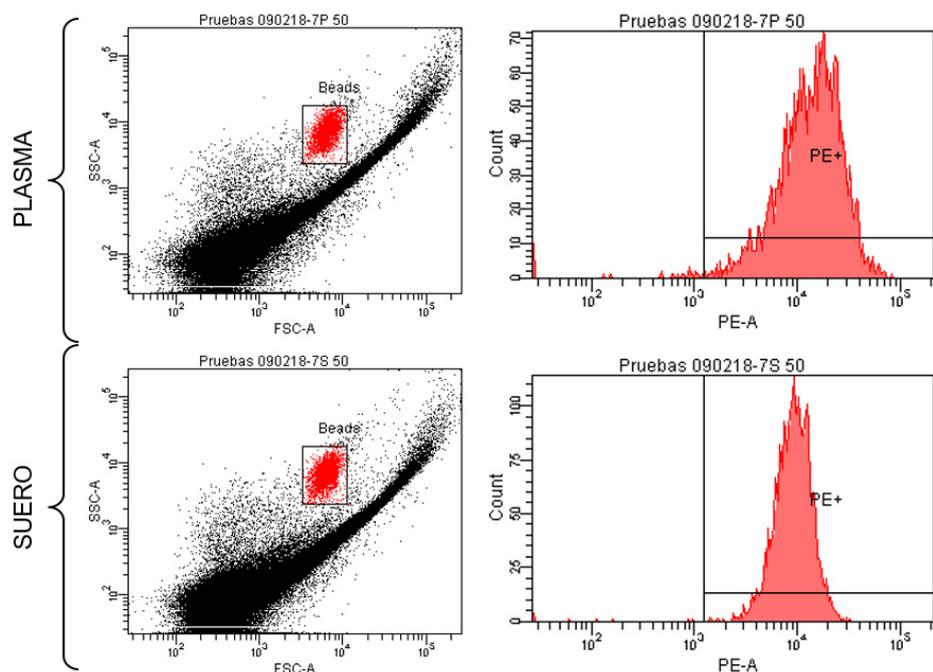


Figura 38. Diferencias entre la medición de la fluorescencia generada por las beads en muestras de plasma y suero procedentes de un mismo individuo. En los gráficos de la izquierda se representa el tamaño y complejidad de las partículas o eventos detectados por el citómetro. Cada punto representa un evento, FSC (*forward scatter*) indica su tamaño y SSC (*side scatter*), su complejidad. Se muestran en rojo aquellos eventos que fueron identificados como *beads*. En los gráficos de la derecha se representa el número de *beads* (*Count*) detectadas para cada valor de intensidad de fluorescencia registrado por el citómetro (*PE*, abreviatura de ficoeritrina, flúoróforo de detección).

Dado que la primera población de pacientes con valvulopatía aórtica solo tenía muestras de plasma, se utilizaron las muestras de suero de los individuos pertenecientes a la segunda población de pacientes. Por tanto, no se pudo analizar una posible asociación de la cantidad de exosomas en la circulación con los valores de BMD y BV/TV. A pesar de ello, se llevó a cabo un pequeño estudio piloto en muestras procedentes de 16 pacientes, 7 con calcificación escasa y 9 con calcificación extensa en sus válvulas, graduada según las observaciones del cirujano durante el reemplazo de las mismas. Puesto que no se observaron diferencias significativas en la cantidad de exosomas circulantes entre los dos grupos de pacientes ($p = 0,478$ según la prueba t de Student), se decidió clasificarlos siguiendo criterios más objetivos. Así, los pacientes se dividieron en tres grupos según la severidad de su estenosis atendiendo a criterios ecocardiográficos y, adicionalmente, en dos grupos según presentasen o no depósitos de calcio en el tejido detectables mediante observación al microscopio de secciones histológicas teñidas con orceína. Solamente se encontraron diferencias significativas en la cantidad de exosomas con respecto a la presencia de depósitos de calcio (media

de 1.700 en muestras sin depósitos frente a 6.118 en muestras con depósitos, en unidades relativas de fluorescencia), pudiendo observarse, no obstante, un incremento en la cantidad de exosomas circulantes con el aumento en la severidad de la estenosis, el cual puede no haber llegado a ser estadísticamente significativo como consecuencia del reducido número de muestras (Figura 39).

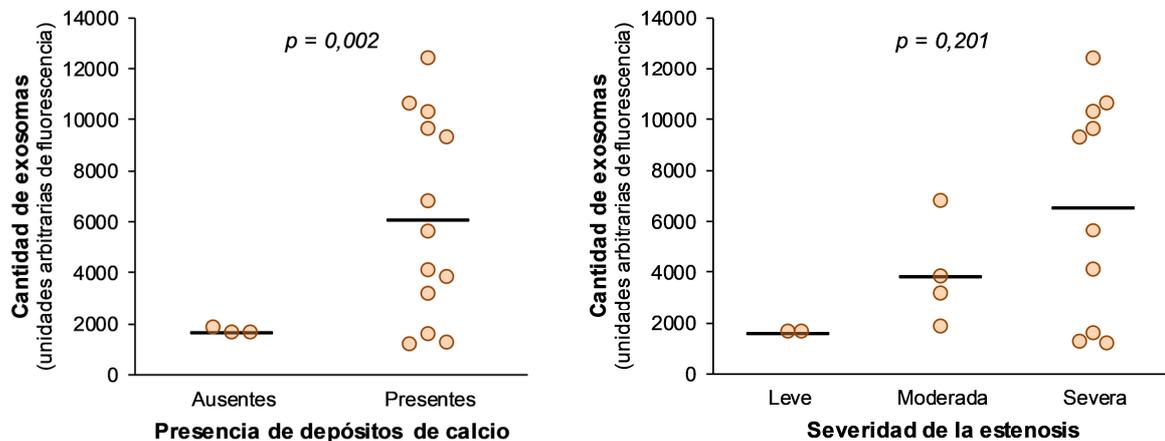


Figura 39. Cantidad de exosomas presentes en el suero de pacientes con valvulopatía aórtica en función de la presencia de depósitos de calcio en sus velos y de la severidad de su estenosis. Cada punto de los gráficos representa el velo de un paciente. Se ha representado la media como una barra horizontal. Se muestra la significación estadística (p-valor) de las diferencias entre los grupos según la prueba t de Student (gráfico de la izquierda) o la prueba ANOVA (gráfico de la derecha).

Se ha demostrado la liberación de vesículas extracelulares por parte de diversos tipos celulares en enfermedades de tipo neurodegenerativo [277] y autoinmune [278], así como en diversas manifestaciones de enfermedad cardiovascular [279]. Más concretamente, los niveles de vesículas de origen endotelial en la circulación se han asociado con factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión o la dislipemia [280], y las vesículas procedentes tanto de células endoteliales como de monocitos ven incrementados sus niveles en la circulación de pacientes con cardiomiopatía periparto [281]. A pesar de la similitud de estas investigaciones con los resultados aquí recogidos, sería necesario realizar una caracterización de los exosomas detectados en el suero de estos pacientes para determinar el origen de los mismos y poder así confirmar su utilidad como biomarcadores del proceso de calcificación de las válvulas aórticas. Los exosomas, además, contienen miRNAs que podrían ser estudiados para identificar los diferencialmente expresados en ERC o en valvulopatía aórtica y que podrían convertirse en biomarcadores de estas enfermedades.

4.5. Polimorfismos de los genes *MMP1* y *LPA* se asocian con la calcificación de la válvula aórtica y de la túnica íntima de las arterias

Los procesos de calcificación del aparato cardiovascular están regulados por numerosos genes cuyas variantes podrían otorgar mayor o menor susceptibilidad a desarrollar depósitos de calcio a los individuos portadores. Por ello se ha estudiado el efecto sobre la calcificación de válvulas y arterias de SNPs de los genes *MMP1*, *LPA* y *PALMD* en las poblaciones objeto de este estudio.

4.5.1. Los polimorfismos -1607 y -519 de *MMP1* se asocian con la extensión de la calcificación valvular

Dada la conocida implicación de las MMPs en la calcificación cardiovascular, se estudió la asociación de tres polimorfismos funcionales del gen *MMP1* (-1607 1G>2G, -519 A>G y -340 T>C) con la extensión de la calcificación de la válvula aórtica medida por microCT. Se genotiparon para ello los 45 individuos de los cuales se disponía de DNA de entre los 57 de la primera población cuyos velos fueron analizados mediante microCT. Los individuos homocigotos para los alelos 1G₋₁₆₀₇, G₋₅₁₉ y T₋₃₄₀ tenían una menor cantidad de calcio depositado en sus válvulas según ambas variables, aunque las diferencias entre los valores medios de las mismas para los tres genotipos de cada polimorfismo solo fueron estadísticamente significativas en el caso de -1607 y BV/TV (Figura 40).

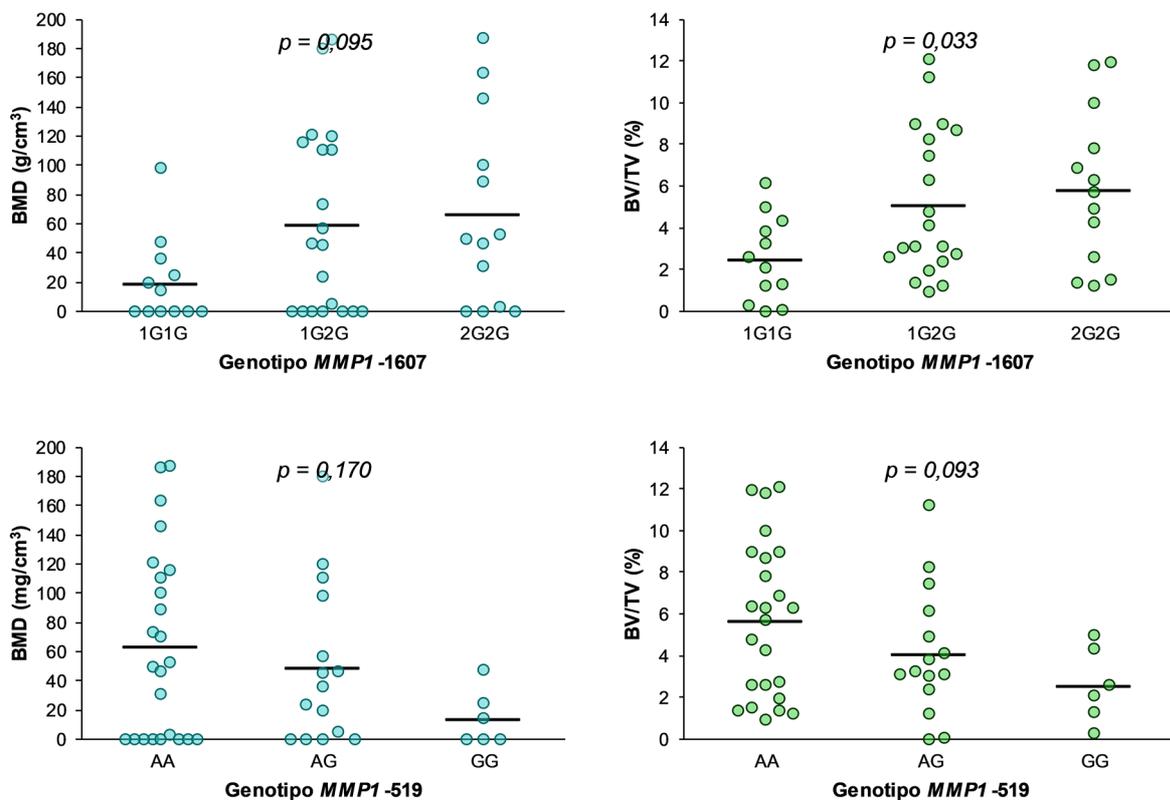


Figura 40 (continúa en la página siguiente).

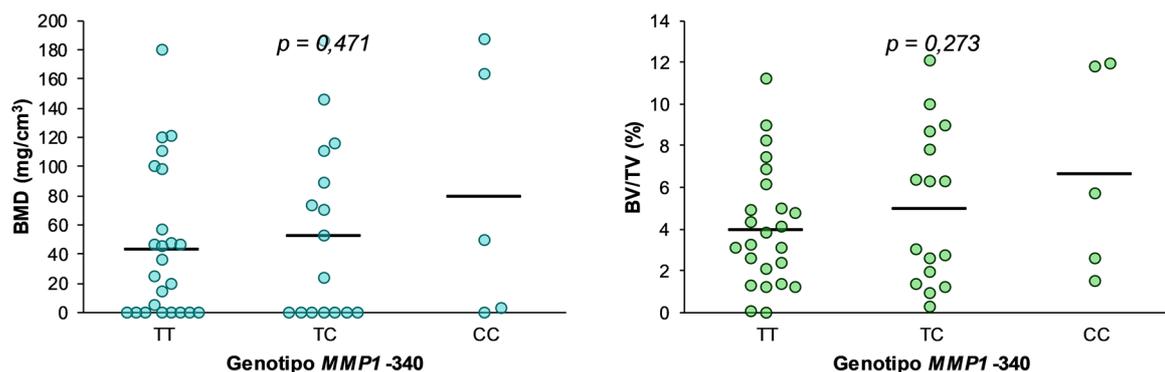


Figura 40. Valores de BMD y BV/TV para cada genotipo de los polimorfismos -1607, -519 y -340 de MMP1. Cada punto de los gráficos representa el valor de un paciente. Se ha representado la media como una barra horizontal. Se indica también el p-valor resultante de la comparación de los valores de las medias para cada genotipo mediante la prueba ANOVA.

Más adelante se comprobó, mediante un análisis *post hoc* (prueba de Bonferroni), que únicamente presentaban diferencias significativas los homocigotos para el alelo 1G₋₁₆₀₇ frente a los homocigotos para el alelo 2G₋₁₆₀₇ con respecto a BV/TV ($p = 0,042$), siendo los valores medios de esta variable en los heterocigotos similares a los de los homocigotos para el alelo 2G₋₁₆₀₇. Se propuso, por tanto, un modelo de herencia recesiva para explicar el efecto del alelo 1G₋₁₆₀₇, el cual se aplicó igualmente a los alelos que produjeron un efecto equivalente en los otros dos polimorfismos.

Tras agrupar a los individuos según este modelo de herencia genética se pudo comprobar que los homocigotos para los alelos 1G₋₁₆₀₇ y G₋₅₁₉ presentaban una cantidad significativamente menor de calcio en sus velos valvulares según BMD y BV/TV que el resto de los individuos (Figura 41). Además, para el polimorfismo -1607, estas diferencias significativas se mantuvieron para los niveles de BV/TV tras el ajuste por sexo, edad, presencia de válvula aórtica bicúspide y filtrado glomerular ($p = 0,021$), conservándose la tendencia, aunque sin llegar a ser significativa, para los niveles de BMD ($p = 0,073$).

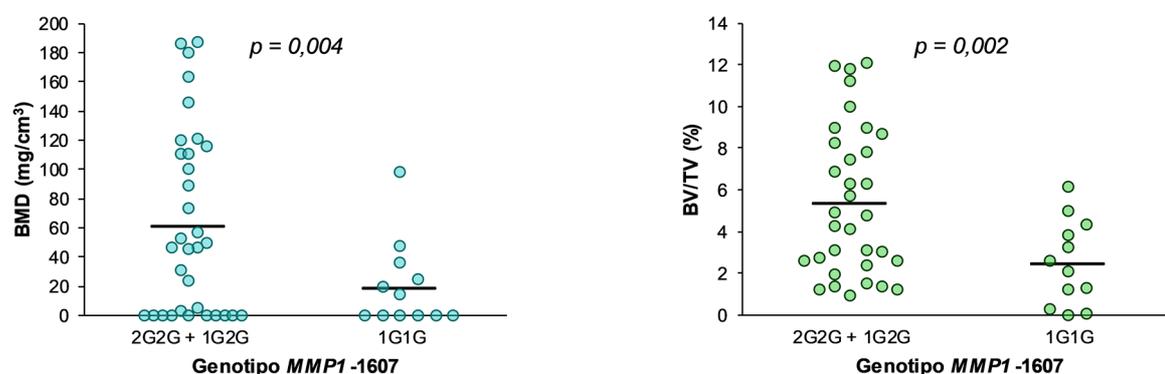


Figura 41 (continúa en la página siguiente).

Resultados y discusión

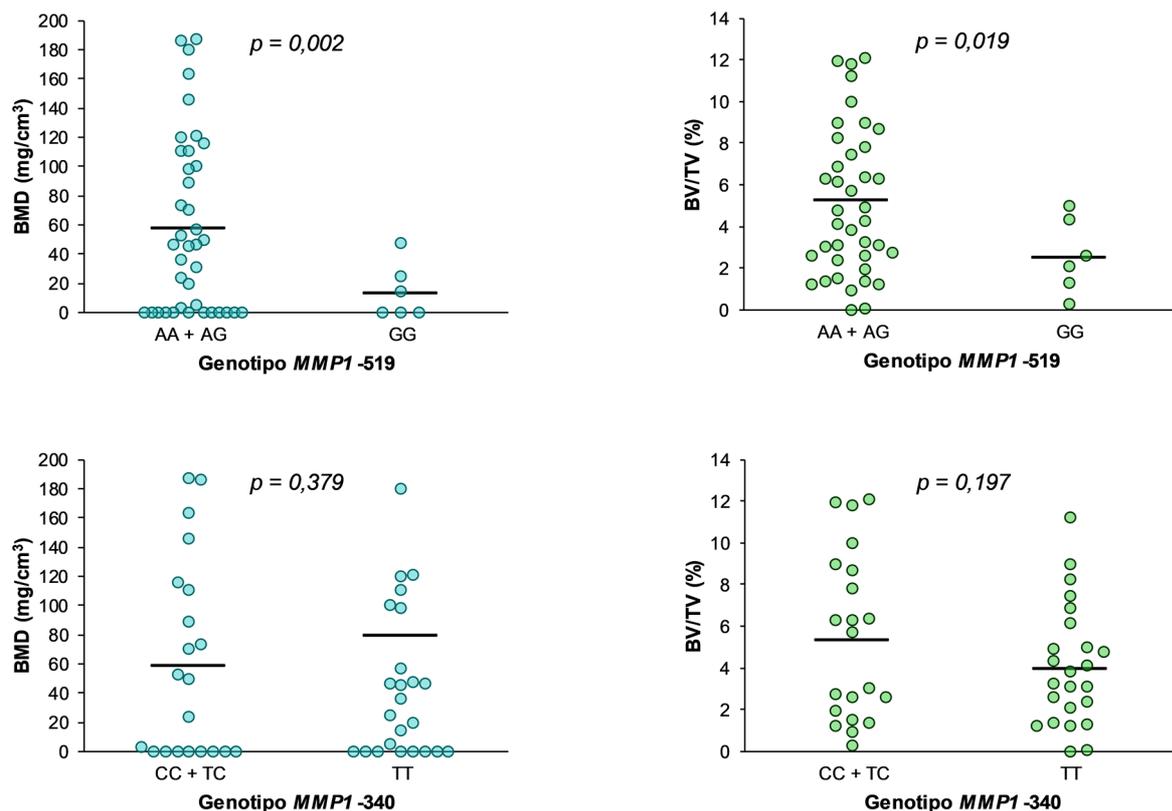


Figura 41. Valores de BMD y BV/TV para los genotipos de los polimorfismos -1607, -519 y -340 de MMP1 según un modelo de herencia recesiva. Cada punto de los gráficos representa el velo de un paciente. Se ha representado la media como una barra horizontal. Se indica también el p-valor resultante de la comparación de los valores de las medias para cada genotipo mediante la prueba t de Student.

Para comprobar si, además de presentar esta asociación con el nivel de calcificación de la válvula, los polimorfismos se asociaban con el diagnóstico clínico de los pacientes, se amplió el genotipado a más individuos de la primera población de pacientes con valvulopatía aórtica. En este caso se tuvieron en cuenta solo aquellos cuya anatomía valvular era tricúspide para evitar el sesgo que puede producir esta variable sobre el número de pacientes que desarrollan estenosis. Así, se consideraron 114 pacientes, un 28,4% de los cuales tenían válvulas aórticas normofuncionantes, un 8,6% presentaban insuficiencia, un 49,1% estenosis y un 12,9% una doble lesión aórtica.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas para cada diagnóstico en ninguno de los tres polimorfismos de *MMP1* estudiados (Tabla 13). No obstante, aplicando el modelo de herencia recesiva sí que se vieron diferencias significativas en la frecuencia de genotipos del polimorfismo -1607 entre los individuos con válvulas normofuncionantes e insuficientes ($p = 0,034$) y entre aquellos que presentaban insuficiencia y estenosis ($p = 0,025$). Sin embargo, las frecuencias genotípicas para este polimorfismo en los individuos con válvulas normofuncionantes no diferían de las de los individuos que presentaban estenosis ($p = 0,816$), lo cual indicaría una posible asociación entre el polimorfismo -1607 y el desarrollo de insuficiencia valvular aórtica, pero no de estenosis.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas según el diagnóstico clínico de valvulopatía para los polimorfismos -1607, -519 y -340 de MMP1 en individuos con válvulas tricúspides.

SNP	Genotipo	Total N = 114	Diagnóstico valvular aórtico				p-valor
			Normofuncionante N = 33	Insuficiencia N = 10	Estenosis N = 57	Doble lesión N = 15	
- 1607 1G > 2G	1G1G	37 (32,5)	10 (30,3)	7 (70,0)	16 (28,1)	4 (28,6)	0,357
	1G2G	50 (43,9)	14 (42,4)	2 (20,0)	28 (49,1)	6 (42,9)	
	2G2G	27 (23,7)	9 (27,3)	1 (10,0)	13 (22,8)	4 (28,6)	
- 519 A > G	AA	46 (40,4)	14 (42,4)	1 (11,1)	22 (38,6)	9 (60,0)	0,070
	AG	47 (41,2)	10 (30,3)	7 (77,8)	27 (47,4)	3 (20,0)	
	GG	21 (18,4)	9 (27,3)	1 (11,1)	8 (14,0)	3 (20,0)	
- 340 T > C	TT	56 (49,1)	16 (48,5)	3 (30,0)	29 (50,9)	8 (57,1)	0,483
	TC	43 (37,7)	11 (33,3)	7 (70,0)	21 (36,8)	4 (28,6)	
	CC	15 (13,2)	6 (18,2)	0 (0,0)	7 (12,3)	2 (14,3)	

Los datos se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Finalmente, y para poner en contexto estas asociaciones, se comprobó que las frecuencias obtenidas en nuestra población se asemejasen a las registradas para otras poblaciones europeas. Se contrastaron para ello los datos obtenidos mediante el genotipado de 221 individuos pertenecientes a la primera población de pacientes con valvulopatías con los depositados en la base de datos *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) para poblaciones europeas. Se tuvieron en cuenta los datos relativos a individuos europeos derivados de *1000 Genomes Project* [282] y *Genome Aggregation Database* (gnomAD) [283] y se vio que no hay diferencias significativas entre la frecuencia del alelo minoritario (*minor allele frequency*, MAF) de los polimorfismos -1607, -519 y -340 hallada en los pacientes del HUCA y la de otros grupos de individuos de origen europeo (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencia del alelo minoritario de los polimorfismos -1607, -519 y -340 de MMP1 en pacientes con valvulopatías y otras dos poblaciones europeas.

SNP	MAF		p-valor	MAF	
	HUCA	1000 Genomes		gnomAD	p-valor
- 1607 1G > 2G	48,6	50,4	0,538	49,1	0,842
- 519 A > G	37,3	35,1	0,413	38,6	0,589
- 340 T > C	29,6	29,5	0,965	27,0	0,221

Las frecuencias se expresan como porcentajes y las comparaciones entre frecuencias absolutas para las distintas poblaciones se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado. MAF = frecuencia del alelo minoritario.

Aunque no existen otros estudios en los cuales se hayan asociado estos polimorfismos con calcificación de la válvula aórtica, sí lo han hecho con otras afecciones cardiovasculares. Se ha observado un incremento significativo del riesgo de padecer aterosclerosis en la arteria carótida en

Resultados y discusión

portadores del alelo 2G₋₁₆₀₇ [284] y una mayor proporción del mismo entre individuos que habían sufrido un ictus isquémico [285]. Asimismo, el alelo G₋₅₁₉ se vio asociado con un aumento en el grosor íntima-media de la arteria carótida en una población con hipertensión [286]. Se ha encontrado también una frecuencia significativamente menor de un haplotipo en cuya composición intervienen alelos de los polimorfismos -1607, -519 y -340 entre los individuos con válvulas aórticas bicúspides [287]. Por tanto, cambios en la actividad transcripcional de *MMP1* provocados por variantes genéticas en su promotor podrían estar modulando estos procesos cardiovasculares. Además, resulta interesante que los mismos tres alelos asociados en este trabajo con menor depósito de calcio en la válvula (1G₋₁₆₀₇, G₋₅₁₉ y T₋₃₄₀) ejercen un efecto protector frente al infarto de miocardio precoz en hombres fumadores [288]. Concretamente, esta combinación de alelos está descrita como de baja actividad transcripcional y asociada a menores niveles de *MMP1* en placa aterosclerótica [137, 138]. En consecuencia, una menor actividad de esta enzima podría ser beneficiosa frente al desarrollo de patologías cardiovasculares.

En el contexto de la CAVD, la protección ejercida por una menor actividad *MMP1* puede ser debida a la capacidad de la proteína para degradar varios tipos de colágeno [289], componente estructural mayoritario de las válvulas. La interacción entre las VICs y la matriz extracelular que las sustenta es fundamental en la fisiología valvular, pudiendo afectar al fenotipo de las células [290]. De hecho, se han descrito diferencias en la mineralización y en los niveles de expresión de marcadores de cambio osteogénico como *RUNX2* en VICs cultivadas *in vitro* sobre diferentes componentes de la matriz [291], así como un incremento en la mineralización acompañado de un aumento en la expresión de osteocalcina y fosfatasa alcalina en velos sometidos a degradación enzimática del colágeno [292]. Por tanto, en los individuos con menos *MMP1*, las fibras de colágeno de sus velos sufrirían menos alteraciones bajo los estímulos iniciadores de la enfermedad, una mayor proporción de VICs mantendría su fenotipo quiescente y la formación de depósitos de calcio se vería menos favorecida que en aquellos con una mayor actividad de la enzima.

4.5.2. El polimorfismo rs10455872 del gen LPA no se asocia con la extensión de la calcificación valvular, pero sí con la presencia de calcificación aterosclerótica en pacientes con enfermedad renal crónica

4.5.2.1. El polimorfismo rs10455872 no se asocia con las medidas valvulares de BMD y BV/TV

Como se mencionó anteriormente, los estudios de genotipado masivo GWAS permiten identificar genes implicados en un proceso biológico. Es el caso del gen *LPA* en la CAVD. Nos propusimos confirmar la asociación del polimorfismo rs10455872 de *LPA* con calcificación valvular en nuestra población. Para ello se genotiparon los 45 individuos de la primera población de pacientes con valvulopatías de los cuales se disponía de DNA y datos de microCT de sus velos. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de calcio depositado en las válvulas aórticas atendiendo a los valores medios para BMD y BV/TV entre los individuos con cada genotipo del polimorfismo rs10455872 (Figura 42). Además, los únicos dos homocigotos para el alelo de riesgo para la calcificación de acuerdo con el GWAS citado en la introducción (G) presentaban cantidades muy dispares de calcio depositado en sus velos, no pudiéndose identificar ni siquiera una tendencia.

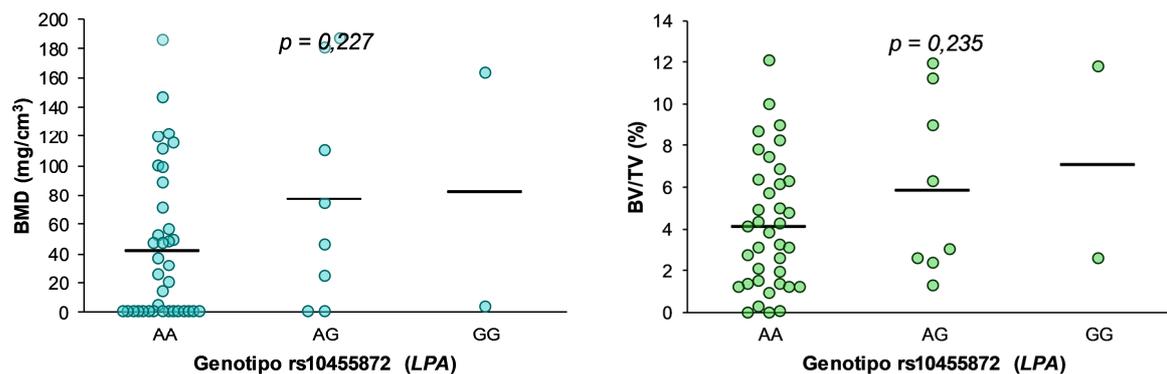


Figura 42. Valores de BMD y BV/TV para cada genotipo del polimorfismo rs10455872 de LPA. Cada punto de los gráficos representa el velo de un paciente. Se ha representado la media como una barra horizontal. Se indica también el p-valor resultante de la comparación de los valores de las medias para cada genotipo mediante la prueba ANOVA.

Seguidamente, para comprobar si existía alguna asociación entre el polimorfismo y el diagnóstico clínico, se genotiparon todos los individuos pertenecientes a las dos poblaciones de pacientes con valvulopatía aórtica cuya anatomía valvular era tricúspide y presentaban insuficiencia o estenosis. Se consideraron así 332 individuos, de los cuales un 13% había sido diagnosticado de insuficiencia y un 87% de estenosis aórtica.

No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas del polimorfismo para cada diagnóstico (Tabla 15). Por tanto, los resultados del mencionado GWAS no se han replicado en la población asturiana, ni utilizando las variables de histomorfometría ósea derivadas del microCT como indicativo de la cantidad de calcio depositada en los velos valvulares, ni tampoco agrupando a los pacientes según su diagnóstico.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas según el diagnóstico clínico de valvulopatía para el polimorfismo rs10455872 de LPA en individuos con válvulas tricúspides.

Genotipo rs10455872	Total	Diagnóstico valvular aórtico		p-valor
		Insuficiencia	Estenosis	
	N = 332	N = 43	N = 289	
AA	274 (82,5)	38 (88,4)	236 (81,7)	0,589
AG	55 (16,6)	5 (11,6)	50 (17,3)	
GG	3 (0,9)	0 (0,0)	3 (1,0)	

Los datos se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Se comprobó también si las frecuencias alélicas del polimorfismo en la población estudiada en esta Tesis Doctoral diferían de las halladas en otras poblaciones europeas de referencia. Las frecuencias alélicas halladas en nuestra población son significativamente diferentes a las de una de las dos poblaciones europeas utilizadas como referencia (gnomAD, Tabla 16).

Resultados y discusión

Tabla 16. Frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs10455872 de LPA en individuos con valvulopatías y en otras dos poblaciones europeas.

Población	MAF	p-valor
HUCA	9,2	
1000 Genomes	7,4	0,179
gnomAD	6,1	0,001

Las frecuencias se expresan como porcentajes y las comparaciones entre frecuencias absolutas para las distintas poblaciones se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado. MAF = frecuencia del alelo minoritario.

Existe otro estudio reciente en una población de más de 40.000 individuos en el cual sí se replicaron los resultados del GWAS original, confirmándose la asociación del SNP rs10455872 con la estenosis aórtica [293]. Puesto que en estos dos trabajos se emplearon varias poblaciones de individuos de distinta procedencia geográfica, las divergencias en la constitución genética de la población asturiana y la europea recopilada en la base de datos gnomAD probablemente no sean la causa de las discrepancias entre nuestros resultados y los de otros autores. Estas pueden ser debidas al pequeño tamaño de nuestra población o a diferencias en las variables clínicas consideradas. Mientras que los mencionados estudios dividen a los sujetos en controles sanos y pacientes con estenosis aórtica, en nuestro caso no se consideraron pacientes con válvula aórtica completamente normal, pues todos ellos habían acudido a una consulta de cardiología por sospecha de valvulopatía. Para incluir este tipo de controles en el estudio hubiera sido necesario realizar ecocardiografías a personas sanas o analizar mediante microCT válvulas procedentes de autopsias donde se haya descartado valvulopatía.

4.5.2.2. El polimorfismo rs10455872 se asocia con la presencia de calcificación en las arterias carótida y femoral de pacientes con enfermedad renal crónica

Lp(a) también participa en el desarrollo de aterosclerosis, lo cual llevó a estudiar la asociación entre el polimorfismo rs10455872 de LPA y la presencia de calcificación en la carótida y la femoral en la población del proyecto NEFRONA. Se genotiparon con este objetivo 1.961 individuos a los que se les habían realizado ecocardiografías de ambas arterias al comienzo del estudio. Con el objetivo de poder comparar la extensión de la calcificación entre los diferentes genotipos, se creó una variable basada en las observaciones clínicas realizadas a los pacientes. Así, estos se dividieron en tres categorías: pacientes a los cuales no se les detectó calcificación, pacientes a los que se les detectó calcificación en algún campo de la arteria carótida o de la arteria femoral, y pacientes a los que se detectó calcificación en algún campo de ambas arterias. De esta forma se incluyó un 81,7% de los individuos en la primera categoría, un 14,3% en la segunda, y un 4,0% en la tercera. Se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas presentadas por los individuos incluidos en cada una de las categorías (Tabla 17). Hay más frecuencia de homocigotos para el alelo G, identificado como de riesgo para el desarrollo de CAVD, entre los pacientes con calcificación en las dos arterias examinadas.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas para el polimorfismo rs10455872 de LPA en la población NEFRONA según la presencia de calcificación en las arterias carótida y femoral al inicio del estudio.

Genotipo rs10455872	Total N = 1961	Calcificación al inicio del estudio			p-valor
		Sin calcificación N = 1602	Calcificación en carótida o femoral N = 281	Calcificación en carótida y femoral N = 78	
AA	1685 (85,9)	1388 (86,6)	233 (82,9)	64 (82,1)	0,043
AG	268 (13,7)	209 (13,0)	47 (16,7)	12 (15,4)	
GG	8 (0,4)	5 (0,3)	1 (0,4)	2 (2,6)	

Los datos se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Puesto que los individuos a los cuales se les realizaron ecocardiografías al inicio del estudio incluyen a los controles, se decidió comprobar también si esta asociación se mantenía teniendo en cuenta solamente a los pacientes con ERC. Para ello se analizaron los enfermos a los que se les habían hecho ecocardiografías también a los 24 meses del comienzo del estudio para ver la progresión de su calcificación. Se compararon entonces las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs10455872 entre los mismos tres grados de calcificación. Se incluyeron ahora 757 individuos, un 79,7% de los cuales no presentaba calcificación, teniendo el 15,9% calcificación en algún campo de la carótida o la femoral, y el 4,5% calcificación en ambas arterias. De nuevo se encontró un mayor porcentaje de individuos homocigotos para el alelo G entre los incluidos en la tercera categoría siendo, como consecuencia, las diferencias entre las frecuencias genotípicas estadísticamente significativas (Tabla 18).

Tabla 18. Frecuencias genotípicas para el polimorfismo rs10455872 de LPA en la población NEFRONA según la presencia de calcificación en las arterias carótida y femoral a los 24 meses del inicio del estudio.

Genotipo rs10455872	Total N = 757	Calcificación a los 24 meses			p-valor
		Sin calcificación N = 603	Calcificación en carótida o femoral N = 120	Calcificación en carótida y femoral N = 34	
AA	642 (84,8)	516 (85,6)	96 (80,0)	30 (88,2)	0,009
AG	111 (14,7)	85 (14,1)	24 (20,0)	2 (5,9)	
GG	4 (0,5)	2 (0,3)	0 (0,0)	2 (5,9)	

Los datos se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Por tanto, hemos observado una asociación entre el polimorfismo rs10455872 de LPA y la calcificación en la túnica íntima de las arterias, la cual es más clara entre los pacientes con ERC. No es la primera vez que se encuentra una asociación entre este polimorfismo y la aterosclerosis: recientemente se observó una mayor probabilidad de presentar lesiones en las arterias coronarias entre los portadores del alelo G [294], así como una asociación del SNP con eventos relacionados con la enfermedad de las arterias coronarias independientemente de la reducción farmacológica de los

Resultados y discusión

niveles de LDL [295]. Todos estos datos, unidos al hallazgo de que los niveles elevados de Lp(a) se asocian con infarto de miocardio y mortalidad en la población con ERC [296], apuntan a la posible utilidad del genotipado de los pacientes para el polimorfismo rs10455872 a la hora de clasificarlos según su susceptibilidad a desarrollar calcificación, lo cual podría servir de gran ayuda durante el manejo clínico de individuos con tan elevado riesgo cardiovascular.

Se comprobó además que no existían diferencias entre las frecuencias alélicas de la población del estudio NEFRONA y dos poblaciones europeas de referencia (Tabla 19), apoyando la validez de nuestros resultados no solo para la población española, sino también para otras poblaciones de raza blanca.

Tabla 19. Frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs10455872 de LPA en el estudio NEFRONA y en otras dos poblaciones europeas.

Población	MAF	p-valor
NEFRONA	6,8	
1000 Genomes	7,4	0,571
gnomAD	6,1	0,097

Las frecuencias se expresan como porcentajes y las comparaciones entre frecuencias absolutas para las distintas poblaciones se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado. MAF = frecuencia del alelo minoritario.

4.5.3. El polimorfismo rs6702619 del gen PALMD no se asocia con la extensión de la calcificación de la válvula aórtica

Por último, y de manera análoga a lo realizado con el polimorfismo del gen *LPA*, nos propusimos confirmar la asociación del polimorfismo rs6702619 de *PALMD* con valvulopatía en nuestra población. Se genotiparon igualmente los 45 individuos de la primera población de pacientes con valvulopatías de los cuales se disponía de DNA y valores de BMD y BV/TV valvulares. No se observaron diferencias en la cantidad media de calcio depositado en los velos valvulares según los parámetros de histomorfometría ósea entre los tres genotipos (Figura 43).

A continuación, se comprobó si existía asociación entre el polimorfismo y el diagnóstico clínico. Se genotiparon de nuevo individuos con anatomía valvular tricúspide y diagnóstico de estenosis o insuficiencia pertenecientes a las dos poblaciones de pacientes del HUCA. En una primera evaluación, en la cual se determinó el genotipo un total de 192 individuos (un 18,3% con válvulas insuficientes y un 81,2% con válvulas estenóticas), no se pudo observar ningún tipo de asociación significativa ni de tendencia (Tabla 20), por lo que no se continuaron genotipando más individuos.

Se comprobó también si las frecuencias alélicas eran similares a las de otras poblaciones europeas. En la Tabla 21 se muestran las halladas en nuestra población y en otras dos de referencia, presentando diferencias estadísticamente significativas en sus frecuencias la del proyecto gnomAD.

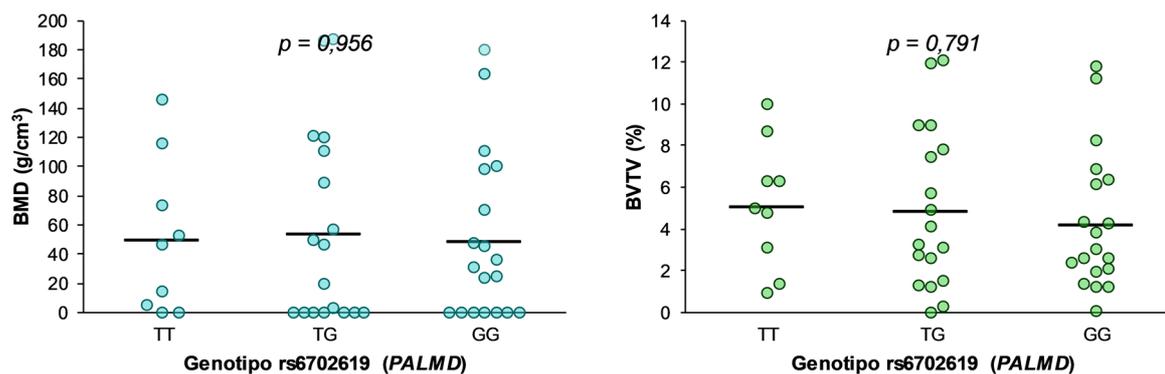


Figura 43. Valores de BMD y BV/TV para cada genotipo del polimorfismo rs6702619 de PALMD. Cada punto de los gráficos representa el velo de un paciente. Se ha representado la media como una barra horizontal. Se indica también el p-valor resultante de la comparación de los valores de las medias para cada genotipo mediante la prueba ANOVA.

Tabla 20. Frecuencias genotípicas según el diagnóstico clínico de valvulopatía para el polimorfismo rs6702619 de PALMD en individuos con válvulas tricúspides.

Genotipo rs10455872	Total	Diagnóstico valvular aórtico		p-valor
		Insuficiencia	Estenosis	
	N = 192	N = 36	N = 156	
TT	40 (20,8)	6 (16,7)	34 (21,8)	0,686
TG	95 (49,5)	20 (55,6)	75 (48,1)	
GG	57 (29,7)	10 (27,8)	47 (30,1)	

Los datos se expresan como frecuencia (%) y las comparaciones entre frecuencias en los distintos diagnósticos se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado.

Tabla 21. Frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs6702619 de PALMD en individuos con valvulopatías y en otras dos poblaciones europeas.

Población	MAF	p-valor
HUCA	54,2	
1000 Genomes	50,3	0,112
gnomAD	47,7	0,025

Las frecuencias se expresan como porcentajes y las comparaciones entre frecuencias absolutas para las distintas poblaciones se analizaron mediante la prueba Chi-cuadrado. MAF = frecuencia del alelo minoritario.

El pequeño tamaño muestral y la falta de individuos completamente sanos nuevamente podrían suponer una importante limitación de este trabajo que ha podido influir en que no se repliquen los resultados del GWAS en el que se descubrió la implicación de rs6702619. A pesar de esto, puesto que no existen estudios que repliquen la asociación y aún se desconoce cuál es la función de la proteína codificada por el gen PALMD y qué papel juega en la CAVD, resulta difícil determinar la causa de la falta de asociación del polimorfismo con la calcificación valvular en nuestra población.

5. Conclusiones

1. Existe un perfil diferencial de expresión de microRNAs asociado a la pérdida de función renal en un modelo animal de insuficiencia renal crónica que implica, al menos, al miR-29b y al miR-30c, los cuales participan en procesos fibróticos y de diferenciación osteoblástica.
2. El mitralógico EC-8042 es candidato a ser utilizado como tratamiento de la calcificación cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica, pues es capaz de atenuar el cambio osteogénico de las células de músculo liso vascular sometidas a altas concentraciones de calcio y fosfato a través de la regulación de miR-29b y miR-30c.
3. La extensión de la calcificación en la válvula aórtica se correlaciona con el grado de degeneración del tejido, en el cual los depósitos minerales aparecen asociados a cambio osteogénico, neovascularización, inflamación y producción de exosomas.
4. La calcificación de la válvula aórtica, de manera análoga a la calcificación de la túnica íntima arterial, podría estar dirigida por la producción de exosomas por parte de los macrófagos. Una vez se confirme su procedencia, la detección de niveles altos de exosomas en circulación serviría como biomarcador de la enfermedad en pacientes con estenosis, pues su cantidad podría ser un reflejo del avance de la calcificación en el tejido.
5. Variantes genéticas de *MMP1* influyen en el desarrollo de la enfermedad de la válvula aórtica calcificada, pudiendo utilizarse por tanto para predecir la susceptibilidad a padecer la enfermedad en individuos con factores de riesgo. Del mismo modo, el polimorfismo rs10455872 de *LPA* podría servir para predecir el riesgo de desarrollar calcificación en las arterias de pacientes con enfermedad renal crónica.

6. Referencias

1. Soriano JB, Rojas-Rueda D, Alonso J, *et al.* La carga de enfermedad en España: resultados del Estudio de la Carga Global de las Enfermedades 2016. *Medicina Clínica* 2018; 151(5): 171-90
2. Grupo KDIGO. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; 3(1):
3. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, *et al.* Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 2001; 286(4): 421-6
4. Grams ME, Astor BC, Bash LD, *et al.* Albuminuria and estimated glomerular filtration rate independently associate with acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(10): 1757-64
5. Sandmark DK, Messe SR, Zhang X, *et al.* Proteinuria, but Not eGFR, Predicts Stroke Risk in Chronic Kidney Disease: Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Stroke* 2015; 46(8): 2075-80
6. Carrero JJ, Grams ME, Sang Y, *et al.* Albuminuria changes are associated with subsequent risk of end-stage renal disease and mortality. *Kidney Int* 2017; 91(1): 244-51
7. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, *et al.* Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11(7): e0158765
8. Bruck K, Stel VS, Gambaro G, *et al.* CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(7): 2135-47
9. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859): 2095-128
10. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87(1): 4-14
11. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, *et al.* Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. *JAMA* 2017; 317(2): 165-82
12. Luño J, García de Vinuesa S. Factores de riesgo en el desarrollo y progresión de insuficiencia renal terminal, la epidemia del siglo XXI. *Nefrología* 2001; 21(1): 9-15
13. Rodriguez-Iturbe B, Musser JM. The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(10): 1855-64
14. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, *et al.* Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010; 375(9731): 2073-81
15. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, *et al.* Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17088
16. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006; 69(2): 213-7
17. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302(11): F1351-61
18. Roman-Garcia P, Rodriguez-Garcia M, Cabezas-Rodriguez I, *et al.* Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis. *Med Princ Pract* 2011; 20(3): 203-12
19. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007; 116(1): 85-97
20. Ronco C, McCullough P, Anker SD, *et al.* Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. *Eur Heart J* 2010; 31(6): 703-11
21. Giachelli CM. Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Pathol* 1999; 154(3): 671-5
22. Nicoll R, Henein MY. The predictive value of arterial and valvular calcification for mortality and cardiovascular events. *Int J Cardiol Heart Vessel* 2014; 3: 1-5
23. Hendriks EJ, de Jong PA, van der Graaf Y, *et al.* Breast arterial calcifications: a systematic review and meta-analysis of their determinants and their association with cardiovascular events. *Atherosclerosis* 2015; 239(1): 11-20

Referencias

24. Hoffmann U, Massaro JM, D'Agostino RB, Sr., *et al.* Cardiovascular Event Prediction and Risk Reclassification by Coronary, Aortic, and Valvular Calcification in the Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(2):
25. Carr JJ, Jacobs DR, Jr., Terry JG, *et al.* Association of Coronary Artery Calcium in Adults Aged 32 to 46 Years With Incident Coronary Heart Disease and Death. *JAMA Cardiol* 2017; 2(4): 391-9
26. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J* 2014; 35(23): 1515-25
27. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801): 233-41
28. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2013; 22(1): 9-15
29. Kwon GP, Schroeder JL, Amar MJ, *et al.* Contribution of macromolecular structure to the retention of low-density lipoprotein at arterial branch points. *Circulation* 2008; 117(22): 2919-27
30. Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 2007; 116(16): 1832-44
31. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011; 12(3): 204-12
32. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, *et al.* Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(18): 8264-8
33. Kumar V, Abbas AK, Robbins SL, *et al.* *Robbins Basic Pathology*. Saunders/Elsevier: 2007.
34. Kreuzer J, Lloyd MB, Bok D, *et al.* Lipoprotein (a) displays increased accumulation compared with low-density lipoprotein in the murine arterial wall. *Chem Phys Lipids* 1994; 67-68: 175-90
35. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, *et al.* Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 353(1): 46-57
36. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000; 102(10): 1082-5
37. Bennet A, Di Angelantonio E, Erqou S, *et al.* Lipoprotein(a) levels and risk of future coronary heart disease: large-scale prospective data. *Arch Intern Med* 2008; 168(6): 598-608
38. Nicholls SJ, Tang WH, Scoffone H, *et al.* Lipoprotein(a) levels and long-term cardiovascular risk in the contemporary era of statin therapy. *J Lipid Res* 2010; 51(10): 3055-61
39. Nielsen LB. Atherogenicity of lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx, degradation and efflux. *Atherosclerosis* 1999; 143(2): 229-43
40. Bdeir K, Cane W, Canziani G, *et al.* Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. *Blood* 1999; 94(6): 2007-19
41. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb* 2018; 25(4): 294-303
42. Lundstam U, Hurt-Camejo E, Olsson G, *et al.* Proteoglycans contribution to association of Lp(a) and LDL with smooth muscle cell extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(5): 1162-7
43. Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(8): 253-8
44. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, *et al.* Activation of arterial matrix metalloproteinases leads to vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2011; 34(3): 211-9
45. Hecht E, Freise C, Websky KV, *et al.* The matrix metalloproteinases 2 and 9 initiate uraemic vascular calcifications. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31(5): 789-97
46. Addabbo F, Mallamaci F, Leonardi D, *et al.* Searching for biomarker patterns characterizing carotid atherosclerotic burden in patients with reduced renal function. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(12): 3521-6
47. Nagano M, Fukami K, Yamagishi S, *et al.* Circulating matrix metalloproteinase-2 is an independent correlate of proteinuria in patients

- with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2009; 29(2): 109-15
48. Coll B, Rodriguez JA, Craver L, *et al.* Serum levels of matrix metalloproteinase-10 are associated with the severity of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; 78(12): 1275-80
 49. Naik V, Leaf EM, Hu JH, *et al.* Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc Res* 2012; 94(3): 545-54
 50. Lin ME, Chen TM, Wallingford MC, *et al.* Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation. *Cardiovasc Res* 2016; 112(2): 606-16
 51. Durham AL, Speer MY, Scatena M, *et al.* Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 2018; 114(4): 590-600
 52. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, *et al.* Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 2007; 116(24): 2841-50
 53. New SE, Goettsch C, Aikawa M, *et al.* Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2013; 113(1): 72-7
 54. Janzen J, Vuong PN. Arterial calcifications: morphological aspects and their pathological implications. *Z Kardiol* 2001; 90 Suppl 3: 6-11
 55. Sakata N, Noma A, Yamamoto Y, *et al.* Modification of elastin by pentosidine is associated with the calcification of aortic media in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(8): 1601-9
 56. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, *et al.* Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2004; 110(22): 3480-7
 57. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, *et al.* Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res* 2015; 116(8): 1312-23
 58. Schoppet M, Kavurma MM, Hofbauer LC, *et al.* Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407(1): 103-7
 59. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; 87(11): 1055-62
 60. Coscas R, Bensussan M, Jacob MP, *et al.* Free DNA precipitates calcium phosphate apatite crystals in the arterial wall in vivo. *Atherosclerosis* 2017; 259: 60-7
 61. Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. *N Engl J Med* 2018; 378(18): 1704-14
 62. Chen NX, O'Neill K, Akl NK, *et al.* Adipocyte induced arterial calcification is prevented with sodium thiosulfate. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 449(1): 151-6
 63. Araki N, Misawa S, Shibuya K, *et al.* POEMS syndrome and calciphylaxis: an unrecognized cause of abnormal small vessel calcification. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 35
 64. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, *et al.* Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(2): 218-23
 65. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, *et al.* Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996; 27(3): 394-401
 66. Drueke TB, Massy ZA. Chronic kidney disease: Medial or intimal calcification in CKD-does it matter? *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(5): 250-1
 67. McCullough PA, Agrawal V, Danielewicz E, *et al.* Accelerated atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(6): 1585-98
 68. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-

Referencias

- mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; 100(21): 2168-76
69. Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, *et al.* Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(8): 4104-12
70. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(6): 1599-605
71. Tvedegaard E. Arterial disease in chronic renal failure--an experimental study in the rabbit. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 1987; 290: 1-28
72. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(9): 1731-40
73. Maganti K, Rigolin VH, Sarano ME, *et al.* Valvular heart disease: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc* 2010; 85(5): 483-500
74. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019; 139(10): e56-e528
75. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, *et al.* Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 2006; 368(9540): 1005-11
76. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, *et al.* Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16006
77. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, *et al.* Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011; 124(16): 1783-91
78. Lindman BR, Bonow RO, Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circ Res* 2013; 113(2): 223-37
79. Clark MA, Duhay FG, Thompson AK, *et al.* Clinical and economic outcomes after surgical aortic valve replacement in Medicare patients. *Risk Manag Healthc Policy* 2012; 5: 117-26
80. Mendez-Bailon M, Lorenzo-Villalba N, Munoz-Rivas N, *et al.* Transcatheter aortic valve implantation and surgical aortic valve replacement among hospitalized patients with and without type 2 diabetes mellitus in Spain (2014-2015). *Cardiovasc Diabetol* 2017; 16(1): 144
81. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(25): 2789-800
82. Pachulski RT, Chan KL. Progression of aortic valve dysfunction in 51 adult patients with congenital bicuspid aortic valve: assessment and follow up by Doppler echocardiography. *Br Heart J* 1993; 69(3): 237-40
83. Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* 2005; 111(7): 920-5
84. Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet* 2009; 373(9667): 956-66
85. Roberts WC. Anatomically isolated aortic valvular disease. The case against its being of rheumatic etiology. *Am J Med* 1970; 49(2): 151-9
86. Li C, Xu S, Gotlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol* 2013; 22(1): 1-8
87. Warren BA, Yong JL. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. *Pathology* 1997; 29(4): 360-8
88. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60(19): 1854-63
89. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, *et al.* Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29(3): 630-4

90. Nadlonek NA, Lee JH, Weyant MJ, *et al.* ox-LDL induces PiT-1 expression in human aortic valve interstitial cells. *J Surg Res* 2013; 184(1): 6-9
91. Torzewski M, Ravandi A, Yeang C, *et al.* Lipoprotein(a) Associated Molecules are Prominent Components in Plasma and Valve Leaflets in Calcific Aortic Valve Stenosis. *JACC Basic Transl Sci* 2017; 2(3): 229-40
92. Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, *et al.* Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73(17): 2150-62
93. Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, *et al.* Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart* 2005; 91(6): 806-10
94. Derbali H, Bosse Y, Cote N, *et al.* Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol* 2010; 176(6): 2638-45
95. Mahmut A, Boulanger MC, Fournier D, *et al.* Lipoprotein lipase in aortic valve stenosis is associated with lipid retention and remodelling. *Eur J Clin Invest* 2013; 43(6): 570-8
96. Hung MY, Witztum JL, Tsimikas S. New therapeutic targets for calcific aortic valve stenosis: the lipoprotein(a)-lipoprotein-associated phospholipase A2-oxidized phospholipid axis. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(5): 478-80
97. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, *et al.* Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2(5): 489-98
98. Cote N, Mahmut A, Bosse Y, *et al.* Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation* 2013; 36(3): 573-81
99. El Husseini D, Boulanger MC, Mahmut A, *et al.* P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 72: 146-56
100. Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol* 2014; 30(9): 982-93
101. Edep ME, Shirani J, Wolf P, *et al.* Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2000; 9(5): 281-6
102. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, *et al.* Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2003; 170(2): 205-11
103. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, *et al.* Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(2): 80-7
104. Linefsky JP, O'Brien KD, Katz R, *et al.* Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular health study. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(3): 291-7
105. El Husseini D, Boulanger MC, Fournier D, *et al.* High expression of the Pi-transporter SLC20A1/Pit1 in calcific aortic valve disease promotes mineralization through regulation of Akt-1. *PLoS One* 2013; 8(1): e53393
106. Mathieu P. Pharmacology of ectonucleotidases: relevance for the treatment of cardiovascular disorders. *Eur J Pharmacol* 2012; 696(1-3): 1-4
107. Holliday CJ, Ankeny RF, Jo H, *et al.* Discovery of shear- and side-specific mRNAs and miRNAs in human aortic valvular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(3): H856-67
108. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, *et al.* Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res* 2005; 96(7): 792-9
109. Garg V, Muth AN, Ransom JF, *et al.* Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005; 437(7056): 270-4
110. Cola C, Almeida M, Li D, *et al.* Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(2): 424-7

Referencias

111. Otto CM. Calcific aortic valve disease: outflow obstruction is the end stage of a systemic disease process. *Eur Heart J* 2009; 30(16): 1940-2
112. Bellasi A, Galassi A, Papagni S, et al. Cardiac valve calcification: an immutable pathologic finding in chronic kidney disease? *J Nephrol* 2013; 26(4): 606-9
113. Rattazzi M, Bertacco E, Del Vecchio A, et al. Aortic valve calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(12): 2968-76
114. Guerraty MA, Chai B, Hsu JY, et al. Relation of aortic valve calcium to chronic kidney disease (from the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study). *Am J Cardiol* 2015; 115(9): 1281-6
115. Leskinen Y, Paana T, Saha H, et al. Valvular calcification and its relationship to atherosclerosis in chronic kidney disease. *J Heart Valve Dis* 2009; 18(4): 429-38
116. Raggi P, Bellasi A, Gamboa C, et al. All-cause mortality in hemodialysis patients with heart valve calcification. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6(8): 1990-5
117. Samad Z, Sivak JA, Phelan M, et al. Prevalence and Outcomes of Left-Sided Valvular Heart Disease Associated With Chronic Kidney Disease. *J Am Heart Assoc* 2017; 6(10):
118. Sánchez-Perales C, Vázquez Ruiz de Castroviejo E, García-Cortés MJ, et al. Las calcificaciones valvulares al inicio de diálisis predicen la aparición de eventos cardiovasculares en la evolución. *Nefrología (Madrid)* 2015; 35(2): 157-63
119. O'Donnell CJ, Kavousi M, Smith AV, et al. Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation* 2011; 124(25): 2855-64
120. Natarajan P, Bis JC, Bielak LF, et al. Multiethnic Exome-Wide Association Study of Subclinical Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9(6): 511-20
121. van Setten J, Isgum I, Smolonska J, et al. Genome-wide association study of coronary and aortic calcification implicates risk loci for coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2013; 228(2): 400-5
122. Parsa A, Kanetsky PA, Xiao R, et al. Genome-Wide Association of CKD Progression: The Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(3): 923-34
123. Pattaro C, Teumer A, Gorski M, et al. Genetic associations at 53 loci highlight cell types and biological pathways relevant for kidney function. *Nat Commun* 2016; 7: 10023
124. Theriault S, Gaudreault N, Lamontagne M, et al. A transcriptome-wide association study identifies PALMD as a susceptibility gene for calcific aortic valve stenosis. *Nat Commun* 2018; 9(1): 988
125. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, et al. Genome-wide analysis yields new loci associating with aortic valve stenosis. *Nat Commun* 2018; 9(1): 987
126. Andreu N, Escarceller M, Feather S, et al. PALML, a novel paralemmin-related gene mapping on human chromosome 1p21. *Gene* 2001; 278(1-2): 33-40
127. Hu B, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. The paralemmin protein family: identification of paralemmin-2, an isoform differentially spliced to AKAP2/AKAP-KL, and of palmdelphin, a more distant cytosolic relative. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(5): 1369-76
128. Hu B, Petrasch-Parwez E, Laue MM, et al. Molecular characterization and immunohistochemical localization of palmdelphin, a cytosolic isoform of the paralemmin protein family implicated in membrane dynamics. *Eur J Cell Biol* 2005; 84(11): 853-66
129. Nie Y, Chen H, Guo C, et al. Palmdelphin promotes myoblast differentiation and muscle regeneration. *Sci Rep* 2017; 7: 41608
130. Dashzeveg N, Taira N, Lu ZG, et al. Palmdelphin, a novel target of p53 with Ser46 phosphorylation, controls cell death in response to DNA damage. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1221
131. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* 2013; 368(6): 503-12

132. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, *et al.* Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010; 31(23): 2844-53
133. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, *et al.* Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* 2009; 301(22): 2331-9
134. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, *et al.* Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med* 2009; 361(26): 2518-28
135. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol* 2015; 44-46: 1-6
136. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(8): 617-29
137. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998; 58(23): 5321-5
138. Pearce E, Tregouet DA, Samnegard A, *et al.* Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ Res* 2005; 97(10): 1070-6
139. Cozzolino M, Biondi ML, Galassi A, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(7): 2207-12
140. Yoshida T, Kato K, Fujimaki T, *et al.* Association of genetic variants with chronic kidney disease in Japanese individuals. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(5): 883-90
141. Valls J, Cambray S, Perez-Guallar C, *et al.* Association of Candidate Gene Polymorphisms With Chronic Kidney Disease: Results of a Case-Control Analysis in the Nefrona Cohort. *Front Genet* 2019; 10: 118
142. Valdivielso JM, Bozic M, Galimudi RK, *et al.* Association of the rs495392 Klotho polymorphism with atheromatosis progression in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2018:
143. Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455(7209): 58-63
144. Care A, Catalucci D, Felicetti F, *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007; 13(5): 613-8
145. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30): 10513-8
146. Gidlof O, Andersson P, van der Pals J, *et al.* Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 2011; 118(4): 217-26
147. Murakami Y, Tanahashi T. Analysis of circulating microRNA by microarray in liver disease. *Methods Mol Biol* 2013; 1024: 173-82
148. Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, *et al.* Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013; 65(5): 1324-34
149. Goettsch C, Hutcheson JD, Aikawa E. MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms. *Circ Res* 2013; 112(7): 1073-84
150. Goettsch C, Rauner M, Pacyna N, *et al.* miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2011; 179(4): 1594-600
151. Gui T, Zhou G, Sun Y, *et al.* MicroRNAs that target Ca(2+) transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. *Lab Invest* 2012; 92(9): 1250-9
152. Lim K, Lu TS, Molostvov G, *et al.* Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* 2012; 125(18): 2243-55
153. Coffey S, Williams MJ, Phillips LV, *et al.* Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis. *Sci Rep* 2016; 6: 36904

Referencias

154. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3(9): e3148
155. Panganiban RP, Lambert KA, Hsu MH, *et al.* Isolation and profiling of plasma microRNAs: Biomarkers for asthma and allergic rhinitis. *Methods* 2019; 152: 48-54
156. Liang Y, Ridzon D, Wong L, *et al.* Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007; 8: 166
157. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, *et al.* Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 2009; 55(11): 1977-83
158. Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, *et al.* Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(11): 3794-802
159. Chen NX, Kiattisunthorn K, O'Neill KD, *et al.* Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD). *PLoS One* 2013; 8(5): e64558
160. Lorenzen JM, Kielstein JT, Hafer C, *et al.* Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6(7): 1540-6
161. Salcedo C, Joubert PH, Ferrer MD, *et al.* A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients. *Br J Clin Pharmacol* 2019; 85(4): 796-806
162. Ferrer MD, Perez MM, Canaves MM, *et al.* A novel pharmacodynamic assay to evaluate the effects of crystallization inhibitors on calcium phosphate crystallization in human plasma. *Sci Rep* 2017; 7(1): 6858
163. Grases F, Sanchis P, Perello J, *et al.* Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* 2006; 11: 136-42
164. Grases F, Sanchis P, Perello J, *et al.* Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circ J* 2007; 71(7): 1152-6
165. Ryan WG. Two Decades of Experience in the Treatment of Paget's Disease of Bone with Plicamycin (Mithramycin). *Paget's Disease of Bone*. Springer 1991, 176-90.
166. Paul Tuck S, Layfield R, Walker J, *et al.* Adult Paget's disease of bone: a review. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56(12): 2050-9
167. Parsons V, Baum M, Self M. Effect of mithramycin on calcium and hydroxyproline metabolism in patients with malignant disease. *Br Med J* 1967; 1(5538): 474-7
168. Lombo F, Menendez N, Salas JA, *et al.* The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73(1): 1-14
169. Du Priest RW, Jr., Fletcher WS. Chemotherapy of testicular germinal tumors. *Oncology* 1973; 28(2): 147-63
170. Barcelo F, Ortiz-Lombardia M, Martorell M, *et al.* DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis. *Biochemistry* 2010; 49(49): 10543-52
171. Vizcaino C, Mansilla S, Portugal J. Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2015; 152: 111-24
172. Kennedy BJ. Metabolic and toxic effects of mithramycin during tumor therapy. *Am J Med* 1970; 49(4): 494-503
173. Zhang X, Li R, Qin X, *et al.* Sp1 Plays an Important Role in Vascular Calcification Both In Vivo and In Vitro. *J Am Heart Assoc* 2018; 7(6):
174. Martinez T, Wright N, Lopez-Fraga M, *et al.* Silencing human genetic diseases with oligonucleotide-based therapies. *Hum Genet* 2013; 132(5): 481-93
175. Nedaeinia R, Sharifi M, Avan A, *et al.* Locked nucleic acid anti-miR-21 inhibits cell growth and invasive behaviors of a colorectal adenocarcinoma cell line: LNA-anti-miR as a novel approach. *Cancer Gene Ther* 2016; 23(8): 246-53
176. Rezaei F, Daryani A, Sharifi M, *et al.* miR-20a inhibition using locked nucleic acid (LNA) technology and its effects on apoptosis of human macrophages infected by Toxoplasma

- gondii RH strain. *Microb Pathog* 2018; 121: 269-76
177. Gebert LF, Rebhan MA, Crivelli SE, *et al.* Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(1): 609-21
178. Putta S, Lanting L, Sun G, *et al.* Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(3): 458-69
179. Brennan EP, Nolan KA, Borgeson E, *et al.* Lipoxins attenuate renal fibrosis by inducing let-7c and suppressing TGFbetaR1. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(4): 627-37
180. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, *et al.* miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368(2): 267-72
181. Junyent Priu M, Martínez M, Borrás M, *et al.* Utilidad de las técnicas de imagen y biomarcadores en la predicción del riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica en España: Proyecto NEFRONA. *Nefrología (Madrid)* 2010; 30(1): 119-26
182. Calleros-Basilio L, Cortes MA, Garcia-Jerez A, *et al.* Quality Assurance of Samples and Processes in the Spanish Renal Research Network (REDinREN) Biobank. *Biopreserv Biobank* 2016; 14(6): 499-510
183. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, *et al.* Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22(1): 1-23; quiz 101-2
184. Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, *et al.* Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2003; 16(7): 777-802
185. Panizo S, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, *et al.* Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32(11): 1831-40
186. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, *et al.* Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11): 2857-67
187. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone: 1990.
188. Connerty HV, Briggs AR. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(3): 290-6
189. Moorehead WR, Biggs HG. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalinizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clin Chem* 1974; 20(11): 1458-60
190. Walmsley TA, Fowler RT. Optimum use of 8-hydroxyquinoline in plasma calcium determinations. *Clin Chem* 1981; 27(10): 1782
191. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, *et al.* Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(6): 1135-42
192. García del Moral R. *Laboratorio de anatomía patológica*. McGraw-Hill: 2003.
193. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676-82
194. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23(4): 291-9
195. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8
196. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, *et al.* Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5(3): 492-7
197. Doss JF, Corcoran DL, Jima DD, *et al.* A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. *BMC Genomics* 2015; 16: 952

Referencias

198. Juzenas S, Venkatesh G, Hubenthal M, *et al.* A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(16): 9290-301
199. Clement T, Salone V, Charpentier B, *et al.* Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes. *Biomed Mater Eng* 2014; 24(1 Suppl): 3-16
200. Ham O, Lee SY, Song BW, *et al.* Small molecule-mediated induction of miR-9 suppressed vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury. *Oncotarget* 2017; 8(55): 93360-72
201. Liu XJ, Hong Q, Wang Z, *et al.* MicroRNA-34a Suppresses Autophagy in Tubular Epithelial Cells in Acute Kidney Injury. *Am J Nephrol* 2015; 42(2): 168-75
202. Badi I, Mancinelli L, Polizzotto A, *et al.* miR-34a Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Calcification by Downregulating SIRT1 (Sirtuin 1) and Axl (AXL Receptor Tyrosine Kinase). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38(9): 2079-90
203. Sun HX, Zeng DY, Li RT, *et al.* Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 2012; 60(6): 1407-14
204. Faccini J, Ruidavets JB, Cordelier P, *et al.* Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Sci Rep* 2017; 7: 42916
205. Muralidharan J, Ramezani A, Hubal M, *et al.* Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 312(6): F982-F91
206. Yang F, Chen Q, He S, *et al.* miR-22 Is a Novel Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation and Neointima Formation. *Circulation* 2018; 137(17): 1824-41
207. Rangrez AY, M'Baya-Moutoula E, Metzinger-Le Meuth V, *et al.* Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. *PLoS One* 2012; 7(10): e47807
208. El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T, *et al.* Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci Rep* 2016; 6: 19529
209. Guo Y, Vickers K, Xiong Y, *et al.* Comprehensive evaluation of extracellular small RNA isolation methods from serum in high throughput sequencing. *BMC Genomics* 2017; 18(1): 50
210. Tan GW, Khoo AS, Tan LP. Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs. *Sci Rep* 2015; 5: 9430
211. Spornraft M, Kirchner B, Haase B, *et al.* Optimization of extraction of circulating RNAs from plasma--enabling small RNA sequencing. *PLoS One* 2014; 9(9): e107259
212. Moret I, Sanchez-Izquierdo D, Iborra M, *et al.* Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS One* 2013; 8(12): e82753
213. Ramon-Nunez LA, Martos L, Fernandez-Pardo A, *et al.* Comparison of protocols and RNA carriers for plasma miRNA isolation. Unraveling RNA carrier influence on miRNA isolation. *PLoS One* 2017; 12(10): e0187005
214. Meerson A, Ploug T. Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation. *Biology Methods and Protocols* 2016; 1(1):
215. Wang K, Yuan Y, Cho JH, *et al.* Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012; 7(7): e41561
216. Gonzalez-Suarez I, Naves M, Diaz-Corte C, *et al.* Effect of aluminium on calcium-sensing receptor expression, proliferation, and apoptosis of parathyroid glands from rats with chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* 2003; (85): S39-43
217. Qin W, Chung AC, Huang XR, *et al.* TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(8): 1462-74
218. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, *et al.* Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009; 284(23): 15676-84

219. Wang J, Duan L, Guo T, *et al.* Downregulation of miR-30c promotes renal fibrosis by target CTGF in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 2016; 30(3): 406-14
220. Zhang Y, Xie RL, Croce CM, *et al.* A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(24): 9863-8
221. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* 2012; 119(3): 646-8
222. Beltrami C, Simpson K, Jesky M, *et al.* Association of Elevated Urinary miR-126, miR-155, and miR-29b with Diabetic Kidney Disease. *Am J Pathol* 2018; 188(9): 1982-92
223. Ghai V, Wu X, Bheda-Malge A, *et al.* Genome-wide Profiling of Urinary Extracellular Vesicle microRNAs Associated With Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Kidney Int Rep* 2018; 3(3): 555-72
224. Wang B, Komers R, Carew R, *et al.* Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(2): 252-65
225. Chen HY, Zhong X, Huang XR, *et al.* MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. *Mol Ther* 2014; 22(4): 842-53
226. Panizo S, Naves-Diaz M, Carrillo-Lopez N, *et al.* MicroRNAs 29b, 133b, and 211 Regulate Vascular Smooth Muscle Calcification Mediated by High Phosphorus. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(3): 824-34
227. Mendez C, Gonzalez-Sabin J, Moris F, *et al.* Expanding the Chemical Diversity of the Antitumoral Compound Mithramycin by Combinatorial Biosynthesis and Biocatalysis: The Quest for Mithralogs with Improved Therapeutic Window. *Planta Med* 2015; 81(15): 1326-38
228. Nunez LE, Nybo SE, Gonzalez-Sabin J, *et al.* A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 2012; 55(12): 5813-25
229. Vizcaino C, Nunez LE, Moris F, *et al.* Genome-wide modulation of gene transcription in ovarian carcinoma cells by a new mithramycin analogue. *PLoS One* 2014; 9(8): e104687
230. Pandiella A, Moris F, Ocana A, *et al.* Antitumoral activity of the mithralog EC-8042 in triple negative breast cancer linked to cell cycle arrest in G2. *Oncotarget* 2015; 6(32): 32856-67
231. Tornin J, Martinez-Cruzado L, Santos L, *et al.* Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma. *Oncotarget* 2016; 7(21): 30935-50
232. Choi ES, Nam JS, Jung JY, *et al.* Modulation of specificity protein 1 by mithramycin A as a novel therapeutic strategy for cervical cancer. *Sci Rep* 2014; 4: 7162
233. Li L, Artlett CM, Jimenez SA, *et al.* Positive regulation of human alpha 1 (I) collagen promoter activity by transcription factor Sp1. *Gene* 1995; 164(2): 229-34
234. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des* 2009; 15(12): 1385-400
235. Nicolas M, Noe V, Jensen KB, *et al.* Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22126-32
236. Nicolas M, Noe V, Ciudad CJ. Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J* 2003; 371(Pt 2): 265-75
237. Alliston T, Choy L, Ducey P, *et al.* TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001; 20(9): 2254-72
238. Kang JS, Alliston T, Delston R, *et al.* Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J* 2005; 24(14): 2543-55
239. Liu Y, Drozdov I, Shroff R, *et al.* Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2013; 112(10): e99-109
240. Fang M, Wang CG, Zheng C, *et al.* Mir-29b promotes human aortic valve interstitial cell calcification via inhibiting TGF-beta3 through

Referencias

- activation of wnt3/beta-catenin/Smad3 signaling. *J Cell Biochem* 2018; 119(7): 5175-85
241. Haeussler M, Zweig AS, Tyner C, *et al.* The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(D1): D853-D8
242. Khan A, Fornes O, Stigliani A, *et al.* JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(D1): D260-D6
243. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108(1): 17-29
244. Yun-Feng W, Matsuo N, Sumiyoshi H, *et al.* Sp7/Osterix up-regulates the mouse pro-alpha3(V) collagen gene (Col5a3) during the osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 503-8
245. Zhang C, Dai H, de Crombrughe B. Characterization of Dkk1 gene regulation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(4): 782-6
246. Zhang C, Tang W, Li Y. Matrix metalloproteinase 13 (MMP13) is a direct target of osteoblast-specific transcription factor osterix (Osx) in osteoblasts. *PLoS One* 2012; 7(11): e50525
247. Hojo H, Ohba S, He X, *et al.* Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev Cell* 2016; 37(3): 238-53
248. Chen Q, Liu W, Sinha KM, *et al.* Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *PLoS One* 2013; 8(3): e58104
249. Yoshida T, Yamashita M, Hayashi M. Kruppel-like factor 4 contributes to high phosphate-induced phenotypic switching of vascular smooth muscle cells into osteogenic cells. *J Biol Chem* 2012; 287(31): 25706-14
250. Zhang J, Zheng B, Zhou PP, *et al.* Vascular calcification is coupled with phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells through Klf5-mediated transactivation of the Runx2 promoter. *Biosci Rep* 2014; 34(6): e00148
251. Barral Varela AM. Calcificación de la válvula aórtica: estudio de microRNAs y su posible aplicación clínica. 2015:
252. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, *et al.* Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003; 107(17): 2181-4
253. Mazur P, Wypasek E, Gaweda B, *et al.* Stenotic Bicuspid and Tricuspid Aortic Valves- Micro-Computed Tomography and Biological Indices of Calcification. *Circ J* 2017; 81(7): 1043-50
254. Chitsaz S, Gundiah N, Blackshear C, *et al.* Correlation of calcification on excised aortic valves by micro-computed tomography with severity of aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 2012; 21(3): 320-7
255. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, *et al.* Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28(1): 2-17
256. Schlieper G, Aretz A, Verberckmoes SC, *et al.* Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(4): 689-96
257. Roijers RB, Debernardi N, Cleutjens JP, *et al.* Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am J Pathol* 2011; 178(6): 2879-87
258. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; 7(1): 1535750
259. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14(7): 677-85
260. Gomez-Stallons MV, Wirrig-Schwendeman EE, Hassel KR, *et al.* Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36(7): 1398-405
261. Yip CY, Simmons CA. The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease. *Cardiovasc Pathol* 2011; 20(3): 177-82

262. Charest A, Pepin A, Shetty R, *et al.* Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart* 2006; 92(12): 1844-9
263. Bouchareb R, Boulanger MC, Fournier D, *et al.* Mechanical strain induces the production of spheroid mineralized microparticles in the aortic valve through a RhoA/ROCK-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 67: 49-59
264. Cui L, Rashdan NA, Zhu D, *et al.* End stage renal disease-induced hypercalcemia may promote aortic valve calcification via Annexin VI enrichment of valve interstitial cell derived-matrix vesicles. *J Cell Physiol* 2017; 232(11): 2985-95
265. Cui L, Houston DA, Farquharson C, *et al.* Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone* 2016; 87: 147-58
266. Luo G, Ducy P, McKee MD, *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386(6620): 78-81
267. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002; 277(6): 4388-94
268. Cheng CL, Chang HH, Huang PJ, *et al.* Different Calcification Stage in Each Cusp of a Calcified Tricuspid Aortic Valve. *Circ J* 2017; 81(12): 1953-5
269. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, *et al.* High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 93(6): 2393-402
270. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, *et al.* Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(12): 1998-2003
271. Schurgers LJ, Dissel PE, Spronk HM, *et al.* Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Z Kardiol* 2001; 90 Suppl 3: 57-63
272. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, *et al.* Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003; 1(1): 178-85
273. Ueland T, Gullestad L, Dahl CP, *et al.* Undercarboxylated matrix Gla protein is associated with indices of heart failure and mortality in symptomatic aortic stenosis. *J Intern Med* 2010; 268(5): 483-92
274. Wu R, Gao W, Yao K, *et al.* Roles of Exosomes Derived From Immune Cells in Cardiovascular Diseases. *Front Immunol* 2019; 10: 648
275. Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, *et al.* Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat Mater* 2016; 15(3): 335-43
276. Bakhshian Nik A, Hutcheson JD, Aikawa E. Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* 2017; 4: 78
277. Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, *et al.* Extracellular vesicles in neurodegenerative disease - pathogenesis to biomarkers. *Nat Rev Neurol* 2016; 12(6): 346-57
278. Turpin D, Truchetet ME, Faustin B, *et al.* Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2016; 15(2): 174-83
279. Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease: Potential Applications in Diagnosis, Prognosis, and Epidemiology. *Circ Res* 2017; 120(10): 1649-57
280. Amabile N, Cheng S, Renard JM, *et al.* Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J* 2014; 35(42): 2972-9
281. Walenta K, Schwarz V, Schirmer SH, *et al.* Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2012; 33(12): 1469-79
282. Clarke L, Fairley S, Zheng-Bradley X, *et al.* The international Genome sample resource (IGSR): A worldwide collection of genome variation incorporating the 1000 Genomes Project data. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(D1): D854-D9
283. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, *et al.* Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-

Referencias

- function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv* 2019: 531210
284. Djuric T, Stojkovic L, Zivkovic M, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 promoter genotypes and haplotypes are associated with carotid plaque presence. *Clin Biochem* 2012; 45(16-17): 1353-6
285. Chehaibi K, Hrira MY, Nouira S, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population. *J Neurol Sci* 2014; 342(1-2): 107-13
286. Armstrong C, Abilleira S, Sitzer M, *et al.* Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 2007; 38(11): 2895-9
287. Martin M, Pichel IA, Florez Munoz JP, *et al.* Low transcriptional activity haplotype of matrix metalloproteinase 1 is less frequent in bicuspid aortic valve patients. *Gene* 2013; 524(2): 304-8
288. Roman-Garcia P, Coto E, Reguero JR, *et al.* Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis* 2009; 20(6): 383-6
289. Gross J. How tadpoles lose their tails: path to discovery of the first matrix metalloproteinase. *Matrix Biol* 2004; 23(1): 3-13
290. Wang H, Leinwand LA, Anseth KS. Cardiac valve cells and their microenvironment--insights from in vitro studies. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11(12): 715-27
291. Rodriguez KJ, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90(4): 1043-53
292. Rodriguez KJ, Piechura LM, Porras AM, *et al.* Manipulation of valve composition to elucidate the role of collagen in aortic valve calcification. *BMC Cardiovasc Disord* 2014; 14: 29
293. Chen HY, Dufresne L, Burr H, *et al.* Association of LPA Variants With Aortic Stenosis: A Large-Scale Study Using Diagnostic and Procedural Codes From Electronic Health Records. *JAMA Cardiol* 2018; 3(1): 18-23
294. Santos PC, Bueno CT, Lemos PA, *et al.* LPA rs10455872 polymorphism is associated with coronary lesions in Brazilian patients submitted to coronary angiography. *Lipids Health Dis* 2014; 13: 74
295. Wei WQ, Li X, Feng Q, *et al.* LPA Variants Are Associated With Residual Cardiovascular Risk in Patients Receiving Statins. *Circulation* 2018; 138(17): 1839-49
296. Bajaj A, Damrauer SM, Anderson AH, *et al.* Lipoprotein(a) and Risk of Myocardial Infarction and Death in Chronic Kidney Disease: Findings From the CRIC Study (Chronic Renal Insufficiency Cohort). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37(10): 1971-8

7. Publicaciones

Como resultado de los trabajos realizados durante el periodo de formación como doctorando, Guillermo Solache Berrocal ha participado activamente no solo en la elaboración de su Tesis Doctoral, sino también en otros trabajos científicos de temática relacionada. Se adjunta a continuación un listado de publicaciones en orden de responsabilidad e implicación en las mismas:

- Asociación del polimorfismo 1G>2G de la MMP1 con calcificación de la válvula aórtica.
Solache-Berrocal G., Barral A., Martín M., Román-García P., Llosa J.C., Naves-Díaz M., Cannata-Andía J.B., Rodríguez I.
Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (2016) 8; 4: 115-120 [artículo original].
- Efecto del sistema RANK/RANKL/OPG sobre la desmineralización ósea y la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica.
Martínez-Arias L., Solache-Berrocal G., Panizo-García S., Carrillo-López N., Avello-Llano N., Quirós-Caso C., Naves Díaz M., Cannata Andía J.B.
Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (2016) 8; 4: 105-114 [artículo original].
- Hipometilación del gen de la PTH por elevado fósforo de la dieta: un posible agravante epigenético de la severidad del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica.
Bedia-Díaz G., Carrillo-López N., Solache-Berrocal G., Dusso A., Rodríguez I., Naves Díaz M., Cannata-Andía J.B., Román-García P.
Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral (2017) 9; 4: 114-120 [artículo original].
- Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis.
Panizo S., Carrillo-López N., Naves-Díaz M., Solache-Berrocal G., Martínez-Arias L., Rodríguez-Díez R.R., Fernández-Vázquez A., Martínez-Salgado C., Ruiz-Ortega M., Dusso A., Cannata-Andía J.B., Rodríguez I.
Nephrology, dialysis, transplantation (2017). 32; 11: 1831-1840 [artículo original].
- Bicuspid aortic valve syndrome: diversity and controversy.
Martín M., Barriales V., Solache-Berrocal G., Rozado J., Morís C., Rodríguez I.
The International Journal of Cardiovascular Imaging (2016) 32; 6: 853 [letter].
- Nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and dissection: finally answers.
Martín M., Barriales V., Rozado J., Fidalgo A., Iglesias D.G., Solache-Berrocal G., Morís C., Cabo R.A., Rodríguez I.
International Journal of Cardiology (2016) 214: 133 [letter].

