

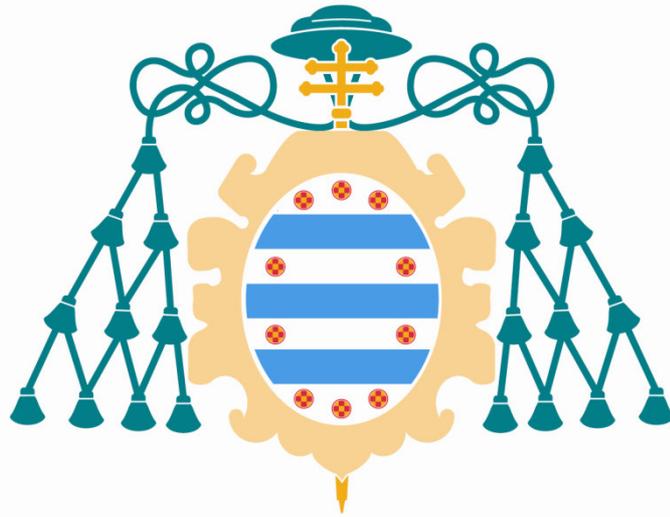
Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

**Determinación de marcadores para la detección temprana de riesgo de calcificaciones vasculares: estudio de proteínas de la matriz extracelular**

**Noelia Martín Fernández**





# Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

**Determinación de marcadores para la detección temprana de riesgo de calcificaciones vasculares: estudio de proteínas de la matriz extracelular**

**Noelia Martín Fernández**







## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Determinación de marcadores para la detección temprana de riesgo de calcificaciones vasculares: estudio de proteínas de la matriz extracelular.	Inglés: Determination of biomarkers for early detection of vascular calcification risk: study of extracellular matrix proteins.
2.- Autor	
Nombre: Noelia Martín Fernández	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Medicina	
Órgano responsable: Comisión Académica del Programa de Doctorado Investigación en Medicina	

### RESUMEN (en español)

**Introducción:** La calcificación vascular ocurre en población sana, pero es especialmente frecuente en los pacientes con insuficiencia renal crónica, en los que es la principal causa de morbi-mortalidad. Pero no todos los pacientes tienen el mismo riesgo de desarrollar calcificaciones y por eso es importante la identificación de marcadores que predispongan a este proceso. Unos posibles candidatos son las proteínas de la matriz extracelular, el espacio donde ocurre la calcificación. En arterias humanas calcificadas se ha visto un aumento de expresión de proteínas típicamente óseas, como osteocalcina y proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y una disminución de proteínas que antagonizan la mineralización: osteopontina, proteína GLA de matriz (MGP) y osteonectina, entre otras, todas presentes en la matriz extracelular. Estos aumentos y/o disminuciones de los niveles de proteínas pueden ser debidos a distintas causas, como variantes alélicas presentes en sus genes que podrían alterar los niveles de las proteínas y, por tanto, alterar el proceso acelerándolo o inhibiéndolo.

**Objetivo principal:** identificar un marcador precoz del riesgo de desarrollar calcificaciones vasculares que permita clasificar a los pacientes renales de alto riesgo, para diseñar acciones preventivas. **Objetivos específicos:** Caracterizar la variación genómica de polimorfismos en genes candidatos en la población NEFRONA. Estudiar la asociación entre las variantes y la presencia de calcificaciones vasculares o de otra característica clínica relevante. Determinar en plasma los niveles de las proteínas asociadas y correlacionarlos con las características clínicas de los individuos. Determinar la correlación entre los polimorfismos y los niveles de las correspondientes proteínas en el plasma de pacientes.

**Desarrollo:** La población en estudio consistió en una cohorte de 2053 personas que incluyó tanto pacientes en distintos estadios de enfermedad renal (2-3, 4-5 y en diálisis) como controles sanos, y que forma parte del estudio NEFRONA. Se determinaron los genotipos de 31 polimorfismos de una serie de genes candidatos seleccionados con criterios funcionales: BMP-2, -4, -7, fetuina, MMP-1, -2, -3, -9, MGP, MSX-1, -2, osteopontina, osteocalcina y RUNX2. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas y se buscaron asociaciones estadísticamente significativas con la presencia y progresión de las calcificaciones vasculares presentes en



arterias femorales y carótidas y con las características clínicas y bioquímicas de los pacientes. Se determinaron los niveles de proteínas candidatas en plasma de los pacientes.

**Resultados:** En nuestra población con enfermedad renal fue más frecuente la calcificación a nivel de arteria femoral que de carótida (24% frente a 18% en pacientes en diálisis). Además, en nuestra población sana también se encontró un 5% de personas con calcificación vascular, mayoritariamente en arteria femoral. De los 3 polimorfismos cuyas frecuencias eran diferentes en individuos con y sin calcificación, solo rs4242182 del gen del factor de transcripción MSX2 se asoció independientemente a la calcificación vascular en estadios tempranos de enfermedad, con una OR similar al hecho de ser fumador en nuestro modelo (OR=2,3). El polimorfismo rs1800802, situado en la región promotora de MGP, se asoció de forma independiente con progresión de la calcificación total (especialmente en femoral) en estadios tempranos, aportando la OR más alta en nuestro modelo (OR=4,4). Ninguno de los polimorfismos se asoció con enfermedad renal, utilizando como variable dependiente el valor del filtrado glomerular calculado como MDRD4. Los niveles circulantes de MGP fueron significativamente más elevados en los grupos a medida que progresa la enfermedad, con una correlación inversa significativa con el filtrado glomerular. También fueron más altos en pacientes con calcificación en femoral comparados con los no calcificados. Sin embargo, esta variable no contribuyó a predecir calcificación cuando se incluyen en el modelo los factores de riesgo independientes observados en nuestro estudio. En un modelo lineal multivariante, tanto los 3 polimorfismos de MGP como el estadio de enfermedad contribuyeron independientemente a la predicción de los niveles de MGP.

**Conclusión:** Hemos identificado polimorfismos en los genes MSX2 y MGP que se asocian independientemente con calcificación vascular en estadios tempranos de la enfermedad renal y que, por tanto, podrían tenerse en cuenta a la hora de predecir el riesgo de calcificación de un paciente. Más estudios en otros genes y marcadores y en otras poblaciones son necesarios para conseguir una predicción lo más temprana posible, antes de que la calcificación empiece a producirse.



## RESUMEN (en Inglés)

**Introduction:** Vascular calcification occurs in healthy population, but is especially common in patients with chronic renal failure, where it is the main cause of morbidity and mortality. However, not all patients are at the same risk of developing calcifications and thus it is important to identify markers predisposing to this process. Possible candidates are extracellular matrix proteins, the space where calcification occurs. Calcified human arteries have been shown to increase expression of typically bone proteins, such as osteocalcin and bone morphogenetic proteins (BMP) and decrease in mineralization-antagonizing proteins: osteopontin, matrix GLA protein (MGP) and osteonectin, among others, present in the extracellular matrix. These increases and/or decreases in protein levels may be due to different causes, such as allelic variants present in their genes that could alter protein levels and, therefore, alter the process by accelerating or inhibiting it.

**Main objective:** to identify an early marker of the risk of developing vascular calcifications that allows classifying high-risk renal patients to design preventive actions.

**Specific objectives:** To characterize the genomic variation of polymorphisms in candidate genes in the NEFRONA population. To study the association between variants and the presence of vascular calcifications or other relevant clinical features. To determine in plasma the levels of the associated proteins and to correlate them with clinical characteristics of the individuals. To determine the correlation between polymorphisms and levels of the corresponding proteins in the plasma of patients.

**Development:** The study population consisted of a cohort of 2053 people who included both patients in different stages of kidney disease (2-3, 4-5 and dialysis) as well as healthy controls, which is part of the NEFRONA study. The genotypes of 31 polymorphisms were determined from a series of candidate genes selected with functional criteria: BMP-2, -4, -7, fetuin, MMP-1, -2, -3, -9, MGP, MSX-1, -2, osteopontin, osteocalcin, and RUNX2. Allele and genotype frequencies were analyzed and statistically significant associations were sought with the presence and progression of vascular calcifications present in femoral and carotid arteries and with the clinical and biochemical characteristics of the patients. The levels of candidate proteins in plasma of the patients were determined.

**Results:** In our population with renal disease, calcification at the femoral artery level was more frequent than in the carotid artery (24% vs 18% in dialysis patients). In addition, in our healthy population also found 5% of people with vascular calcification, mainly in the femoral artery. Of the 3 polymorphisms whose frequencies were different in individuals with and without calcification, only rs4242182 of the transcription factor gene MSX2 was independently associated with vascular calcification in early stages of disease, with an OR similar to smoking status in our model (OR=2.3). The polymorphism rs1800802, located in the promoter region of MGP, was independently associated with progression of total calcification (especially in femoral) in early stages, with the biggest OR in our model (OR=4.4). None of the polymorphisms was associated with renal disease, using as a dependent variable the value of the glomerular filtration calculated as MDRD4. Circulating levels of MGP were significantly higher in the groups as the disease progressed, with a significant inverse correlation with



glomerular filtration. They were also higher in patients with femoral calcification compared to non-calcified ones. However, this variable did not contribute to predicting calcification when the independent risk factors observed in our study were included in the model. In a multivariate linear model, both the 3 MGP polymorphisms and the disease stage contributed independently to the prediction of MGP levels.

**Conclusion:** We have identified polymorphisms in the MSX2 and MGP genes that are independently associated with vascular calcification in the early stages of renal disease and, therefore, could be taken into account when predicting the risk of calcification in a patient. Further studies in other genes and markers and in other populations are necessary to get a prediction as early as possible, before calcification begins to occur.

# ÍNDICE

Índice de tablas.....	7
Índice de figuras.....	11
Abreviaturas.....	13
<b>1. Introducción.....</b>	<b>17</b>
1.1. Calcificación vascular.....	19
1.1.1. Calcificación vascular en los pacientes con enfermedad renal crónica.....	20
1.2. Pruebas diagnósticas para la detección de calcificaciones vasculares.....	22
1.2.1. Radiología convencional.....	24
1.2.2. Técnicas ecográficas.....	24
1.3. Fisiopatología de la calcificación vascular.....	25
1.4. Proteínas de la matriz extracelular.....	26
1.4.1. Proteína Gla de la matriz.....	26
1.4.2. Osteopontina.....	26
1.4.3. Proteínas morfogenéticas óseas.....	27
1.4.4. Metaloproteasas de matriz extracelular.....	28
1.4.5. Estudios genéticos relacionados con la calcificación vascular.....	29
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Pacientes y métodos.....</b>	<b>39</b>
4.1. Diseño del estudio: selección de la población NEFRONA.....	41
4.2. Variables consideradas.....	41
4.3. Medidas utilizadas para determinar calcificación vascular.....	42
4.4. Aspectos éticos.....	42
4.5. Selección de polimorfismos candidatos.....	42

4.6.	Genotipado.....	43
4.7.	Determinación de niveles de proteínas de la matriz extracelular en plasma mediante ELISA.....	43
4.8.	Análisis estadístico.....	44
<b>5.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>45</b>
5.1.	Características de la población.....	47
5.2.	Cálculo de variables para estimar calcificación vascular.....	49
5.3.	Características de la población en función de la calcificación vascular.....	52
5.4.	Identificación de polimorfismos candidatos.....	56
5.5.	Frecuencias de los polimorfismos en nuestra población.....	58
5.6.	Búsqueda de asociación genética con calcificación vascular.....	61
5.7.	Búsqueda de asociación genética con la progresión del número de calcificaciones.....	63
5.8.	Análisis multivariante de la asociación de polimorfismos y calcificación....	64
5.9.	Análisis multivariante de la asociación de polimorfismos y progresión del número de calcificaciones.....	66
5.10.	Asociación de polimorfismos y filtrado glomerular.....	70
5.11.	Asociación de niveles circulantes de proteínas y calcificación vascular.....	71
5.12.	Análisis multivariante de la asociación de niveles circulantes de MGP y calcificación.....	75
5.13.	Asociación de niveles circulantes de MGP y polimorfismos.....	76
5.14.	Análisis multivariante de los niveles de MGP.....	78
<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>95</b>

# Índice de tablas

Tabla 1. Categorías del filtrado glomerular.

Tabla 2. Categorías de albuminuria.

Tabla 3. Parámetros de función renal de los individuos incluidos en el estudio.

Tabla 4. Variables antropométricas y clínicas de los grupos estudiados.

Tabla 5. Variables bioquímicas séricas de los grupos de individuos estudiados.

Tabla 6. Número de calcificaciones en la arteria femoral en los distintos grupos al principio del estudio.

Tabla 7. Número de calcificaciones en la arteria carótida en los distintos grupos al principio del estudio.

Tabla 8. Número de calcificaciones en las arterias carótida y femoral en los distintos grupos al principio del estudio.

Tabla 9. Número de individuos con calcificación en algún territorio de la arteria femoral en los distintos grupos a estudio.

Tabla 10. Número de individuos con calcificación en algún territorio de la arteria carótida en los distintos grupos a estudio.

Tabla 11. Número de individuos con calcificación en algún territorio de las arterias femoral y carótida en los distintos grupos a estudio.

Tabla 12. Número de calcificaciones en la arteria femoral en los distintos grupos a estudio, a 24 meses de seguimiento.

Tabla 13. Número de calcificaciones en la arteria carótida en los distintos grupos a estudio, a 24 meses de seguimiento.

Tabla 14. Número de calcificaciones en las arterias femoral y carótida en los distintos grupos a estudio, a 24 meses de seguimiento.

Tabla 15. Número de individuos con progresión en el número de calcificaciones en la arteria femoral a los 24 meses de seguimiento, en los distintos grupos a estudio.

Tabla 16. Número de individuos con progresión en el número de calcificaciones en la arteria carótida a los 24 meses de seguimiento, en los distintos grupos a estudio.

Tabla 17. Número de individuos con progresión en el número de calcificaciones en las arterias femoral y/o carótida a los 24 meses de seguimiento, en los distintos grupos a estudio.

Tabla 18. Diferencias en variables antropométricas y clínicas de la población dividida en grupos según estén o no calcificados.

- Tabla 19. Diferencias en variables bioquímicas de la población dividida en grupos según estén o no calcificados.
- Tabla 20. Diferencias en variables de función renal de la población dividida en grupos según estén o no calcificados.
- Tabla 21. Polimorfismos seleccionados pertenecientes a genes de proteínas de matriz extracelular.
- Tabla 22. Polimorfismos seleccionados pertenecientes a factores de transcripción relacionados con el proceso de calcificación vascular.
- Tabla 23. Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados.
- Tabla 24. Comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población.
- Tabla 25. Número de calcificaciones en la arteria femoral de acuerdo al genotipo para el polimorfismo rs1800801 de MGP.
- Tabla 26. Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800801 de MGP en función de la presencia o no de calcificaciones en la arteria femoral.
- Tabla 27. Número de calcificaciones en la arteria carótida de acuerdo al genotipo para el polimorfismo rs7771980 de RUNX2.
- Tabla 28. Distribución de genotipos del polimorfismo rs7771980 de RUNX2 en función de la presencia o no de calcificaciones en la arteria carótida.
- Tabla 29. Número de calcificaciones en las arterias femoral y carótida de acuerdo al genotipo para el polimorfismo rs4242182 de MSX2.
- Tabla 30. Distribución de genotipos del polimorfismo rs4242182 de MSX2 en función de la presencia o no de calcificaciones en las arterias femoral y carótida.
- Tabla 31. Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800802 de MGP en función de la progresión o no del número de calcificaciones en la arteria femoral o en las arterias femoral y carótida (total).
- Tabla 32. Distribución de genotipos del polimorfismo rs514921 de MMP1 en función de la progresión o no del número de calcificaciones en las arterias femoral y carótida.
- Tabla 33. Regresión logística binaria múltiple en función de la calcificación total.
- Tabla 34. Regresión logística binaria múltiple en función de la calcificación total estratificando por estadio de ERC.
- Tabla 35. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión del número de calcificaciones.
- Tabla 36. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión de la calcificación estratificando por estadio de ERC.

- Tabla 37. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión de la calcificación en arteria femoral.
- Tabla 38. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión de la calcificación femoral estratificando por estadio de ERC.
- Tabla 39. Modelo lineal (ANCOVA) para el filtrado glomerular.
- Tabla 40. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el estadio de ERC.
- Tabla 41. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según tengan o no calcificación vascular.
- Tabla 42. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según tengan o no calcificación en la arteria femoral.
- Tabla 43. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según tengan o no calcificación en la arteria carótida.
- Tabla 44. Regresión logística binaria múltiple de los niveles de MGP en función de la calcificación.
- Tabla 45. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs1800801.
- Tabla 46. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo agrupado según un modelo de herencia dominante, para el polimorfismo rs1800801.
- Tabla 47. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs1800802.
- Tabla 48. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo agrupado según un modelo de herencia dominante, para el polimorfismo rs1800802.
- Tabla 49. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs4236.
- Tabla 50. Modelo lineal multivariante de los niveles de MGP en función de los polimorfismos de MGP.



# Índice de figuras

Figura 1. Capas de la pared arterial.

Figura 2. Imágenes tomadas mediante PET, CT y fusión de las mismas donde se aprecia la calcificación en la pared de la aorta. Imágenes cedidas por el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Central de Asturias.

Figura 3. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes en distintos estadios de enfermedad renal.

Figura 4. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según presenten calcificación vascular o no.

Figura 5. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes agrupados según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800801.

Figura 6. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800801 agrupados siguiendo un modelo de herencia recesiva.

Figura 7. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes agrupados según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800802.

Figura 8. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800802 agrupados siguiendo un modelo de herencia dominante.

Figura 9. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes agrupados según los distintos genotipos del polimorfismo rs4236.



# Abreviaturas

BMP: Proteína morfogenética ósea (del inglés *bone morphogenetic protein*)

CT: Tomografía computarizada

DMO: Densidad mineral ósea

ERC: Enfermedad renal crónica

FG: Filtrado glomerular

GIM: Grosor íntima-media

IC: Intervalo de confianza

IMC: Índice de masa corporal

ITB: Índice tobillo-brazo

MAF: Frecuencia del alelo minoritario (del inglés *minor allele frequency*)

MGP: Proteína Gla de la matriz

MMP: Metaloproteasa de la matriz extracelular (del inglés *matrix metalloproteinase*)

OPN: Osteopontina

OR: Odds ratio

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PET: Tomografía por emisión de positrones

RUNX2: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt

VSMC: Células de músculo liso vascular (del inglés, *vascular smooth muscle cells*)



# **1. Introducción**



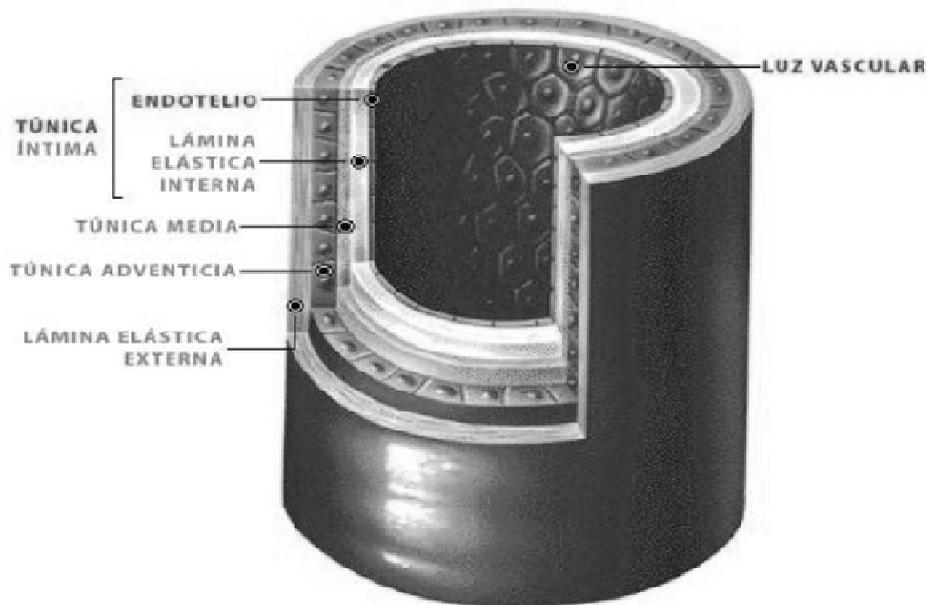
## 1.1 Calcificación vascular

La calcificación vascular es un fenómeno común en la población general. Este proceso se ve acelerado en personas de edad avanzada y está modulado por la presencia de ciertos factores de riesgo como tabaquismo, diabetes, hipertensión y dislipemia.<sup>1, 2</sup> La calcificación vascular está asociada con una mayor probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares tales como rigidez arterial, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular entre otras.<sup>3, 4</sup>

La calcificación vascular puede afectar a diferentes arterias de nuestro organismo, desde grandes vasos elásticos como la aorta, hasta vasos pequeños como ocurre en la calcifilaxis, alteración vascular poco frecuente pero con una elevada tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC).<sup>5</sup>

En cuanto a la localización en la pared del vaso, las calcificaciones arteriales pueden darse tanto a nivel de la capa íntima como de la túnica media (Figura 1). Las calcificaciones de la capa íntima son consideradas como la evolución de una disfunción a nivel del endotelio, como respuesta inflamatoria que comienza con la acumulación de células espumosas (macrófagos activados) y acaba en la formación de placas de ateroma más o menos calcificadas (placas ateroscleróticas). Estas lesiones afectan a la función de conducción de los vasos dando lugar a oclusión arterial condicionante de isquemia. Además, dichas lesiones pueden progresar hacia la capa media.<sup>6</sup>

Las calcificaciones a nivel de la media se producen generalmente en la lámina elástica interna y afectan a la función de amortiguación de los vasos, lo que compromete el paso al transformar la presión y las fluctuaciones cíclicas de la circulación en la aorta en un flujo capilar continuo y de baja presión. Inicialmente, estas calcificaciones fueron consideradas como independientes de la aterosclerosis, no asociándose a placas de ateroma o hiperplasia de la íntima (esclerosis de Monckerberg)<sup>7, 8</sup> y sólo se relacionó con arteriosclerosis típica en personas de edad avanzada, diabéticos y ERC.<sup>9</sup> Sin embargo, actualmente no está clara esta clasificación y estudios recientes apuntan a que la esclerosis de Monckerberg puede ser una variante de aterosclerosis avanzada y calcificada con poca inflamación.<sup>10</sup> En contraposición, otros estudios observan calcificación exclusiva de la media por ejemplo en arterias mamarias de pacientes con ERC, tanto en diálisis como en estadios previos de la enfermedad en comparación con población sana.<sup>11, 12</sup>



**Figura 1. Capas de la pared arterial (tomado de Slideshare).**

### **1.1.1. Calcificación vascular en los pacientes con enfermedad renal crónica**

La ERC se define como la presencia, durante un periodo mínimo de tres meses, de al menos una de estas dos situaciones: filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> o daño renal. Este último se define por la presencia de anomalías estructurales o funcionales del riñón que puedan ocasionar potencialmente un descenso del FG con implicación para la salud. En concreto, daño renal incluye: albuminuria elevada, alteraciones en el sedimento urinario, alteraciones electrolíticas u otra alteraciones de origen tubular, alteraciones estructurales histológicas, alteraciones estructurales en pruebas de imagen y trasplante renal (Guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la ERC).<sup>13</sup>

La clasificación de la ERC se basa en la causa que la origina, que se establecerá según la presencia o ausencia de una enfermedad sistémica o según un diagnóstico anatomopatológico observado o presunto, y según las categorías del FG y de la albuminuria (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1. Categorías del filtrado glomerular.**

Categoría	FG	Descripción
G1	>90	Normal o elevado
G2	60-89	Ligeramente disminuido
G3a	45-59	Ligera o moderadamente disminuido
G3b	30-44	Moderada a gravemente disminuido
G4	15-29	Gravemente disminuido
G5	<15	Fallo renal

FG: filtrado glomerular (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)

**Tabla 2. Categorías de albuminuria.**

Categoría	Cociente albúmina/creatinina (mg/g) en muestra aislada de orina	Descripción
A1	<30	Normal a ligeramente elevada
A2	30-300	Moderadamente elevada
A3	>300	Muy elevada (incluye síndrome nefrótico)

La ERC es reconocida actualmente como un gran problema de salud pública con importantes implicaciones socioeconómicas, incluyendo los costosos tratamientos sustitutivos en la fase terminal, pérdida de calidad de vida para el paciente y sus familiares, así como por el abordaje, tanto a nivel preventivo como post-evento, de la enfermedad cardiovascular asociada a una mortalidad prematura que sufren un porcentaje elevado de estos pacientes. Según la *National Kidney Foundation*, la *American Heart Association* y el *Seventh Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*, la insuficiencia renal crónica se considera un factor de riesgo cardiovascular independiente.<sup>14, 15</sup> Incluso grados leves de disfunción renal, con valores de FG normales pero donde existe albuminuria, pueden aumentar el riesgo cardiovascular.<sup>16</sup>

En España, alrededor de un 10% de la población está diagnosticada de enfermedad renal (Estudio EPIRCE).<sup>17</sup> Además, se calcula que, aproximadamente el 40% de la población con enfermedad renal no diagnosticada fallecerá por una complicación secundaria a la ERC, generalmente por enfermedad cardiovascular, antes de entrar en un programa de diálisis. (Documento de consenso sobre la Enfermedad Renal, 27 noviembre 2012).

Dos millones de españoles tienen una función renal por debajo del 50% de lo normal y más de 40000 pacientes están en diálisis o trasplantados. La supervivencia global evaluada para los pacientes en diálisis es de un 12,9% a los diez años, a pesar de los avances técnicos del tratamiento. Ello podría estar relacionado con el hecho de que

el 50% tiene una media de tres factores de riesgo cardiovascular y una gran comorbilidad asociada. (Documento de consenso sobre la Enfermedad Renal, 27 noviembre 2012).

La mitad de las muertes en pacientes con tratamiento renal sustitutivo son debidas a eventos cardiovasculares.<sup>18</sup> (Informe de Diálisis y Trasplante 2014, Registro Español de Enfermos Renales). En el estudio CHOICE, en el que se compararon los factores de riesgo cardiovascular clásicos en 1041 pacientes en diálisis respecto a la población general, se comprobó que la prevalencia de estos factores es mayor en los pacientes en diálisis.<sup>19</sup> Pero también en población con función renal normal se observó una alta incidencia de calcificaciones a nivel de la aorta (*European Vertebral Osteoporosis Study, EVOS*). Sin embargo, la prevalencia de calcificaciones vasculares estaba significativamente aumentada en la población en hemodiálisis.<sup>20</sup>

En la población con ERC, las calcificaciones arteriales aparecen de forma precoz, progresan a una velocidad mayor y ocupan zonas más amplias que en la población general.<sup>21</sup> El primer estudio en establecer una asociación entre ERC y mortalidad cardiovascular fue el Framingham, en el que se demostró que la presencia de calcificación en la aorta abdominal era predictor de mortalidad.<sup>22</sup> En otro estudio se observó que el 40% de los pacientes con ERC (FG medio=33 ml/min) presentaban calcificaciones de las arterias coronarias en comparación con el 13% de los controles de edad similar y función renal normal.<sup>23</sup> Cabe destacar que en estudios realizados en población joven menor de 30 años en diálisis ya se encontró calcificación coronaria severa y progresiva.<sup>24</sup>

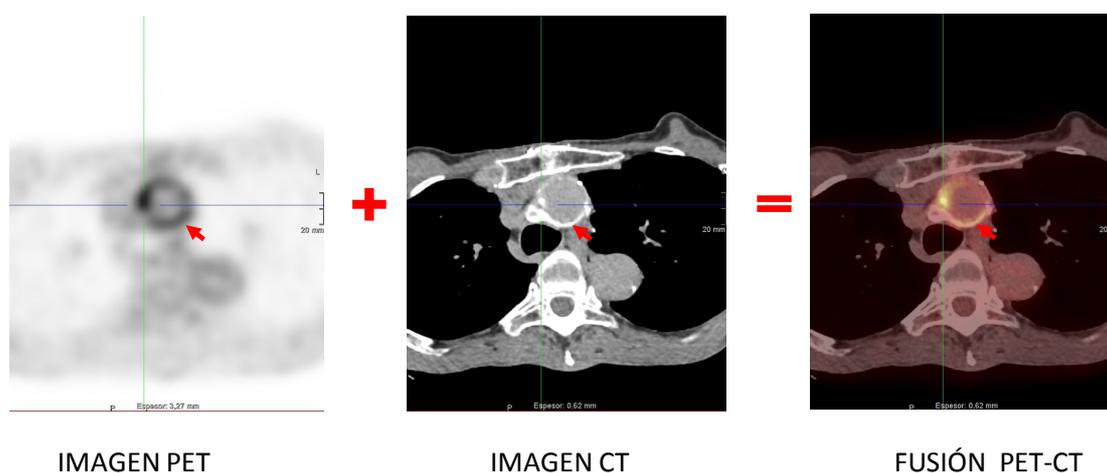
Las calcificaciones vasculares en la ERC resultan de la suma de calcificaciones de placas de ateroma y calcificaciones de la media, pudiendo coexistir ambos tipos de calcificación en el mismo vaso. Como resultado, se ven afectadas las dos funciones arteriales: conducción y amortiguación. Esto implica un mayor número de alteraciones que conllevan alto riesgo de mortalidad, lo que está en consonancia con los estudios que proclaman a las calcificaciones vasculares como factor pronóstico en la población con ERC, relacionando el grado de calcificación con mortalidad cardiovascular.<sup>25-27</sup>

## **1.2. Pruebas diagnósticas para la detección de calcificaciones vasculares**

En la actualidad, las guías KDIGO recomiendan realizar un estudio para la determinación de calcificaciones vasculares en aquellos pacientes con ERC en los que la detección pueda suponer una modificación en la actitud terapéutica que se les presta, en los pacientes que están esperando un trasplante renal o en pacientes con hiperfosfatemia significativa que requieran diferentes captadores de fósforo, dada la gran prevalencia y relación de las calcificaciones vasculares con el pronóstico cardiovascular.

El patrón-oro actual para la detección de calcificación vascular es el índice o *score* de calcificación de arterias coronarias (CAC) mediante tomografía computarizada (CT) cuantificándolas con la escala de Agatston.<sup>28</sup> Además, también es el método de referencia para calcificación aórtica y valvular. Existen dos modalidades: CT helicoidal multidetector y tomografía de haz de electrones (EBT por *electron beam tomography*). Esta última genera imágenes con mayor rapidez evitando artefactos por movimientos cardiacos y respiratorios de forma que es muy útil para obtener imágenes a nivel torácico. Ambas técnicas son caras y no están disponibles en todos los centros sanitarios.

Otra técnica muy sensible y quizás menos conocida es la tomografía por emisión de positrones (PET) donde es necesaria la administración de un radiofármaco para la obtención de imágenes. En combinación con CT (PET-CT) permite estudiar las placas ateromatosas y el grado de calcificación que presentan. Para ello se administra al paciente 18-fluordesoxiglucosa (18FDG), un radiofármaco análogo de la glucosa que será captado por las placas de ateroma en las que existe inflamación. Los leucocitos y macrófagos activados necesitan metabolizar gran cantidad de glucosa como fuente de energía para la quimiotaxis y fagocitosis, por lo que mostrarán gran avidez por la 18FDG. La calcificación se localiza mediante el estudio CT. Luego se pueden fusionar las dos imágenes gracias a los equipos híbridos que actualmente existen, combinando así la información metabólica que proporciona la imagen del PET con la información anatómica del CT (Figura 2).



**Figura 2. Imágenes tomadas mediante PET, CT y fusión de las mismas donde se aprecia la calcificación en la pared de la aorta (flecha). Imágenes cedidas por el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Central de Asturias.**

Estas dos últimas técnicas (CT y PET) son caras y no están disponibles en todos los centros sanitarios. Por ello se recurre a otras técnicas diagnósticas alternativas más sencillas y con mayor disponibilidad. Dentro de estas técnicas destacan las técnicas radiológicas convencionales y las técnicas ecográficas.

### **1.2.1. Radiología convencional**

Dentro de esta técnica se puede utilizar la radiografía lateral de abdomen para la determinación de calcificaciones en la aorta abdominal pues se ha demostrado una buena correlación con los hallazgos mediante CT.<sup>29</sup> Además, las guías KDIGO sugieren el uso de una radiografía lateral de abdomen para la detección de calcificación aórtica abdominal.<sup>30</sup> Por otro lado, la determinación de calcificaciones aórticas mediante esta técnica puede ser utilizada clínicamente para predecir morbilidad y mortalidad cardiovascular.<sup>14, 21</sup>

La radiografía no es un método cuantitativo para determinar los niveles de calcio, pero se han propuesto algunos índices semicuantitativos, como el propuesto por Kauppila, que detecta la presencia y estima la gravedad de la calcificación en la aorta abdominal mediante una radiografía lateral de abdomen.<sup>31</sup> Para la determinación de calcificaciones a nivel del arco aórtico se puede utilizar la radiografía de tórax postero-anterior.<sup>32</sup>

La angiografía es la técnica por imagen patrón-oro cuando se trata de diagnosticar una disminución del flujo vascular; sin embargo, sólo muestra información sobre la luz del vaso y no de la pared. Si la calcificación no está condicionando estenosis, como es el caso de la mayoría de las calcificaciones de la media, puede no ser útil. En ERC, no se encontró correlación entre la angiografía y el CT para el estudio de la enfermedad coronaria, donde se encontraron grados elevados de calcificación sin estenosis significativa.<sup>33</sup>

### **1.2.2. Técnicas ecográficas**

Estas técnicas, permiten calcular el grosor íntima-media (GIM) como marcador de ateromatosis. Además, se puede observar si existe calcificación y si hay o no estenosis. Son utilizadas para el estudio del territorio carotídeo y de otros vasos como las arterias femorales.<sup>34</sup> Presentan la ventaja de no irradiar al paciente a diferencia de todas las técnicas de imagen descritas anteriormente, incluida la PET. Como inconvenientes destacan que es una técnica explorador-dependiente y la dificultad de algunos territorios vasculares de difícil acceso. Mediante Eco Doppler (ecografía bidimensional a la que se suma el efecto del Doppler) se logra la visualización del vaso explorado aportando detalles acerca de la morfología del mismo, así como de la situación hemodinámica en su interior. La presencia de calcio genera una imagen hiperecogénica con una sombra posterior. En el caso de la detección de calcificación valvular, las guías KDIGO recomiendan la ecocardiografía.

El índice tobillo brazo (ITB) es una prueba que ha demostrado ser de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad arterial periférica y para la detección de sujetos con alto riesgo cardiovascular. El ITB se calcula tras dividir la presión arterial sistólica (PAS) de cada tobillo entre el valor de la PAS de una arteria braquial. Para ello, sólo es necesario un esfigmomanómetro y un Doppler portátil. Valores menores de 0,9 presentan una especificidad y sensibilidad muy altas para identificar obstrucción superior al 50% en el territorio vascular de los miembros inferiores y valores de ITB superiores a 1,4 sugieren rigidez arterial y/o calcificación del vaso.

### **1.3. Fisiopatología de la calcificación vascular**

Durante años se consideró que las calcificaciones vasculares eran un proceso pasivo consecuencia de la cristalización de sales de calcio debido al aumento en plasma del calcio y el fósforo en los enfermos renales. Pero actualmente existen suficientes evidencias de que la calcificación se debe, además, a un proceso activo, organizado y altamente regulado, similar a la formación de hueso.<sup>35</sup> En este proceso activo participa la apoptosis de las células de músculo liso vascular (VSMC) formando núcleos apoptóticos donde se inicia la formación de cristales cálcicos, la diferenciación osteocondrogénica de las VSMC capaces de producir vesículas de matriz que actúan como núcleos para la calcificación<sup>6, 36</sup> y la degradación de la elastina, inducida por la elastasa y otras proteasas. La elastina degradada tiene mucha afinidad por el calcio, lo que conlleva el crecimiento de la hidroxapatita. Los péptidos derivados de la elastina acaban provocando diferenciación osteocondrogénica.<sup>37</sup>

La calcificación vascular es un proceso en el que la hipercalcemia induce la expresión del ARN mensajero de Pit-1, un subtipo de cotransportador de fosfato localizado en las VSMC. La hiperfosfatemia activa el Pit-1 permitiendo así la acumulación de fósforo dentro de la célula, lo que sirve de señal para la expresión de genes osteogénicos.<sup>10</sup>

En los pacientes con ERC, el número de calcificaciones vasculares es mayor que en la población general debido a que, además de los factores de riesgo clásicos, estos pacientes pueden verse afectados por factores patogénicos, consecuencia de las alteraciones del metabolismo óseo que sufren y las terapias usadas para controlarlas. Entre estos factores destacan la hiperfosfatemia, las toxinas urémicas, el exceso de vitamina D, los niveles bajos de fetuina y la inflamación crónica.<sup>10, 38</sup>

### **1.4. Proteínas de la matriz extracelular**

Estudios en proteínas de la matriz extracelular han sugerido que la calcificación extraósea se produce acompañada de un aumento de la expresión de proteínas típicamente óseas, como proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), osteocalcina (BGP), fosfatasa alcalina y una disminución de las proteínas que antagonizan la mineralización, como osteopontina y proteína GLA de matriz (MGP), entre otras.<sup>36, 39, 40</sup>

### 1.4.1. Proteína Gla de la matriz

La proteína Gla de la matriz (MGP) es una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 10 kDa) que contiene cinco residuos del aminoácido dependiente de vitamina K ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) y tres residuos de serina susceptibles de ser fosforilados.<sup>41, 42</sup> Se encuentra en gran variedad de tejidos como huesos, válvulas cardiacas, riñón, cartílago, arterias (predominantemente a nivel de la adventicia aunque también en la media) y vesículas de matriz donde actúa limitando la nucleación mineral.<sup>43, 44</sup>

La MGP fue la primera proteína estudiada *in vivo* implicada en la inhibición de la calcificación vascular. Los ratones con delección del gen de la MGP (MGP<sup>-/-</sup>) muestran calcificaciones en todo el árbol arterial y mueren pocas semanas después de haber nacido como consecuencia de la rotura espontánea de la aorta calcificada.<sup>45</sup> Además, estos roedores sufren osteopenia, fracturas y presentan pequeño tamaño. Estos acontecimientos sugieren que la MGP regula indirectamente la mineralización ya que tiene la capacidad de inhibir la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales mediante la formación de un complejo con la BMP-2 que evita la unión de la BMP-2 con sus receptores y por lo tanto inhibe su actividad promotora.<sup>46</sup> Además, la pérdida de MGP permite que BMP-2 incremente su actividad, lo que podría inducir una conversión condrocítica de las VSMC.<sup>36, 44</sup> La  $\gamma$ -carboxilación es un proceso necesario para formar el complejo BMP-2/MGP. Una  $\gamma$ -carboxilación incompleta, más que una reducción de MGP en sí, incrementa el riesgo de calcificación.<sup>46</sup>

La MGP es uno de los inhibidores fisiológicos más importantes de la calcificación que protege frente a factores promotores de la misma. Se ha explicado esta capacidad de inhibición de la calcificación a través de la afinidad de los residuos Gla por los fosfatos cálcicos, uniéndose a ellos e impidiendo que cristalicen en forma de hidroxiapatita.<sup>47</sup> Por otra parte, se ha descrito que la capacidad de unión de la MGP a BMP-4 la convierte en un regulador de la formación del árbol vascular.<sup>48</sup>

### 1.4.2. Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína fosforilada con un peso molecular que puede variar entre 45 y 70 kDa en función de modificaciones postraduccionales. Está presente en varios tejidos mineralizados como huesos y dientes. También se encuentra como citocina en sangre, orina y líquido seminal.<sup>49</sup> En riñón, la OPN se expresa, en condiciones fisiológicas, en nefronas y epitelio tubulointerstitial y ha sido asociada a diferentes patologías como glomerulonefritis, formación de cálculos, etc. Además, tiene un papel regenerador en la recuperación de tejido renal, por ejemplo tras la isquemia.<sup>50</sup>

La OPN actúa como inhibidor del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita. Además promueve la función osteoclástica mediante la integrina  $\alpha v \beta 3$ .<sup>51</sup> La OPN se une

estrechamente al calcio de la hidroxiapatita y a continuación los osteoclastos lo identifican mediante la integrina específica, permitiendo así que estas células puedan ejercer su función de resorción ósea durante el proceso de calcificación.<sup>52</sup>

Se ha encontrado OPN en sitios de calcificación de placas ateroscleróticas y en válvulas aórticas calcificadas. Sin embargo no se ha encontrado en aortas normales.<sup>51</sup> Los niveles de OPN también están elevados en las arterias calcificadas de los roedores MGP<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que la OPN puede ser un regulador de la mineralización en VSMC.<sup>51</sup>

En un estudio realizado *in vitro* se demostró la capacidad de las VSMC para producir OPN y factores de transcripción implicados en la diferenciación de células a tipo osteoblasto, como RUNX2 y MSX2, cuando se exponen a altas concentraciones de fósforo, suero urémico, lípidos oxidados y algunos factores que se encuentran alterados en los pacientes renales.<sup>53</sup>

### 1.4.3. Proteínas morfogenéticas óseas

Las BMP son un grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular involucradas en el crecimiento y desarrollo de varios tejidos y órganos como el hueso, corazón, riñones, ojos, piel y dientes. Se sintetizan en las células mesenquimales, osteoprogenitoras, condrocitos, osteoblastos y plaquetas dentro de la matriz extracelular y son secretadas durante la reparación y remodelación ósea.<sup>54</sup>

Dentro de la familia de las BMP, la BMP-2 es una de las proteínas que presenta mayor capacidad de inducir la regeneración ósea y de formar hueso ectópico. Además, a nivel fisiológico regula el crecimiento, la diferenciación, la quimiotaxis y la apoptosis celular.<sup>55, 56</sup> Está implicada en la reparación ósea y es una de las proteínas que se expresan en los primeros días tras una fractura.

En las lesiones ateroscleróticas acompañadas de calcificación se ha encontrado una sobreexpresión de BMP-2, -4 y -6.<sup>57</sup> En concreto, BMP-2 estimula la expresión de genes osteogénicos en VSMC en cultivo.<sup>58</sup> Las señales en cascada iniciadas por un aumento en la expresión de BMP-2 pueden ser activadas por estrés oxidativo y citoquinas inflamatorias, lo que sugiere que estas señales participan en la calcificación arterial que se observa en pacientes diabéticos sin ERC y en modelos animales de síndrome metabólico.<sup>59</sup>

Por otra parte, la ruta de señalización básica para la formación y función de las células óseas está constituida por el sistema receptor activador del factor nuclear kB (RANK)-ligando de RANK-osteoprotegerina (RANK-RANKL-OPG) y se ha demostrado que este sistema también participa en el proceso de calcificación de VSMC *in vitro* y además lo hace a través de un aumento de la expresión de BMP-4.<sup>60</sup> Esta proteína, al igual que BMP-2, es capaz de inducir diferenciación osteogénica de las VSMC a través de la

inducción de factores de transcripción como RUNX2 y MSX2.<sup>61</sup> RUNX2 se sintetiza en regiones donde no está presente la MGP, que actúa como protectora frente a la calcificación.<sup>62</sup> Además, regula la expresión de los componentes principales de la matriz ósea, incluyendo colágeno tipo I, osteocalcina y osteopontina.<sup>63</sup>

#### **1.4.4. Metaloproteasas de matriz extracelular**

El remodelado vascular, tanto fisiológico como patológico, implica la degradación y reorganización de la matriz extracelular, procesos en los que intervienen las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP). Participan a través de la degradación de diferentes componentes de la matriz incluyendo colágeno, caseína y proteínas de adhesión como laminina, además de modular muchas moléculas bioactivas en la superficie celular.<sup>64</sup> Intervienen en la proliferación celular, la adhesión, la diferenciación y la apoptosis así como en la función inmune, la cicatrización de tejido y la angiogénesis.<sup>65</sup>

La actividad de las MMP en diversos tejidos está estrechamente regulada por inhibidores tisulares endógenos de MMP (TIMP).<sup>66</sup> La alteración del equilibrio fisiológico entre MMP y TIMP puede contribuir a la fisiopatología de las enfermedades vasculares tales como la aterosclerosis, aneurismas y venas varicosas.<sup>67</sup>

Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de las metzincinas que se caracterizan por tener un motivo altamente conservado, con tres histidinas que coordinan un átomo de zinc dentro del dominio catalítico y una metionina conservada cercana al sitio activo. Se sintetizan como zimógenos inactivos que requieren ser activados por proteólisis.<sup>68</sup>

La MMP-1 es una colagenasa que juega un papel importante en la escisión de colágeno fibrilar tipo I, II y III. MMP-1 es sintetizada por las células de músculo liso y los macrófagos de la pared arterial y tiene una mayor expresión en lesiones ateroscleróticas.<sup>69</sup>

La gelatinasa MMP-2 es de particular importancia en la biología vascular porque se expresa abundantemente en las arterias y su actividad se modifica durante la progresión de la enfermedad vascular. En arterias de pacientes trasplantados renales se encontró una relación entre la activación de MMP-2 y la degeneración de las fibras elásticas, rigidez, calcificación de la media y disfunción vasomotora en las arterias.<sup>70</sup> Los autores proponen que la manipulación de la actividad de la MMP-2 podría ser una estrategia terapéutica potencial para controlar estas situaciones en pacientes renales.

Por otra parte, los niveles plasmáticos de MMP-1, -2, -3 y -7 aparecen más elevados en un grupo de pacientes jóvenes (45–65 años) ateroscleróticos, con GIM más elevado, que en los pacientes con menores grosos.<sup>69</sup> Además, el índice normalizado de GIM se asoció de forma independiente con los niveles de MMP-3, -7 y del inhibidor de

MMP TIMP-1, y los niveles de MMP-7 se asociaron positivamente con calcificación de la carótida.<sup>71</sup> También en otro trabajo se encontró una mayor expresión de MMP-1, -2 y -3 en válvulas aórticas calcificadas en comparación con válvulas aórticas normales.<sup>72</sup>

#### 1.4.5. Estudios genéticos relacionados con la calcificación vascular

El estudio de las variantes génicas, bien sean mutaciones o polimorfismos presentes en los genes de las diferentes proteínas implicadas en los trastornos del metabolismo óseo y mineral, podría colaborar a mejorar su entendimiento. Los polimorfismos son variaciones en la secuencia del genoma que existen con relativa frecuencia en la población y diferencian a unos individuos de otros. Polimorfismos en algunos genes se han asociado a la susceptibilidad a padecer enfermedades, a tener manifestaciones clínicas específicas y/o a diferencias en la respuesta a tratamientos. Se han descrito variantes genéticas asociadas con alteraciones del metabolismo óseo y mineral en genes de proteínas relacionadas con la matriz extracelular, como BMP,<sup>73-75</sup> vía de Wnt,<sup>76-78</sup> MMP<sup>79, 80</sup> y MGP.<sup>81-84</sup>

A raíz del Proyecto Genoma Humano, que permitió determinar la secuencia del genoma humano, aumentó el interés por la búsqueda de genes o loci que puedan predecir y prevenir el desarrollo de enfermedades, permitiendo clasificar a los individuos en función de su riesgo a desarrollarlas.<sup>85-87</sup> Para la búsqueda de estos loci se han empleado varios tipos de estudios entre los que destacan los estudios de ligamiento y los estudios de asociación, y dentro de estos últimos podemos diferenciar entre estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y los que están basados en genes candidatos.

Los estudios de ligamiento se caracterizan por estudiar a personas pertenecientes a una misma familia donde se manifiesta una determinada enfermedad. Para ello se identifica el genotipo, mayoritariamente para microsatélites aunque también para polimorfismos distribuidos por todo el genoma de dichos individuos. Es un método indirecto que permite establecer la relación de una enfermedad entre miembros de una misma familia.<sup>88</sup>

Los estudios de asociación pueden partir de una hipótesis inicial en la que se estudian genes candidatos con alta probabilidad de estar implicados en la enfermedad (estudios de asociación basados en genes candidatos) o por el contrario no partir de ninguna hipótesis e identificar el genotipo para miles de polimorfismos repartidos por todo el genoma (GWAS) mediante microchips de ADN. En ambos casos se trata de estudios caso-control.<sup>89</sup> Los estudios de asociación basados en genes candidatos pueden presentar varias limitaciones entre las que destacan la falta de reproducibilidad en otras poblaciones y el bajo poder estadístico debido a que el tamaño muestral suele ser pequeño.<sup>90</sup> Sin embargo, permiten una aproximación menos costosa al problema aunque los procedimientos de genotipado masivo cada vez son más accesibles.

Actualmente ya existen numerosos estudios de variantes genéticas en algunas proteínas de la matriz extracelular que sugieren relación con el proceso de calcificación vascular. Así, estudios genéticos de determinados polimorfismos en MGP sugieren asociación con pérdida de masa ósea y progresión de calcificación vascular en hombres.<sup>91, 92</sup> En otro trabajo se asociaron variantes genéticas de MGP con calcificación en la pared vascular de la aorta y de las arterias coronarias.<sup>93</sup> Por otro lado, el análisis de 296 individuos de la población general pertenecientes a la cohorte de Oviedo del estudio EVOS-EPOS<sup>94</sup> encontró asociación de dos polimorfismos de MGP simultáneamente con pérdida de masa ósea y con progresión de calcificación aórtica.<sup>95</sup>

Por otra parte, numerosos estudios de variantes genéticas en promotores de diversas MMP han revelado asociaciones con progresión y estabilidad de la placa aterosclerótica.<sup>96</sup> Un estudio caso-control en población española mostró que determinados polimorfismos del promotor de MMP-1 estaban asociados con el riesgo de infarto de miocardio prematuro en hombres fumadores.<sup>97</sup> En otro estudio se encontró asociación entre contenido de calcio en la válvula aórtica y el polimorfismo 1G>2G de este mismo gen en pacientes sometidos a reemplazo valvular.<sup>98</sup>

Diversos investigadores han intentado modificar los modelos matemáticos tradicionales de predicción basados en factores de riesgo clásicos, como el descrito por Framingham, introduciendo polimorfismos que aumenten el poder de predicción de padecer una enfermedad. En este sentido, McGeachie y col. confeccionaron un modelo de predicción de calcificación coronaria en el que combinaron 13 polimorfismos con las variables sexo, edad, peso, tabaquismo y diabetes mellitus, además de un marcador informativo de ancestralidad, que aumentó aproximadamente un 12% el área bajo la curva ROC frente al modelo en el que se incluyeron solamente las variables clínicas o los polimorfismos.<sup>99</sup>

Todos estos hallazgos hacen atractivo que se siga investigando posibles variantes genéticas en proteínas implicadas en el proceso de calcificación vascular que ayuden a entenderlo. Con los conocimientos de los que disponemos podemos afirmar que algunas variantes genéticas que influyen en la expresión de algunos genes de proteínas de la matriz extracelular pueden ser en parte responsables de un mayor riesgo de presencia y/o progresión de calcificación vascular. Estos análisis genéticos conducirían a la identificación de los marcadores más precoces posibles de las alteraciones descritas antes puesto que vendrían determinados en el nacimiento del individuo.

## **2. Hipótesis**



La calcificación vascular, un proceso que puede ocurrir en población sana, es especialmente frecuente en los pacientes urémicos. Sin embargo, no todos los pacientes tienen el mismo riesgo de presentar calcificaciones, lo que sugiere que podría existir un cierto componente genético que predisponga a este proceso. Unos de los genes potencialmente candidatos son los que codifican proteínas presentes en la matriz extracelular, que es el espacio donde ocurre la calcificación y serán, por tanto, el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Las arterias humanas sanas expresan cierto número de proteínas asociadas a hueso, aunque generalmente a niveles bajos.<sup>100</sup> Estudios en arterias humanas calcificadas han mostrado un aumento de expresión de estas proteínas típicamente óseas, como fosfatasa alcalina, osteocalcina y BMP y una disminución de las proteínas que antagonizan la mineralización: osteopontina, MGP y osteonectina, entre otras,<sup>38</sup> todas ellas presentes en la matriz extracelular. Por tanto, parece que en la pared vascular calcificada se rompe el equilibrio a favor de las proteínas que promueven la mineralización, que prevalecen sobre las que protegen la pared vascular de calcificaciones.

Estos aumentos y/o disminuciones de los niveles de proteínas pueden ser debidos a distintas causas. En concreto, variantes alélicas presentes en los genes codificantes de proteínas de matriz extracelular, especialmente en sus regiones promotoras, podrían alterar los niveles de las proteínas y, por tanto, alterar el proceso acelerándolo o inhibiéndolo. A partir de estos antecedentes, construimos nuestra hipótesis principal: el hallazgo de una asociación entre determinados alelos o genotipos en estos genes candidatos, los niveles de proteínas circulantes y la calcificación vascular permitirá establecer un nivel de riesgo para un individuo dependiendo del genotipo que presente que podría, además, modular el efecto de los factores ambientales.

Se trata de responder dos cuestiones fundamentales:

1. ¿Hay polimorfismos en estos genes relacionados con la presencia de calcificación vascular?
2. ¿Podrían ayudar a predecir la calcificación vascular en los enfermos renales antes de que llegue a establecerse?

Así, una vez determinada esa asociación, estas variantes podrían pasar a considerarse como factores de riesgo para la aparición de calcificaciones vasculares.



### **3. Objetivos**



El objetivo de este trabajo de tesis doctoral es identificar un marcador precoz del riesgo de desarrollar calcificaciones vasculares que permita clasificar a los pacientes renales de alto riesgo, para diseñar acciones preventivas que evitarían los costosos tratamientos paliativos posteriores. Para tratar de responder a este objetivo fundamental se proponen los siguientes objetivos concretos:

1º. Caracterizar la variación genómica de polimorfismos seleccionados en genes candidatos de proteínas de la matriz extracelular, así como genes reguladores de dichas proteínas, en la población del Proyecto NEFRONA.

2º. Estudiar la asociación entre las variantes encontradas y la presencia de calcificaciones vasculares o de otra característica clínica relevante.

3º. Determinar en plasma los niveles de las proteínas implicadas en la calcificación vascular cuyos genes salgan asociados en los estudios genéticos y correlacionarlos con las características clínicas de los individuos.

4º. Determinar la correlación entre las variantes genéticas de los genes codificantes de proteínas de matriz extracelular y los niveles de las correspondientes proteínas en el plasma de los participantes.



## **4. Pacientes y métodos**



#### 4.1. Diseño del estudio: selección de la población NEFRONA

Para el estudio se seleccionó una muestra a partir de la población recogida por el Proyecto NEFRONA, diseñado para evaluar la carga aterosclerótica subclínica de pacientes con ERC en España utilizando técnicas de imagen y biomarcadores en la predicción de la enfermedad cardiovascular en la ERC.<sup>101</sup> El proyecto NEFRONA es un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico que reclutó, desde octubre de 2010 a junio de 2012, un total de 2445 pacientes con ERC en distintos estadios procedentes de diferentes centros del país y 559 controles asintomáticos y sin enfermedad renal. El proyecto recogió una serie de datos que incluyen variables antropométricas, variables bioquímicas, datos específicos de la enfermedad renal (en el caso de que el sujeto perteneciera al grupo de ERC), datos de comorbilidad, de tratamientos médicos en el momento de la entrevista, así como hábito tabáquico e ingesta de alcohol.

A todos los participantes se les había realizado una ecografía femoral, una ecografía carotídea y se había calculado el índice tobillo-brazo (ITB). Estas exploraciones vasculares, se realizaron al inicio del estudio a todos los participantes y a los enfermos renales se les repitieron a los 24 meses para poder valorar la evolución.

Por otra parte, a todos los participantes se les extrajo una muestra de sangre que se envió al Biobanco de la Red Renal REDINREN donde se almacenaron convenientemente para la determinación de biomarcadores que se especificarán más adelante y para la obtención de células y DNA.

Todos los datos clínicos y bioquímicos estaban recogidos en una base de datos del Proyecto NEFRONA de utilización pública.

#### 4.2. Variables consideradas

Se consideraron todas las variables incluidas en la base de datos con algunas excepciones en las que había varias posibilidades. En concreto, se consideró la variable “Tabaquismo” definida mediante 3 categorías: no fumador (para el que nunca había adquirido el hábito tabáquico), exfumador (que lo había sido, pero lo había abandonado) y fumador (fumador activo). Como valor de filtrado glomerular se utilizó el calculado con la fórmula MDRD4 (*Modification of Diet in Renal Disease*). En cuanto a las variables cuantitativas se utilizaron siempre los valores continuos excepto en la proteinuria a 24 h, que también se utilizó en su forma categórica, y en las distintas medidas de grosor íntima-media (GIM), que se sustituyeron por la variable transformada “Tipo de placa” (que se comentará más adelante) que presentaba los siguientes valores: Tipo 1 (uniformemente hipoecoica homogénea), Tipo 2 (predominantemente hipoecoica, >50% del GIM, heterogénea), Tipo 3 (predominantemente hiperecoica, >50% del GIM, heterogénea), Tipo 4 (uniformemente hiperecoica homogénea), Tipo 5 (calcificada; sombra acústica impide evaluar).

#### 4.3. Medidas utilizadas para determinar calcificación vascular

Se tuvieron en cuenta las variables “Tipo de placa” de los 10 territorios analizados para el proyecto NEFRONA, 6 en la arteria carótida y 4 en la femoral, basadas en las medidas ecográficas obtenidas con un ecógrafo Vivid i modelo BT09 (General Electric) con un transductor lineal tipo 8L-RS/13-6MHz, por dos observadores independientes ciegos para las características de los pacientes.<sup>102</sup> La calcificación vascular (presencia de placa calcificada) estaba definida como aquella placa hiperecogénica que producía sombra en la imagen obtenida por ecografía (Tipo 5).

#### 4.4. Aspectos éticos

El proyecto NEFRONA fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Arnau de Vilanova y todos los sujetos incluidos en el estudio aportaron un consentimiento informado para la utilización de sus muestras biológicas y datos clínicos.

El uso de la base de datos del NEFRONA para realizar estos análisis fue autorizado previa solicitud al Comité Científico del NEFRONA (acta del 23 de febrero de 2011).

El proyecto concreto abordado por esta tesis doctoral fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias.

#### 4.5. Selección de polimorfismos candidatos

Una vez definida la lista de proteínas a estudiar, se hicieron búsquedas en bases de datos públicas para identificar polimorfismos que hubieran sido descritos asociados a alguna patología relacionada con este estudio (vascular u ósea) y/o que tuvieran un efecto funcional demostrado en la proteína, bien por afectar a la secuencia de aminoácidos bien por afectar a regiones reguladoras y por tanto a su expresión. En concreto los polimorfismos se seleccionaron mediante una búsqueda exhaustiva en las bases de datos del *Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) PubMed* (bibliográfica), *Nucleotide* (de secuencias de nucleótidos) y *dbSNP* (de polimorfismos).

#### 4.6. Genotipado

Las muestras de DNA se enviaron desde el Biobanco de REDINREN 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). Se utilizó la técnica iPLEX GOLD MassARRAY<sup>103</sup> (Agena Bioscience, antes Sequenom MassARRAY) y el software Assay Design v4.

Como control de calidad se revisan los datos para cada polimorfismo y se eliminan los polimorfismos con bajo porcentaje de genotipado o que no están en equilibrio de Hardy-Weinberg y se descartan las muestras que tienen un porcentaje de

genotipado bajo o que muestran peor calidad. También se comprueba la consistencia en los resultados para muestras repetidas, dentro de la misma placa y entre placas. Además, en cada chip se incluye un trío de muestras de ADN de Coriell, para las que existen datos publicados y con las que se pueden comparar los resultados obtenidos y comprobar la eficacia del genotipado.

#### **4.7. Determinación de niveles de proteínas de la matriz extracelular en plasma mediante ELISA**

Se determinaron los niveles de las proteínas de matriz extracelular circulantes en plasma MGP y MMP-1 mediante enzimo-inmunoensayos no competitivos (ELISA tipo sandwich) específicos para la proteína humana en plasma. Estos ensayos están basados en la inmovilización de la proteína que se quiere determinar y su posterior detección gracias a un anticuerpo primario que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazada una enzima capaz de generar un producto detectable por espectrofotometría. Para ello se utilizaron los siguientes ensayos comerciales siguiendo las recomendaciones específicas de los respectivos fabricantes:

- SEB477Hu de USCN, para detectar MGP.
- Ab100603 de Abcam, para detectar MMP-1.

Los diferentes pasos de lavado se hicieron con un lavador de microplacas automático Optic Ivymen System y las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific).

#### **4.8. Análisis estadístico**

Para llevar a cabo el análisis estadístico se contó con el apoyo de la Unidad de Consultoría Estadística de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Todos los análisis se realizaron mediante el software SPSS versión 22.0 (SPSS *Inc*) y el programa de uso libre R, versión 3.3.1.<sup>104</sup> El nivel de significación utilizado en todo el estudio fue 0,05.

Se realizó un análisis descriptivo, proporcionando para variables cuantitativas medidas de posición como la media o la mediana y medidas de dispersión como la desviación típica o el rango intercuartílico. En el caso de variables cualitativas se calcularon las distribuciones de frecuencias.

Para el análisis de la relación de variables cuantitativas con variables cualitativas con dos niveles se empleó el test t de Student o el test de Wilcoxon para muestras independientes, según se verificara o no la hipótesis de normalidad. Si la variable cualitativa tenía 3 o más niveles se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis ante el incumplimiento de la hipótesis de normalidad y/o homocedasticidad. En

el caso de detectarse diferencias estadísticamente significativas se llevó a cabo el test de comparaciones múltiples de Dunn.<sup>105</sup>

La asociación entre variables cualitativas y el cumplimiento del equilibrio de Hardy Weinberg para los polimorfismos se evaluaron mediante el test  $\chi^2$  de Pearson o el test de Fisher, según se cumpliera o no la hipótesis sobre las frecuencias esperadas.

Para el estudio de la relación lineal entre variables continuas se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y la significación del contraste de hipótesis asociado.

A continuación, se llevaron a cabo distintos análisis multivariantes dependiendo de la naturaleza de la variable dependiente. Si dicha variable era cuantitativa se construyó un modelo lineal, en particular un modelo ANOVA si todas las variables independientes eran cualitativas, o un modelo ANCOVA si además de variables cualitativas se disponía de variables cuantitativas como predictoras. Después se simplificó el modelo utilizando un método de selección paso a paso.

Si la variable dependiente era cualitativa con dos niveles se construyó un modelo de regresión logística binaria proporcionando las odds ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95%, simplificándolo posteriormente también empleando un método de selección paso a paso.

## **5. Resultados**



### 5.1. Características de la población

Para los estudios de asociación genética se hizo una selección de pacientes según la etiología de su enfermedad renal. Así, se incluyeron solo pacientes cuya enfermedad renal estaba causada por nefropatía glomerular, enfermedad vascular, nefropatía diabética, enfermedades metabólicas y nefropatía tubulointersticial, descartando las debidas a fármacos o tóxicos, las enfermedades quísticas, las displasias o hipodisplasias renales, nefropatías hereditarias, mieloma múltiple, amiloidosis y cualquier tipo de tumor o enfermedad sistémica así como otras no filiadas. Además, se incluyeron solo individuos que tenían muestras biológicas recogidas en el Biobanco puesto que en otro caso no podrían ser analizados genéticamente. De esta forma la población incluida en los análisis de asociación incluyó el 68% de la población NEFRONA (2053 individuos). Debido a que algunos individuos tienen valores perdidos para alguna de las variables, los tamaños de los grupos pueden no ser los mismos en todos los análisis efectuados. Por ello, se añadirá el tamaño muestral (N) en cada caso.

Los individuos de la muestra se estudiaron agrupados por estadio de enfermedad renal, obteniéndose 4 grupos: individuos control sin enfermedad renal (Control), individuos con estadios 2 y 3 de enfermedad renal (ERC2-3), individuos con estadios 4 y 5 de enfermedad renal (ERC4-5) e individuos en estadio 5 pero sometidos a diálisis (Diálisis). Los parámetros renales muestran las diferencias claras entre los 4 grupos (Tabla 3).

**Tabla 3. Parámetros de función renal de los individuos incluidos en el estudio.**

Variable	Control N=553	ERC2-3 N=616	ERC4-5 N=517	Diálisis N=367	P-valor
Filtrado glomerular	89,8 (79,5-101,5)	43,1 (36,6-49,8)	20,9 (16,2-24,8)	6,9 (5,4-9,2)	<0,001
Creatinina sérica, mg/dl	0,8 (0,7-0,9)	1,6 (1,4-1,8)	3,0 (2,5-3,8)	7,9 (6,2-9,7)	<0,001
Proteinuria 24h, g	0,0 (0,0-0,1)	0,2 (0,1-1,0)	1,1 (0,6-2,2)	1,1 (0,2-1,7)	<0,001
Proteinuria					<0,001
Normoalbuminuria	100 (61)	152 (35)	58 (18)	4 (7)	
Microalbuminuria	65 (39)	153 (35)	103 (31)	24 (44)	
Macroalbuminuria	0 (0)	126 (29)	167 (51)	27 (49)	
Urea, mg/dl	36 (31-43)	63 (51-78)	118 (96-146)	123 (100-150)	<0,001
Ácido úrico, mg/dl	5,1 (4,1-5,9)	6,8 (5,8-7,9)	6,9 (5,9-8,0)	5,8 (5,1-6,8)	<0,001

*Filtrado glomerular calculado como MDRD4. Las variables cualitativas se muestran como n (%). Las variables cuantitativas se muestran como mediana (percentil 25-percentil 75) al no verificarse las hipótesis de normalidad y homocedasticidad.*

Para estos 4 grupos se consideraron una serie de variables antropométricas y clínicas, observándose diferencias claras entre ellos, excepto en la variable tabaquismo (Tabla 4). En cuanto al sexo, nuestros grupos de enfermedad renal presentan menos

mujeres que el grupo control y en cuanto a la edad, son más jóvenes los controles y pacientes en diálisis.

**Tabla 4. Variables antropométricas y clínicas de los grupos estudiados.**

Variable	Control N=553	ERC2-3 N=616	ERC4-5 N=517	Diálisis N=367	P-valor
Sexo					<0,001
Hombre	295 (53,3)	419 (68,0)	306 (59,2)	229 (62,4)	
Mujer	258 (46,7)	197 (32,0)	211 (40,8)	138 (37,6)	
Edad	56 (47-63)	65 (56-70)	62 (52-69)	56 (43-65)	<0,001
IMC	27,7 (25,0-30,5)	28,9 (26,1-32,2)	28,63 (25,6-32,6)	26,1 (23,3-29,9)	<0,001
Tabaquismo					0,498
No fumador	219 (39,6)	244 (39,6)	225 (43,5)	157 (42,8)	
Ex fumador	226 (40,9)	245 (39,8)	190 (36,8)	128 (34,9)	
Fumador	108 (19,5)	127 (20,6)	102 (19,7)	82 (22,3)	
Diabetes					<0,001
No	494 (89,3)	414 (67,2)	320 (61,9)	263 (71,7)	
Sí	59 (10,7)	202 (32,8)	197 (38,1)	104 (28,3)	
Hipertensión					<0,001
No	360 (65,1)	37 (6,0)	11 (2,1)	43 (11,7)	
Sí	193 (34,9)	539 (94,0)	506 (97,9)	324 (88,3)	
Dislipemia					<0,001
No	360 (65,1)	162 (26,3)	123 (23,8)	160 (43,6)	
Sí	193 (34,9)	454 (73,7)	394 (76,2)	207 (56,4)	
TAS, mmHg	132 (120-144)	143 (130-158)	146 (131-162)	140 (124-155)	<0,001
TAD, mmHg	80 (73-87)	81 (75-89)	81 (74-89)	80 (70-90)	<0,001
ITB	1,04 (0,96-1,10)	1,00 (0,92-1,11)	1,04 (0,94-1,15)	1,07 (0,96-1,25)	<0,001

IMC: índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; ITB: índice tobillo-brazo. Las variables cualitativas se muestran como n (%). Las variables cuantitativas se muestran como mediana (percentil 25-percentil 75) al no verificarse las hipótesis de normalidad y homocedasticidad.

Además, se tuvieron en cuenta otras variables bioquímicas que fueron significativamente distintas entre los grupos, destacando los niveles de PTH que eran progresivamente mayores en los grupos a medida que aumenta el grado de enfermedad renal, y los de vitamina D que eran progresivamente menores, tanto en niveles de 25OH como de 1,25OH vitamina D (Tabla 5).

**Tabla 5. Variables bioquímicas séricas de los grupos de individuos estudiados.**

Variable	Control N=553	ERC2-3 N=616	ERC4-5 N=517	Diálisis N=367	P-valor
Colesterol total, mg/dl	200 (180-222)	185 (163-213)	173 (149-201)	158 (133-185)	<0,001
Colesterol HDL, mg/dl	54 (15)	50 (15)	49 (16)	48 (16)	<0,001
Colesterol LDL, mg/dl	127 (33)	111 (33)	101 (33)	89 (33)	<0,001
Triglicéridos, mg/dl	96 (71-140)	125 (95-175)	133 (94-175)	118 (85-170)	<0,001
Glucosa, mg/dl	97 (88-106)	102 (91-123)	99 (90-119)	93 (84-115)	<0,001
PCRus, mg/l	1,6 (0,8-3,1)	2,0 (1,0-4,2)	2,0 (0,9-4,2)	2,1 (1,1-5,1)	<0,001
Hemoglobina, g/dl	14,5 (13,5-15,6)	13,8 (12,7-15,0)	12,3 (11,4-13,3)	11,9 (11,1-12,7)	<0,001
Ferritina, ng/ml	84 (38-154)	113 (59-213)	147 (74-261)	291 (167-467)	<0,001
Calcio total, mg/dl	9,4 (9,1-9,7)	9,5 (9,1-9,8)	9,3 (8,9-9,7)	9,1 (8,7-9,5)	<0,001
Fósforo, mg/dl	3,5 (3,1-3,9)	3,4 (3,0-3,8)	3,9 (3,5-4,6)	4,8 (4,1-5,6)	<0,001
Albúmina, g/dl	4,4 (4,2-4,6)	4,3 (4,0-4,5)	4,1 (3,8-4,4)	3,9 (3,6-4,2)	<0,001
PTHi, pg/ml	51 (45-60)	68 (48-102)	142 (93-217)	244 (155-258)	<0,001
25OH vitamina D	18,8 (14,6-24,0)	15,4 (11,8-19,7)	14,7 (11,2-18,7)	13,3 (9,9-17,9)	<0,001
1,25OH vitamina D	31,8 (24,8-40,0)	18,8 (13,8-26,3)	15,4 (10,2-22,2)	6,9 (5,0-10,2)	<0,001

PCRus: proteína C reactiva ultrasensible; PTHi: hormona paratiroidea intacta. Las variables cuantitativas se muestran como media (desviación estándar) si se verifican las hipótesis de normalidad y homocedasticidad y en caso contrario mediana (percentil 25-percentil 75).

## 5.2 Cálculo de variables para estimar calcificación vascular.

Para asignar un valor de calcificación vascular a cada individuo se utilizaron las variables recogidas en la base de datos del NEFRONA obtenidas mediante análisis ecográfico de distintas regiones de las arterias femoral y carótida. En concreto se tuvieron en cuenta las mediciones en 10 territorios: carótida común derecha e izquierda, bulbo derecho e izquierdo, carótida interna derecha e izquierda, femoral común derecha e izquierda y femoral superior derecha e izquierda. En cada región o territorio estaba recogida de forma cualitativa la ecogenicidad obtenida, de forma que uno de los 5 valores de la variable indicaba presencia de calcificación en el territorio.

Se definieron las variables cuantitativas “Número de calcificaciones femoral”, “Número de calcificaciones carótida” y “Número de calcificaciones total” que valoran el número de territorios calcificados en cada arteria o en ambas, adquiriendo los valores 0 a 4 en el caso de la femoral, 0 a 6 en el caso de la carótida y de 0 a 10 en el caso de la total. Se determinó el número de individuos con calcificaciones en cada grupo de enfermedad renal (Tablas 6, 7 y 8) y se vio que la diferencia en cuanto a frecuencias era estadísticamente significativa en todos los casos.

**Tabla 6. Número de calcificaciones en la arteria femoral en los distintos grupos al principio del estudio.**

Nº calcificaciones	Control N=544	ERC2-3 N=593	ERC4-5 N=507	Diálisis N=347
0	516 (94,9)	473 (79,8)	412 (81,3)	263 (75,8)
1	22 (4,0)	64 (10,8)	55 (10,8)	53 (15,3)
2	5 (0,9)	35 (5,9)	29 (5,7)	14 (4,0)
3	1 (0,2)	13 (2,2)	7 (1,4)	11 (3,2)
4	0 (0,0)	8 (1,3)	4 (0,8)	6 (1,7)

N (% dentro del grupo).  $P < 0,001$

**Tabla 7. Número de calcificaciones en la arteria carótida en los distintos grupos al principio del estudio.**

Nº calcificaciones	Control N=497	ERC2-3 N=540	ERC4-5 N=466	Diálisis N=315
0	495 (99,6)	476 (88,1)	401 (86,1)	258 (81,9)
1	1 (0,2)	28 (5,2)	29 (6,2)	22 (7,0)
2	1 (0,2)	18 (3,3)	18 (3,9)	20 (6,3)
3	0 (0,0)	13 (2,4)	13 (2,8)	7 (2,2)
4	0 (0,0)	4 (0,7)	1 (0,2)	4 (1,3)
5	0 (0,0)	1 (0,2)	2 (0,4)	0 (0,0)
6	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (0,4)	4 (1,3)

N (% dentro del grupo).  $P < 0,001$

**Tabla 8. Número de calcificaciones en las arterias carótida y femoral en los distintos grupos al principio del estudio.**

Nº calcificaciones	Control N=490	ERC2-3 N=525	ERC4-5 N=457	Diálisis N=300
0	466 (95,1)	404 (77,0)	337 (73,7)	212 (70,7)
1	17 (3,5)	55 (10,5)	55 (12,0)	41 (13,7)
2	6 (1,2)	35 (6,7)	35 (7,7)	16 (5,3)
3	1 (0,2)	12 (2,3)	14 (3,1)	10 (3,3)
4	0 (0,0)	8 (1,5)	7 (1,5)	8 (2,7)
5	0 (0,0)	3 (0,6)	5 (1,1)	5 (1,7)
6	0 (0,0)	4 (0,8)	2 (0,4)	3 (1,0)
7	0 (0,0)	2 (0,4)	1 (0,2)	3 (1,0)
8	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
9	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,3)
10	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,2)	1 (0,3)

N (% dentro del grupo).  $P < 0,001$

A partir de estas variables cuantitativas se definieron las variables categóricas “Calcificación femoral”, “Calcificación carótida” y “Calcificación total” de forma que las variables eran “Sí” si aparecía algún territorio calcificado y “No” cuando no aparecía ninguno en las arterias correspondientes y en cualquiera de las dos en el caso de la tercera variable (Tablas 9, 10 y 11). En los tres casos, de nuevo, la diferencia de frecuencias era estadísticamente significativa.

**Tabla 9. Número de individuos con calcificación en algún territorio de la arteria femoral en los distintos grupos a estudio.**

Calcificación femoral	Control N=544	ERC2-3 N=593	ERC4-5 N=507	Diálisis N=347
No	516 (94,9)	473 (79,8)	412 (81,3)	263 (75,8)
Sí	28 (5,1)	120 (20,2)	95 (18,7)	84 (24,2)

*N (% dentro del grupo). P<0,001*

**Tabla 10. Número de individuos con calcificación en algún territorio de la arteria carótida en los distintos grupos a estudio.**

Calcificación carótida	Control N=497	ERC2-3 N=540	ERC4-5 N=466	Diálisis N=315
No	495 (99,6)	476 (88,1)	401 (86,1)	258 (81,9)
Sí	2 (0,4)	64 (11,9)	65 (13,9)	57 (18,1)

*N (% dentro del grupo). P<0,001*

**Tabla 11. Número de individuos con calcificación en algún territorio de las arterias femoral y carótida en los distintos grupos a estudio.**

Calcificación total	Control N=490	ERC2-3 N=525	ERC4-5 N=457	Diálisis N=300
No	466 (95,1)	404 (77,0)	337 (73,7)	212 (70,7)
Sí	24 (4,9)	121 (23,0)	120 (26,3)	88 (29,3)

*N (% dentro del grupo). P<0,001*

Se observa una mayor frecuencia de calcificaciones en la arteria femoral que en la carótida en todos los grupos de individuos, destacando un 5,1% de individuos sanos con calcificación en la femoral, y hasta un 24,2% en los pacientes en diálisis. En carótida, en cambio, la frecuencia va desde un 0,4% en individuos controles hasta un 18,1% en pacientes en diálisis.

Además, se determinó el número de calcificaciones en cada localización, pero con los datos obtenidos a los 24 meses, y en este caso solo teniendo en cuenta los

grupos de pacientes puesto que los controles no habían sido seleccionados para un seguimiento (Tablas 12, 13 y 14).

**Tabla 12. Número de calcificaciones en la arteria femoral en los distintos grupos a estudio, a 24 meses de seguimiento.**

Nº calcificaciones	ERC2-3 N=409	ERC4-5 N=353	Diálisis N=208
0	297 (72,6)	248 (70,3)	136 (65,4)
1	54 (13,2)	49 (13,9)	41 (19,7)
2	38 (9,3)	28 (7,9)	16 (7,7)
3	17 (4,2)	14 (4,0)	7 (3,4)
4	3 (0,7)	14 (4,0)	8 (3,8)

La variable se muestra como número de individuos N (% dentro del grupo). P=0,051

**Tabla 13. Número de calcificaciones en la arteria carótida en los distintos grupos a estudio, a 24 meses de seguimiento.**

Nº calcificaciones	ERC2-3 N=409	ERC4-5 N=353	Diálisis N=208
0	318 (82,6)	272 (82,7)	159 (81,1)
1	35 (9,1)	30 (9,1)	18 (9,2)
2	19 (4,9)	13 (4,0)	11 (5,6)
3	9 (2,3)	7 (2,1)	3 (1,5)
4	3 (0,8)	7 (2,1)	3 (1,5)
5	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (0,5)
6	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,5)

La variable se muestra como número de individuos N (% dentro del grupo). P=0,732

**Tabla 14. Número de calcificaciones en las arterias femoral y carótida en los distintos grupos a estudio, a 24 meses de seguimiento.**

Nº calcificaciones	ERC2-3 N=384	ERC4-5 N=328	Diálisis N=193
0	256 (66,7)	206 (62,8)	114 (59,1)
1	44 (11,5)	52 (15,9)	36 (18,7)
2	37 (9,6)	30 (9,1)	16 (8,3)
3	23 (6,0)	17 (5,2)	8 (4,1)
4	11 (2,9)	6 (1,8)	8 (4,1)
5	10 (2,6)	7 (2,1)	6 (3,1)
6	3 (0,8)	3 (0,9)	2 (1,0)
7	0 (0,0)	5 (1,5)	1 (0,5)
8	0 (0,0)	2 (0,6)	1 (0,5)
9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,5)

La variable se muestra como número de individuos N (% dentro del grupo). P=0,207

En este caso, como se partía de individuos ya enfermos, las frecuencias de calcificaciones fueron más altas, llegando hasta un 34,6% en femoral y un 18,9% en carótida, ambos en pacientes en diálisis. En ningún caso las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas.

Se definieron las variables cualitativas “Progresión femoral”, “Progresión carótida” y “Progresión total” de forma que las variables tomaban el valor “Sí” si la diferencia entre el número de calcificaciones a 24 meses y el número de calcificaciones en el momento basal era  $>0$  y “No” si no había diferencia en el número de calcificaciones en las arterias correspondientes, o en cualquiera de las dos para el caso de la tercera variable. En estas variables, por la razón que se explicó anteriormente, solo se analizaron los grupos de pacientes renales (Tablas 15, 16 y 17).

**Tabla 15. Número de individuos con progresión en el número de calcificaciones en la arteria femoral a los 24 meses de seguimiento, en los distintos grupos a estudio.**

Progresión femoral	ERC2-3 N=420	ERC4-5 N=349	Diálisis N=114
No	342 (81,4)	257 (73,6)	91 (79,8)
Sí	78 (18,6)	92 (26,4)	23 (20,2)

La variable se muestra como número de individuos N (% dentro del grupo).  $P=0,03$

**Tabla 16. Número de individuos con progresión en el número de calcificaciones en la arteria carótida a los 24 meses de seguimiento, en los distintos grupos a estudio.**

Progresión carótida	ERC2-3 N=397	ERC4-5 N=327	Diálisis N=105
No	352 (88,7)	285 (87,2)	95 (90,5)
Sí	45 (11,3)	42 (12,8)	10 (9,5)

La variable se muestra como número de individuos N (% dentro del grupo).  $P=0,623$

**Tabla 17. Número de individuos con progresión en el número de calcificaciones en las arterias femoral y/o carótida a los 24 meses de seguimiento, en los distintos grupos a estudio.**

Progresión total	ERC2-3 N=375	ERC4-5 N=315	Diálisis N=93
No	286 (76,3)	218 (69,2)	72 (77,4)
Sí	89 (23,7)	97 (30,8)	21 (22,6)

La variable se muestra como número de individuos N (% dentro del grupo).  $P=0,074$

Hasta un 30,8% de pacientes en estadios 4-5 sufrieron progresión del número de calcificaciones debido principalmente a la progresión en la arteria femoral (26,4%).

Solo en el caso de esta arteria hubo diferencias significativas entre las frecuencias de individuos con progresión en los distintos grupos de enfermedad, siendo los de estadios 4-5 los que más progresaron.

### 5.3 Características de la población en función de la calcificación vascular

Los individuos se agruparon según la presencia de calcificación vascular y se compararon para una serie de variables antropométricas y clínicas (Tabla 18), bioquímicas (Tabla 19) y de función renal (Tabla 20). Los grupos de población así creados fueron significativamente distintos en prácticamente todas las variables consideradas, siendo destacable la falta de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de calcio total y PTH en plasma (Tabla 19) y proteinuria (Tabla 20).

**Tabla 18. Diferencias en variables antropométricas y clínicas de la población dividida en grupos según estén o no calcificados.**

Variable	Calcificación		P-valor
	Sí N=353	No N=1419	
Sexo			<0,001
Hombre	252 (71,4)	809 (57,0)	
Mujer	101 (28,6)	610 (43,0)	
Edad	64 (8)	55 (13)	<0,001
IMC	30,0 (4,8)	28,2 (5,1)	0,006
Tabaquismo			<0,001
No fumador	116 (32,9)	624 (44,0)	
Ex fumador	155 (43,9)	515 (36,3)	
Fumador	82 (23,2)	280 (19,7)	
Diabetes			<0,001
No	209 (59,2)	119 (78,9)	
Sí	144 (40,8)	300 (21,1)	
Hipertensión			<0,001
No	25 (7,1)	378 (26,6)	
Sí	328 (92,9)	1041 (73,4)	
Dislipemia			<0,001
No	100 (28,3)	622 (43,8)	
Sí	253 (71,7)	797 (56,2)	
TAS, mmHg	147 (23)	139 (20)	<0,001
TAD, mmHg	81 (12)	81 (11)	0,547
ITB	1,11 (0,42)	1,07 (0,27)	0,091

IMC: índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; ITB: índice tobillo-brazo. Las variables cualitativas se muestran como n (%). Las variables cuantitativas se muestran como media (desviación estándar).

**Tabla 19. Diferencias en variables bioquímicas de la población dividida en grupos según estén o no calcificados.**

Variable	Calcificación		P-valor
	Sí N=353	No N=1419	
Colesterol total, mg/dl	179 (41)	187 (40)	0,002
Colesterol HDL, mg/dl	48 (15)	51 (15)	<0,001
Colesterol LDL, mg/dl	105 (36)	111 (35)	0,022
Triglicéridos, mg/dl	149 (79)	132 (76)	<0,001
Glucosa, mg/dl	115 (44)	107 (37)	0,001
PCRus, mg/l	5,9 (13,1)	3,5 (6,0)	0,001
Hemoglobina, g/dl	12,9 (1,8)	13,4 (1,8)	<0,001
Ferritina, ng/ml	250 (228)	198 (274)	0,001
Calcio total, mg/dl	9,3 (0,6)	9,3 (0,5)	0,736
Fósforo, mg/dl	4,1 (1,2)	3,9 (1,0)	0,009
Albúmina, g/dl	4,1 (0,5)	4,1 (0,4)	0,175
PTHi, pg/ml	176 (178)	174 (190)	0,827
25OH vitamina D	15,8 (7,2)	17,7 (8,0)	<0,001
1,25OH vitamina D	17,2 (10,7)	23,1 (14,2)	<0,001

PCRus: proteína C reactiva ultrasensible; PTHi: hormona paratiroidea intacta. Las variables se muestran como media (desviación estándar).

**Tabla 20. Diferencias en variables de función renal de la población dividida en grupos según estén o no calcificados.**

Variable	Calcificación Sí N=353	Calcificación No N=1419	P-valor
Filtrado glomerular	29,5 (22,5)	48,4 (34,2)	<0,001
Creatinina, mg/dl	3,8 (3,0)	2,8 (2,8)	<0,001
Proteinuria 24h, g	2,2 (2,6)	1,1 (1,6)	0,017
Proteinuria			0,349
Normoalbuminuria	48 (29)	223 (33)	
Microalbuminuria	56 (33)	233 (34)	
Macroalbuminuria	64 (38)	220 (32)	
Urea, mg/dl	103 (49)	82 (49)	<0,001
Ácido úrico, mg/dl	6,6 (1,7)	6,2 (1,7)	<0,001

Filtrado glomerular calculado como MDRD4. Las variables cualitativas se muestran como n (%). Las variables cuantitativas se muestran como media (desviación estándar).

#### **5.4 Identificación de polimorfismos candidatos.**

Como se explicó previamente, el estudio se centró en proteínas de matriz extracelular, por ser el espacio donde ocurre la calcificación. Además, se seleccionaron factores de transcripción que se ha demostrado que son claves en el proceso de calcificación porque regulan la expresión de proteínas implicadas en dicho proceso.

En cuanto a las proteínas presentes en la matriz extracelular, se seleccionaron las 11 siguientes (Tabla 21): MMP-1, -2, -3 y -9; BMP-2, -4 y -7; OPN, MGP, OC (BGLAP) y fetuina (ASHG). En total se consideraron 28 polimorfismos, tratando de seleccionar al menos dos por cada gen.

Cuando fue posible, se seleccionaron polimorfismos que además tengan demostrado un efecto funcional diferencial según el alelo presente. Por ello, mayoritariamente son polimorfismos de regiones promotoras o que producen un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente. Once de ellos estaban localizados en la región codificante, produciendo 10 de ellos un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína. Otros 12 polimorfismos se encuentran en la región promotora, pudiendo afectar, por tanto, a la regulación de la expresión del gen. Dos de los polimorfismos se localizan en la región 3' no traducida del gen de la OPN, que participa también en la regulación de la expresión del gen. Por último, 3 de los polimorfismos se localizan en intrones, teniendo por tanto un significado funcional incierto, pero fueron seleccionados porque había estudios previos de asociación con patologías relacionadas con la calcificación vascular.

**Tabla 21. Polimorfismos seleccionados pertenecientes a genes de proteínas de matriz extracelular.**

Polimorfismo	Gen	Secuencia y posición	Región
rs1144393	MMP1	NM_002421 c.-586A>G	Promotor
rs514921	MMP1	NM_002421 c.-407T>C	Promotor
rs243866	MMP2	NM_004530 c.-1855G>A	Promotor
rs243865	MMP2	NM_004530 c.-1586C>T	Promotor
rs17859821	MMP2	NM_004530 c.-1339G>A	Promotor
rs243864	MMP2	NM_004530 c.-1070T>G	Promotor
rs35068180	MMP3	NM_002422 c.-1671_-1670insT	Promotor
rs679620	MMP3	NP_002413 p.Lys45Glu	Codificante
rs17576	MMP9	NP_004985 p.Gln279Arg	Codificante
rs17577	MMP9	NP_004985 p.Arg668Gln	Codificante
rs2273073	BMP2	NP_001191 p.Ser37Ala	Codificante
rs235768	BMP2	NP_001191 p.Arg190Ser	Codificante
rs2071047	BMP4	NM_130851 c.370+160C>T	Intrón
rs17563	BMP4	NP_001193 p.Val152Ala	Codificante
rs6123674	BMP7	NM_001719 c.761-3972C>T	Intrón
rs17404303	BMP7	NM_001719 c.419-210G>A	Intrón
rs11730582	OPN	NM_000582 c.-546T>C	Promotor
rs28357094	OPN	NM_000582 c.-170T>G	Promotor
rs1126616	OPN	NP_000573 p.Ala236	Codificante
rs1126772	OPN	NM_001251830 c.*138A>G	3' UTR
rs9138	OPN	NM_000582 c.*294A>C	3' UTR
rs1800802	MGP	NM_000900 c.-194T>C	Promotor
rs1800801	MGP	NM_000900 c.-63G>A	Promotor
rs4236	MGP	NP_000891 p.Thr102Ala	Codificante
rs4917	AHSG	NP_001613 p.Met248Thr	Codificante
rs4918	ASHG	NP_001613 p.Ser256Thr	Codificante
rs1800247	BGLAP	NM_199173 c.-198T>C	Promotor
rs34702397	BGLAP	NP_954642 p.Arg94Gln	Codificante

La posición se refiere a la secuencia de referencia del mensajero (NM) o de la proteína (NP) según donde afecte el polimorfismo. UTR= región no traducida (del inglés untranslated region).

En cuanto a los factores de transcripción implicados en procesos de calcificación se seleccionaron RUNX2, MSX1 y MSX2 (Tabla 22). En este caso se seleccionaron 7 polimorfismos: 1 de región codificante, 1 de promotor, 1 de región 3' no traducida y 4 intrónicos correspondientes al gen de RUNX2, seleccionados estos últimos por la misma razón explicada anteriormente.

**Tabla 22. Polimorfismos seleccionados pertenecientes a factores de transcripción relacionados con el proceso de calcificación vascular.**

Polimorfismo	Gen	Posición	Región
rs2819854	RUNX2	NM_001015051 c.581-1156A>G	Intrón
rs2819858	RUNX2	NM_001015051 c.424-3281A>T	Intrón
rs1406846	RUNX2	NM_001015051 c.580+1184T>A	Intrón
rs7771980	RUNX2	NM_001015051 c.59-1041T>C	Intrón
rs12532	MSX1	NM_002448 c.*276A>G	3' UTR
rs4647952	MSX2	NM_002449 c.-17C>G	Promotor
rs4242182	MSX2	NP_002440 p.Met129Thr	Codificante

La posición se refiere a la secuencia de referencia del RNA mensajero (NM) o de la proteína (NP) según donde afecte el polimorfismo. UTR= región no traducida (del inglés untranslated region).

### 5.5 Frecuencias de los polimorfismos en nuestra población.

En un análisis preliminar de los 35 polimorfismos en 575 individuos se comprobó que todos ellos cumplían los criterios de calidad para ser utilizados en los análisis de asociación. Se decidió descartar 2 de los polimorfismos por su baja frecuencia en nuestra población: rs2273073 de BMP2 (frecuencia de heterocigotos 0,02) y rs34702397 de BGLAP (frecuencia de heterocigotos 0,01), y otros 2 polimorfismos de MMP2 porque estaban en desequilibrio de ligamiento con un tercero, incluyendo en el genotipado definitivo solo a uno de ellos (rs243864).

Para los restantes 31 polimorfismos se obtuvieron los genotipos de los 2053 individuos seleccionados para el estudio y se calcularon las frecuencias alélicas (Tabla 23). No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de los alelos minoritarios en nuestra población y las obtenidas por el proyecto 1000 Genomas para población europea.

**Tabla 23. Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados.**

SNP	Alelo		MAF	1000G	
rs1126616		C: 0,7084	T: 0,2916	0,2916	0,3614
rs1126772	A: 0,7743		G: 0,2257	0,2257	0,1691
rs1144393		C: 0,3551	T: 0,6449	0,3551	0,1977
rs11730582		C: 0,4805	T: 0,5195	0,4805	0,3361
rs12532	A: 0,7159		G: 0,2841	0,2841	0,4233
rs1406846	A: 0,4968		T: 0,5032	0,4968	0,4714
rs17404303		C: 0,6096	T: 0,3904	0,3904	0,2348
rs17563		C: 0,4940	T: 0,5060	0,4940	0,3257
rs17576	A: 0,6301		G: 0,3699	0,3699	0,4555
rs17577	A: 0,1291		G: 0,8709	0,1291	0,1909
rs17859821	A: 0,1287		G: 0,8713	0,1287	0,1380
rs1800247		C: 0,2295	T: 0,7705	0,2295	0,2224
rs1800801	A: 0,3869		G: 0,6131	0,3869	0,2622
rs1800802		C: 0,1705	T: 0,8295	0,1705	0,1929
rs2071047		C: 0,5385	T: 0,4615	0,4615	0,4101
rs235768	A: 0,3440		T: 0,6560	0,3440	0,2332
rs243864		G: 0,2312	T: 0,7688	0,2312	0,1386
rs2819854		C: 0,5121	T: 0,4879	0,4879	0,4754
rs2819858	A: 0,4578		T: 0,5422	0,4578	0,4928
rs28357094		G: 0,2419	T: 0,7581	0,2419	0,1008
rs35068180	A: 0,4866		T: 0,5134	0,4866	0,2117
rs4236	A: 0,5820		G: 0,4180	0,4180	0,3854
rs4242182		C: 0,8940	T: 0,1060	0,1060	0,2342
rs4647952		C: 0,9466	G: 0,0534	0,0534	0,0136
rs4917		C: 0,7257	T: 0,2743	0,2743	0,2646
rs4918		C: 0,7226	G: 0,2774	0,2774	0,2863
rs514921	A: 0,7356		G: 0,2644	0,2644	0,2248
rs6123674	A: 0,5747		G: 0,4253	0,4253	0,4930
rs679620	A: 0,4903		G: 0,5097	0,4903	0,3478
rs7771980		C: 0,0611	T: 0,9389	0,0611	0,0789
rs9138	A: 0,7084	C: 0,2916		0,2916	0,3618

MAF= frecuencia del alelo minoritario (del inglés minor allele frequency). 1000G: frecuencia del alelo minoritario en el proyecto 1000 Genomas.

Se determinó si la población cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg comparando las frecuencias observadas con las esperadas según las frecuencias alélicas calculadas previamente. En todos los polimorfismos se obtuvo un  $p$ -valor  $>0,05$  con lo cual se cumplía el equilibrio (Tabla 24).

**Tabla 24. Comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población.**

Polimorfismo	Heterocigotos observados	Heterocigotos esperados	P-valor
rs1126616	0,3937	0,4131	0,1957
rs1126772	0,355	0,3495	0,7063
rs1144393	0,475	0,458	0,2623
rs11730582	0,5176	0,4992	0,2273
rs12532	0,3957	0,4067	0,4619
rs1406846	0,4884	0,5	0,447
rs17404303	0,4819	0,476	0,6981
rs17563	0,4884	0,4999	0,449
rs17576	0,4424	0,4661	0,1182
rs17577	0,2266	0,2248	0,8909
rs17859821	0,2389	0,2243	0,2497
rs1800247	0,3622	0,3537	0,5592
rs1800801	0,4699	0,4744	0,7646
rs1800802	0,291	0,2829	0,554
rs2071047	0,493	0,497	0,7931
rs235768	0,441	0,4513	0,4972
rs243864	0,3587	0,3555	0,8295
rs2819854	0,4875	0,4997	0,4216
rs2819858	0,4893	0,4964	0,6408
rs28357094	0,3649	0,3667	0,9002
rs35068180	0,525	0,4996	0,0955
rs4236	0,4875	0,4865	0,9506
rs4242182	0,1806	0,1896	0,4504
rs4647952	0,0975	0,1011	0,6914
rs4917	0,4022	0,3981	0,7843
rs4918	0,4006	0,4009	0,981
rs514921	0,3987	0,389	0,5136
rs6123674	0,4977	0,4888	0,5611
rs679620	0,5223	0,4998	0,1404
rs7771980	0,1148	0,1148	0,9949
rs9138	0,3937	0,4131	0,1957

## 5.6 Búsqueda de asociación genética con calcificación vascular

En primer lugar, se buscó una asociación entre los polimorfismos y las variables que cuantifican el número de calcificaciones presentes en arteria femoral, en carótida y en ambas. Ante el incumplimiento de la hipótesis de normalidad y/o homocedasticidad, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En el caso de detectarse diferencias significativas en la comparación de los 3 genotipos para cada polimorfismo, se realizó el test *post hoc* de comparaciones múltiples de Dunn. Se encontró una asociación con 3 polimorfismos de forma que en los 3 casos la presencia del alelo raro (el menos frecuente en la población) era más frecuente en individuos con mayor número de calcificaciones. En concreto, el polimorfismo rs1800801 de MGP se asoció con mayor número de calcificaciones en arteria femoral (Tabla 25), con diferencias significativas entre el genotipo GG y AA ( $p$ -valor=0,028).

**Tabla 25. Número de calcificaciones en la arteria femoral de acuerdo al genotipo para el polimorfismo rs1800801 de MGP.**

Genotipo	N	Media	D.t.	P-valor
AA	299	0,33	0,75	0,03
GA	892	0,27	0,71	
GG	701	0,24	0,66	

*N=número de individuos. D.t.=desviación típica*

Esta asociación también se manifestaba considerando la variable “Calcificación femoral Sí/No”, obteniéndose un mayor porcentaje de individuos con genotipo AA entre los calcificados en femoral que entre los no calcificados ( $p$ -valor=0,03) (Tabla 26).

**Tabla 26. Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800801 de MGP en función de la presencia o no de calcificaciones en la arteria femoral.**

Genotipo	Calcificación femoral			
	No		Sí	
	N	%	N	%
AA	236	14,93	63	20,26
GA	744	47,06	148	47,59
GG	601	38,01	100	32,15

*N=número de individuos*

Además, el polimorfismo rs7771980 de RUNX2 se asoció con mayor número de calcificaciones en arteria carótida, con diferencias significativas entre el genotipo TC y CC (p-valor=0,004) y entre el genotipo TT y CC (p-valor=0,002) (Tabla 27).

**Tabla 27. Número de calcificaciones en la arteria carótida de acuerdo al genotipo para el polimorfismo rs7771980 de RUNX2.**

Genotipo	N	Media	D.t.	P-valor
CC	9	0,78	0,97	
TC	205	0,25	0,80	<0,001
TT	1514	0,19	0,70	

*N=número de individuos. D.t.=desviación típica*

Esta asociación también se manifestaba considerando la variable “Calcificación carótida Sí/No”, obteniéndose un mayor porcentaje de individuos con genotipo CC o incluso del heterocigoto TC entre los calcificados en carótida que entre los no calcificados (p-valor=0,01) (Tabla 28).

**Tabla 28. Distribución de genotipos del polimorfismo rs7771980 de RUNX2 en función de la presencia o no de calcificaciones en la arteria carótida.**

Genotipo	Calcificación carótida			
	No		Sí	
	N	%	N	%
CC	5	0,32	4	2,29
TC	180	11,59	25	14,29
TT	1368	88,09	146	83,43

*N=número de individuos*

Por último, el polimorfismo rs4242182 de MSX2 se asoció con mayor número de calcificaciones en las dos arterias (Tabla 29), con diferencias significativas entre el genotipo TT y CT (p-valor=0,049).

**Tabla 29. Número de calcificaciones en las arterias femoral y carótida de acuerdo al genotipo para el polimorfismo rs4242182 de MSX2.**

Genotipo	N	Media	D.t.	P-valor
CC	1332	0,42	1,16	
CT	324	0,47	1,03	0,03
TT	27	0,19	0,62	

*N=número de individuos. D.t.=desviación típica*

Esta asociación también se manifestaba considerando la variable “Calcificación Sí/No”, obteniéndose un mayor porcentaje de individuos con genotipo heterocigoto CT entre los calcificados que entre los no calcificados ( $p$ -valor=0,02) (Tabla 30), siendo muy poco frecuentes en los dos grupos los individuos homocigotos para el alelo minoritario TT.

**Tabla 30. Distribución de genotipos del polimorfismo rs4242182 de MSX2 en función de la presencia o no de calcificaciones en las arterias femoral y carótida.**

Genotipo	Calcificación total			
	No		Sí	
	N	%	N	%
CC	1086	80,21	246	74,77
CT	244	18,02	80	24,32
TT	24	1,77	3	0,91

*N=número de individuos*

### 5.7. Búsqueda de asociación genética con la progresión del número de calcificaciones

Se buscaron asociaciones genéticas con la progresión del número de calcificaciones evaluadas a 24 meses en arteria femoral, carótida o en cualquiera de las dos. No se encontró asociación entre ningún polimorfismo y la progresión de calcificaciones en arteria carótida, pero en el caso de la arteria femoral se encontró asociación con el polimorfismo rs1800802 de MGP de forma que el genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente (CC) e incluso el heterocigoto (TC) eran más frecuentes entre los individuos con progresión total ( $p$ -valor=0,01) y más específicamente entre los individuos con progresión en femoral ( $p$ -valor<0,01) (Tabla 31).

**Tabla 31. Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800802 de MGP en función de la progresión o no del número de calcificaciones en la arteria femoral o en las arterias femoral y carótida (total).**

Genotipo	Progresión femoral				Progresión total			
	No		Sí		No		Sí	
	N	%	N	%	N	%	N	%
CC	9	1,40	11	5,95	9	1,68	9	4,59
TC	179	27,88	60	32,43	142	26,44	66	33,67
TT	454	70,72	114	61,62	386	71,88	121	61,73

*N=número de individuos*

Además, se encontró asociación entre el polimorfismo rs514921 en MMP1 y la progresión del número de calcificaciones considerando las dos arterias de forma que el genotipo homocigoto para el alelo minoritario era más frecuente entre los que habían progresado (p-valor=0,049) (Tabla 32).

**Tabla 32. Distribución de genotipos del polimorfismo rs514921 de MMP1 en función de la progresión o no del número de calcificaciones en las arterias femoral y carótida.**

Genotipo	Progresión total			
	No		Sí	
	N	%	N	%
AA	302	56,24	98	49,75
AG	198	36,87	75	38,07
GG	37	6,89	24	12,18

*N=número de individuos*

### 5.8. Análisis multivariante de la asociación de polimorfismos y calcificación

Con el fin de determinar la contribución en el proceso de calcificación de cada una de las variables estudiadas de forma independiente, se construyó un modelo de regresión logística binaria para predecir la calcificación. Se incluyeron como variables predictoras los polimorfismos que habían salido asociados con calcificación en alguno de los territorios (rs1800801, rs4242182 y rs7771980) junto con las variables que resultaron estadísticamente significativas en el análisis bivariante para “Calcificación Sí/No” (ver Tablas 18,19 y 20). Se simplificó el modelo utilizando un algoritmo por pasos, mostrándose en la Tabla 33 las variables del modelo final. En concreto, se presentan los coeficientes, los OR y sus intervalos de confianza al 95% junto con la significación del test de Wald y se observa que se pierde la contribución de los polimorfismos a la calcificación, con una aportación más importante del hecho de ser fumador y diabético (Tabla 33).

**Tabla 33. Regresión logística binaria múltiple en función de la calcificación total.**

Variable	Coefficiente	OR	IC (95%)	P-valor
Edad	0,068	1,071	1,051-1,092	<0,001
Tabaquismo				
No fumador	Referencia			
Ex fumador	0,570	1,769	1,181-2,661	0,006
Fumador	0,860	2,363	1,446-3,870	<0,001
Diabetes				
No	Referencia			
Sí	0,807	2,242	1,523-3,301	<0,001
Hipertensión				
No	Referencia			
Sí	0,610	1,841	0,911-4,066	0,106
TAS	0,008	1,008	0,999-1,017	0,051
Creatinina	0,163	1,177	1,084-1,277	<0,001
Colesterol total	0,007	1,007	1,002-1,011	0,006
PCRus	0,035	1,036	1,015-1,061	0,002
Hemoglobina	0,159	1,172	1,038-1,325	0,011
Urea	0,004	1,004	0,999-1,008	0,065

TAS: tensión arterial sistólica; PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

Sin embargo, estratificando la población por estadio de ERC, el polimorfismo rs4242182 de MSX2 sí que contribuye a la calcificación con una OR=2,32 para el genotipo heterocigoto ( $p=0,005$ ) pero sólo en los pacientes en estadio 2-3, es decir, en estadios tempranos de la enfermedad renal (Tabla 34). Excepto el hecho de ser fumador, es la variable que aporta una OR más alta en nuestro modelo.

**Tabla 34. Regresión logística binaria múltiple en función de la calcificación total estratificando por estadio de ERC.**

Variable	Coefficiente	OR	IC (95%)	P-valor
<b>ERC2-3</b>				
rs4242182				
Genotipo CC	Referencia			
Genotipo CT	0,842	2,32	1,279-4,181	0,005
Genotipo TT	0,337	1,4	0,065-12,074	0,780
Tabaquismo				
No fumador	Referencia			
Ex fumador	0,470	1,598	0,901-2,867	0,111
Fumador	0,972	2,642	1,319-5,332	0,006
ITB	-0,933	0,393	0,109-1,094	0,110
Triglicéridos	0,004	1,004	1,001-1,007	0,005
<b>ERC4-5</b>				
Edad	0,073	1,076	1,049-1,106	<0,001
Diabetes				
No	Referencia			
Sí	0,436	1,546	0,937-2,544	0,086
TAS	0,0133	1,013	1,002-1,025	0,025
PCRus	0,029	1,029	1,004-1,063	0,05
Calcio total	0,498	1,645	1,068-2,574	0,026
<b>Diálisis</b>				
Edad	0,063	1,064	1,040-1,091	<0,001
Diabetes				
No	Referencia			
Sí	1,014	2,757	1,479-5,166	0,001

ITB: índice tobillo-brazo; TAS: tensión arterial sistólica; PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

### 5.9. Análisis multivariante de la asociación de polimorfismos y progresión del número de calcificaciones

Con el fin de determinar la contribución de cada una de las variables estudiadas que mostraron asociación de forma independiente ( $p < 0,05$ ) en la progresión del número de calcificaciones, se realizó un análisis multivariante. Para ello se utilizó un modelo de regresión logística binaria, simplificándolo posteriormente empleando un método de selección paso a paso.

Se encontró que tanto en el caso del polimorfismo rs1800802 de MGP como en el rs514921 de MMP1, los individuos que tenían el genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente contribuían significativamente al modelo de progresión de

calcificación (Tabla 35), siendo los mayores contribuyentes en nuestro modelo a juzgar por las OR.

**Tabla 35. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión del número de calcificaciones.**

Variable	Coefficiente	OR	IC (95%)	P-valor
rs1800802				
Genotipo TT	Referencia			
Genotipo TC	0,416	1,515	1,015-2,256	0,041
Genotipo CC	1,577	4,843	1,587-15,237	0,006
rs514921				
Genotipo AA	Referencia			
Genotipo AG	0,194	1,214	0,819-1,796	0,331
Genotipo GG	0,734	2,083	1,105-3,889	0,022
Sexo				
Hombre	Referencia			
Mujer	-0,491	0,612	0,387-0,959	0,034
Edad				
Tabaquismo				
No fumador	Referencia			
Ex fumador	0,418	1,519	0,954-2,432	0,079
Fumador	0,595	1,813	1,030-3,191	0,039
TAS	0,015	1,015	1,006-1,025	<0,001
Urea	0,006	1,005	1,002-1,010	0,004
PCRus	0,057	1,059	1,027-1,095	<0,001

TAS: tensión arterial sistólica; PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

Al estratificar por estadio de ERC se comprueba que la contribución del polimorfismo rs1800802 de MGP se mantiene específicamente en el estadio 2-3 de ERC pero se pierde la contribución del polimorfismo de MMP1 (Tabla 36).

**Tabla 36. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión de la calcificación estratificando por estadio de ERC.**

Variable	Coeficiente	OR	IC (95%)	P-valor
<b>ERC2-3</b>				
rs1800802				
Genotipo TT	Referencia			
Genotipo TC	0,114	1,121	0,616-2,001	0,703
Genotipo CC	1,479	4,390	1,085-18,939	0,037
Sexo				
Hombre	Referencia			
Mujer	-0,506	0,603	0,327-1,079	0,096
Edad	0,08	1,084	1,050-1,122	<0,001
<b>ERC4-5</b>				
Sexo				
Hombre	Referencia			
Mujer	-0,721	0,486	0,257-1,028	<0,001
Edad	0,066	1,068	1,033-1,107	<0,001
Tabaquismo				
No fumador	Referencia			
Ex fumador	1,269	3,557	1,594-8,293	0,002
Fumador	1,346	3,943	1,427-10,797	0,009
Diabetes				
No	Referencia			
Sí	0,708	2,033	1,034-4,011	0,039
Dislipemia				
No	Referencia			
Sí	1,224	3,401	1,475-8,560	0,006
TAS	0,022	1,022	1,006-1,040	0,01
PCRus	0,088	1,091	1,041-1,155	<0,001
Urea	0,009	1,009	1,002-1,017	0,028
<b>Diálisis</b>				
Edad	0,046	1,047	1,009-1,092	0,023

TAS: tensión arterial sistólica; PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

Además, esta asociación era debida a la contribución a la progresión de la calcificación en arteria femoral, como se vio en el correspondiente modelo de regresión logística (Tabla 37).

**Tabla 37. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión de la calcificación en arteria femoral.**

Variable	Coficiente	OR	IC (95%)	P-valor
rs1800802				
Genotipo TT	Referencia			
Genotipo TC	0,417	1,518	1,010-2,271	0,043
Genotipo CC	1,674	5,336	1,838-16,299	0,002
Sexo				
Hombre	Referencia			
Mujer	-0,522	0,594	0,368-0,945	0,029
Edad	0,053	1,054	1,034-1,076	<0,001
Tabaquismo				
No fumador	Referencia			
Ex fumador	0,576	1,778	1,094-2,919	0,021
Fumador	0,941	2,561	1,447-4,567	0,001
Diabetes				
No	Referencia			
Sí	0,470	1,600	1,082-2,363	0,018
Dislipemia				
No	Referencia			
Sí	0,378	1,460	0,946-2,292	0,093
TAS	0,009	1,009	1,001-1,019	0,034
Urea	0,007	1,007	1,003-1,011	<0,001
PCRus	0,033	1,033	1,005-1,063	0,018

TAS: tensión arterial sistólica; PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

Esta asociación se mantenía también al estratificar por estadio de enfermedad renal, aunque solo en estadios tempranos (2-3) de la enfermedad (Tabla 38) siendo el mayor contribuyente en nuestro modelo.

**Tabla 38. Regresión logística binaria múltiple en función de la progresión de la calcificación femoral estratificando por estadio de ERC.**

	Coefficiente	OR	IC (95%)	P-valor
<b>ERC 2-3</b>				
rs1800802				
genotipo TT	Referencia			
genotipo TC	0,090	1,094	0,605-1,935	0,759
genotipo CC	1,518	4,565	1,193-17529	0,023
Sexo				
Hombre	Referencia			
Mujer	-0,6001	0,548	0,292-0,986	0,052
Edad	0,069	1,072	1,039-1,110	<0,001
<b>ERC 4-5</b>				
Sexo				
Hombre	Referencia			
Mujer	-0,798	0,45	0,211-0,940	0,035
Edad	0,066	1,068	1,036-1,106	<0,001

### 5.10 Asociación de polimorfismos y filtrado glomerular

Con el fin de determinar si existía alguna asociación subyacente de los polimorfismos que se habían encontrado asociados con calcificación, con el grado de enfermedad renal, se creó un modelo lineal incluyendo los polimorfismos que habían salido asociados con calcificación junto con el resto de variables, utilizando como variable dependiente el valor del filtrado glomerular calculado como MDRD4. Se pudo comprobar que ninguno de los polimorfismos se mantenía en el modelo y por tanto no había asociación con esta variable de enfermedad renal, que era dependiente principalmente de la presencia de hipertensión (Tabla 39).

**Tabla 39. Modelo lineal (ANCOVA) para el filtrado glomerular.**

Variable	Coefficiente	P-valor
Edad	-0,271	<0,001
Hipertensión		
No	Referencia	
Sí	-21,377	<0,001
Dislipemia		
No	Referencia	
Sí	-4,003	<0,001
TAD	-0,129	<0,001
Creatinina	-7,569	<0,001
Hemoglobina	1,737	<0,001
Fósforo	2,493	<0,001
Urea	-0,098	<0,001
Ácido úrico	-2,118	<0,001
1,25OH Vit D	0,207	<0,001

TAD: tensión arterial diastólica

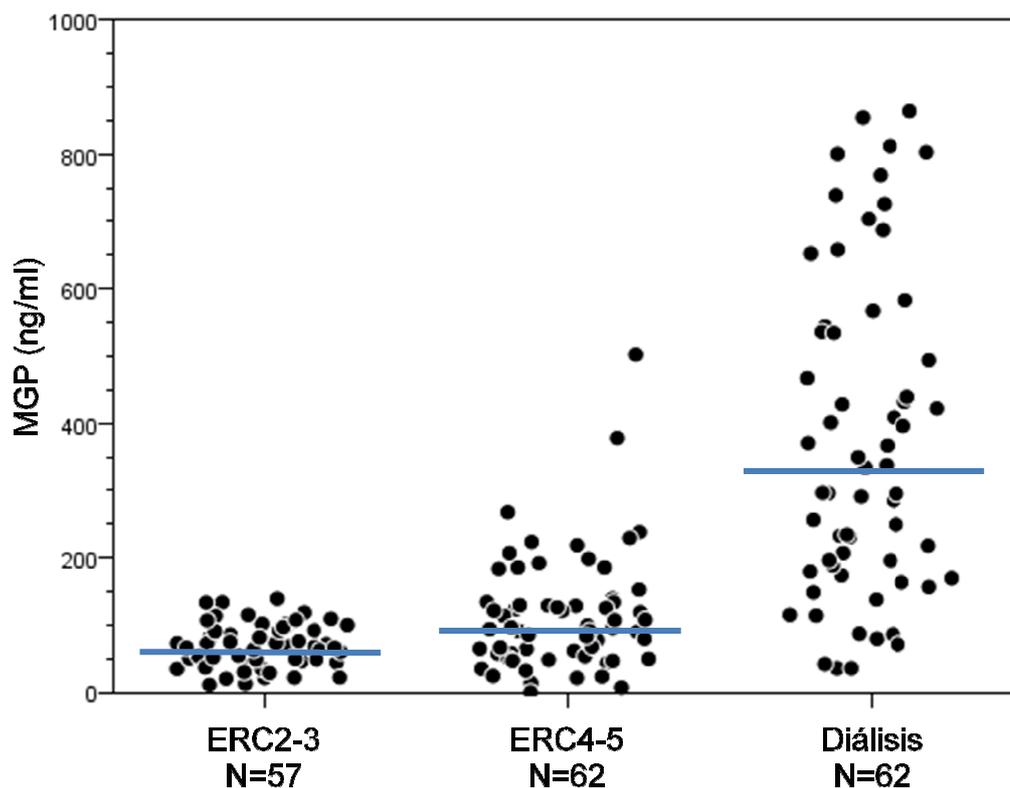
### 5.11 Asociación de niveles circulantes de proteínas y calcificación vascular

De los genes con polimorfismos potencialmente asociados a calcificación vascular solo los de MGP y MMP1 codifican proteínas que aparecen en la circulación. Por ello, se determinaron los niveles circulantes de ambas en muestras de plasma de pacientes utilizando la técnica de ELISA. En primer lugar, se compararon los niveles en pacientes con diferentes estadios de enfermedad renal. En el caso de MMP1 no se obtuvieron niveles detectables en ninguno de los grupos estudiados y por eso no se pudieron hacer análisis de asociación.

Los niveles de MGP obtenidos no presentaron una distribución normal y por ello se utilizaron test estadísticos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis). Se encontraron diferencias significativas en los niveles según el estadio, de forma que eran significativamente más altos según se agrava la enfermedad renal, con los niveles más altos en los pacientes en diálisis (p-valor<0,001) (Tabla 40 y Figura 3).

**Tabla 40. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el estadio de ERC.**

Estadio ERC	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
ERC2-3	54,6	35,4-75,8
ERC4-5	92,2	64,0-140,4
Diálisis	324,4	187,0-516,5



**Figura 3.** Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes en distintos estadios de enfermedad renal. Las barras horizontales indican la mediana.

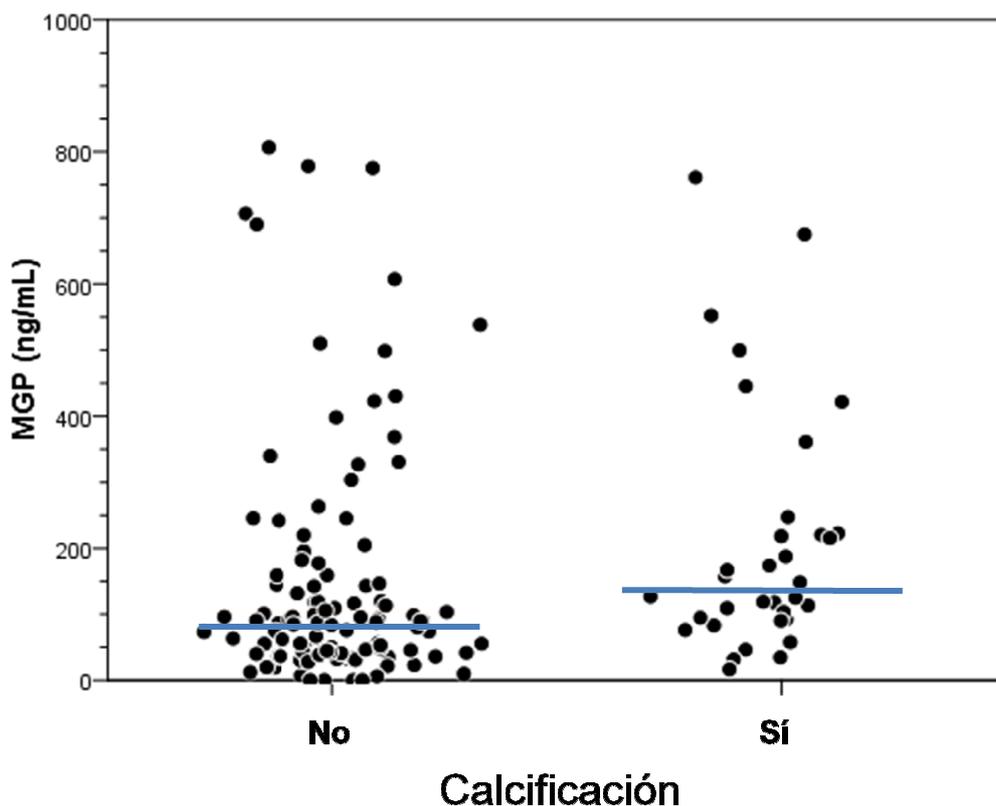
De hecho, hay una relación lineal inversa, estadísticamente significativa, entre los niveles plasmáticos de MGP y el valor de filtrado glomerular calculado como MDRD4 en los pacientes renales, con una correlación de Pearson de -0,569 ( $p < 0,001$ ).

A continuación, se analizaron los niveles de MGP en relación con la presencia o no de calcificación vascular y se encontró que los pacientes calcificados presentaban unos niveles más altos de MGP circulante ( $p = 0,016$ ) (Tabla 41 y Figura 4).

**Tabla 41.** Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según tengan o no calcificación vascular.

Calcificación	N	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
No	109	84,0	49,9-152,3
Sí	34	135,4	72,7-253,4

*N: número de individuos*



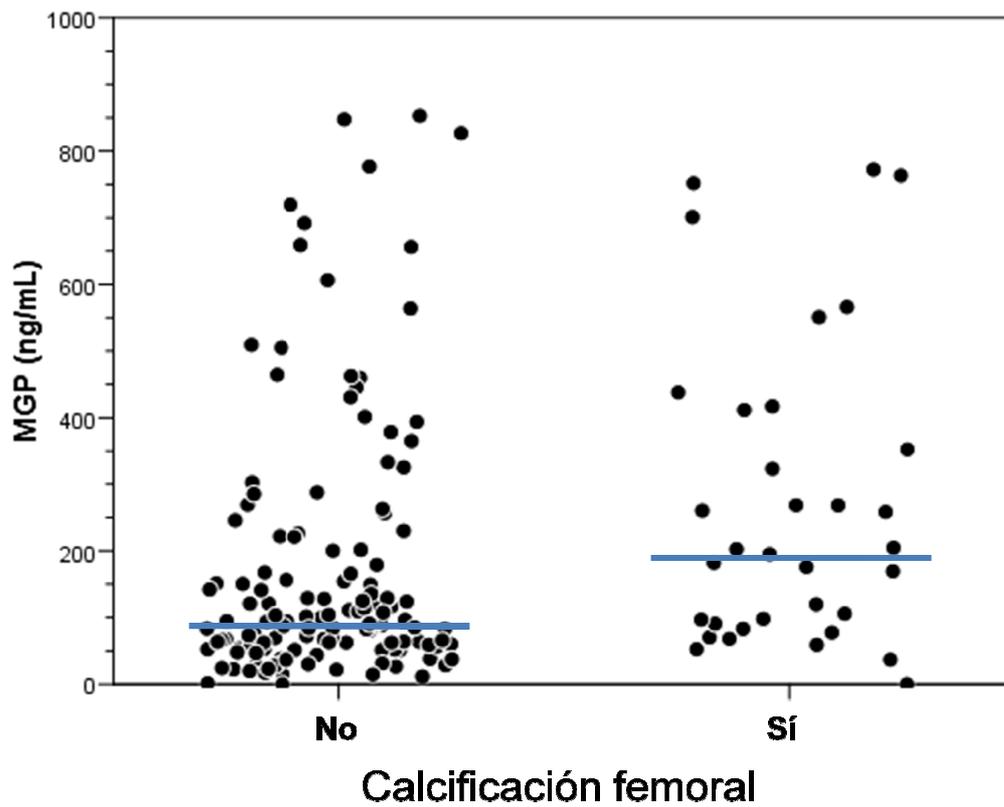
**Figura 4.** Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según presenten calcificación vascular o no. Las barras horizontales indican la mediana.

Esta asociación se mantenía estadísticamente significativa con la calcificación en arteria femoral ( $p=0,001$ ) (Tabla 42 y Figura 5) pero no con la carótida ( $p=0,212$ ) (Tabla 43 y Figura 6).

**Tabla 42.** Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según tengan o no calcificación en la arteria femoral.

Calcificación femoral	N	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
No	140	85,2	50,9-187,0
Sí	34	185,6	94,5-371,6

*N:* número de individuos

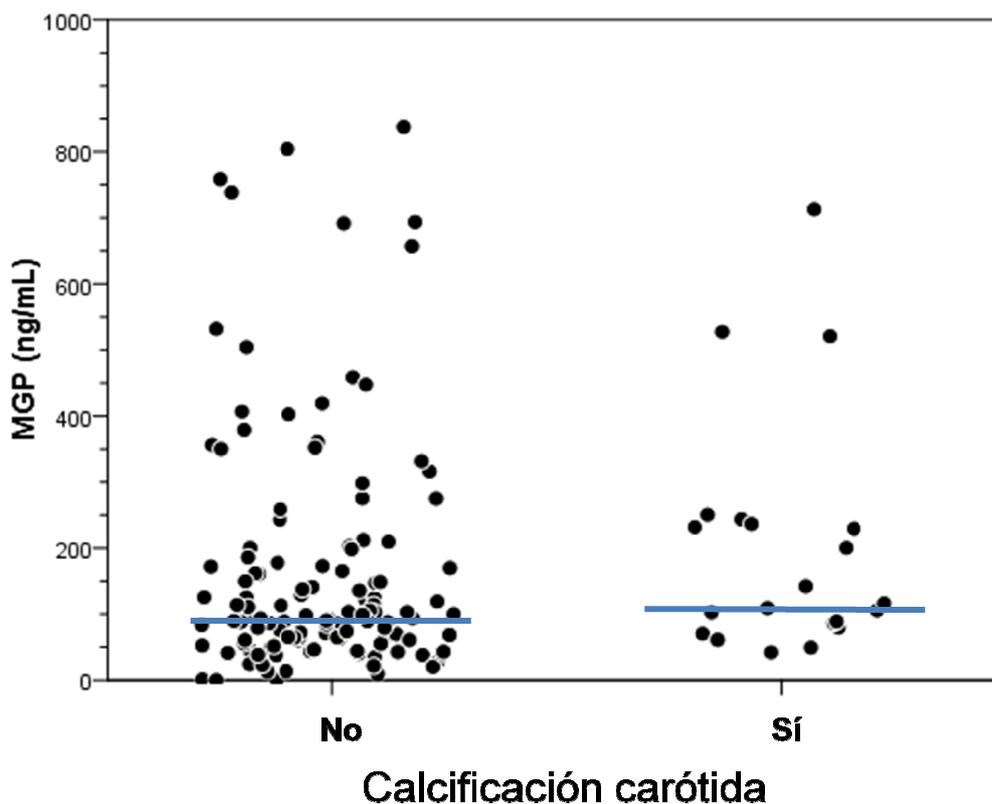


*Figura 5. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según presenten calcificación en la arteria femoral o no. Las barras horizontales indican la mediana.*

*Tabla 43. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según tengan o no calcificación en la arteria carótida.*

Calcificación carótida	N	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
No	128	88,6	50,5-181,4
Sí	21	103,2	62,7-230,7

*N: número de individuos*



*Figura 6. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según presenten calcificación en la arteria carótida o no. Las barras horizontales indican la mediana.*

### 5.12 Análisis multivariante de la asociación de niveles circulantes de MGP y calcificación

Con el fin de determinar la contribución de los niveles circulantes de MGP a la calcificación, se realizó un análisis multivariante incluyendo las variables estudiadas que habían mostrado asociación con calcificación de forma independiente ( $p < 0,05$ ). Para ello, se utilizó un modelo de regresión logística binaria, simplificándolo posteriormente empleando un método de selección paso a paso. Se observó que se pierde la contribución de los niveles circulantes de MGP a la calcificación.

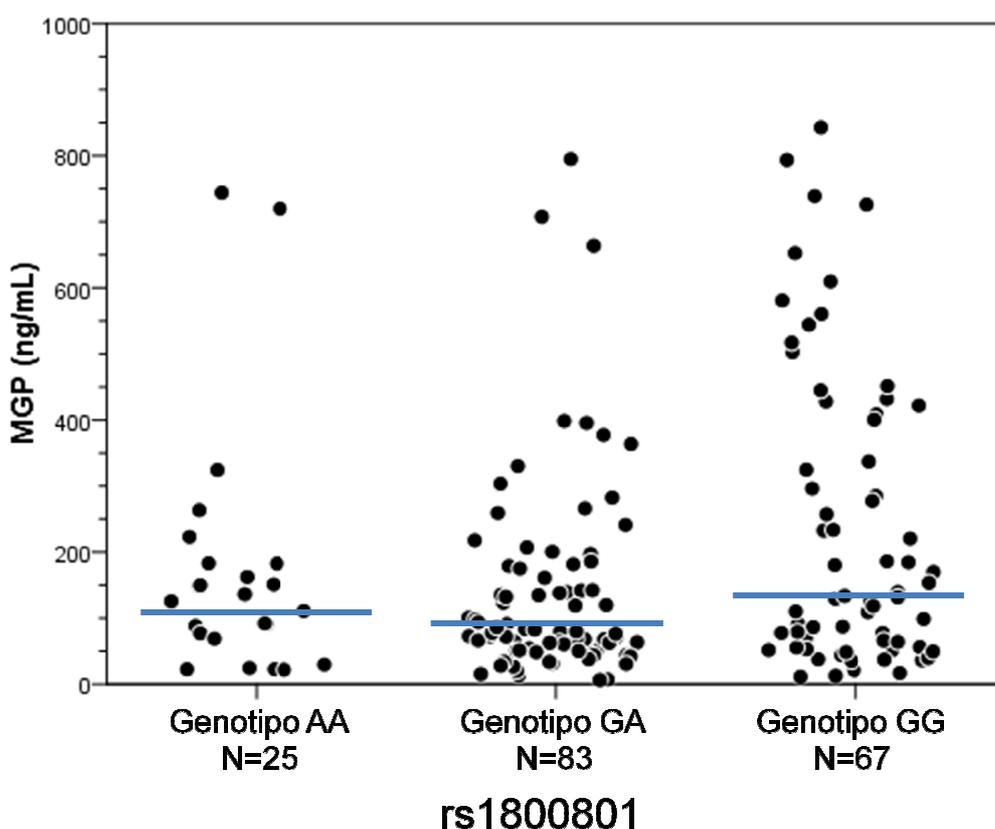
### 5.13 Asociación de niveles circulantes de MGP y polimorfismos

Se estudió la posible asociación entre los niveles de MGP circulante y los distintos polimorfismos estudiados en el gen, dos de los cuales están localizados en la región promotora y, por tanto, podrían afectar a los niveles de la proteína (rs1800801 y rs1800802), y otro produce un cambio de aminoácido (rs4236).

En cuanto al polimorfismo rs1800801 situado en la región promotora del gen, los homocigotos para el alelo menos frecuente (AA) y los heterocigotos presentaban niveles más bajos de MGP circulante ( $p=0,023$ ) (Tabla 44 y Figura 7).

**Tabla 44. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs1800801.**

rs1800801	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
Genotipo AA	107,0	65,6-148,6
Genotipo GA	81,6	50,5-149,2
Genotipo GG	139,7	61,9-357,0

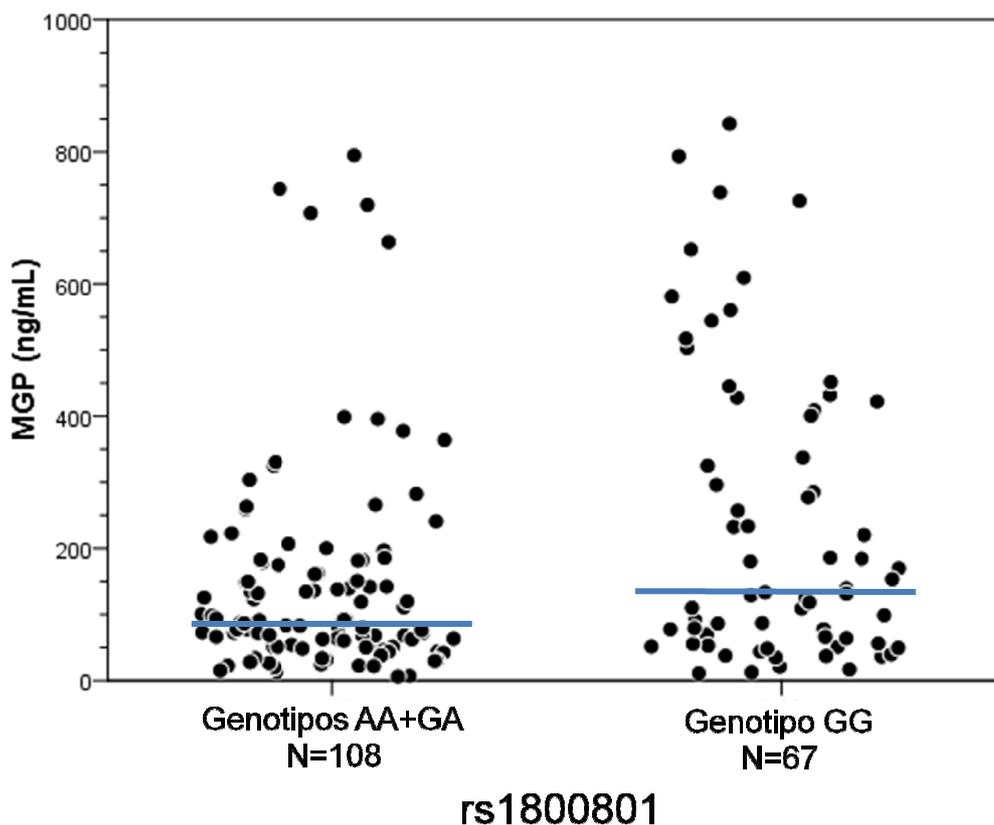


**Figura 7. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes agrupados según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800801. Las barras horizontales indican la mediana.**

Aplicando un modelo de herencia dominante se pudo comprobar que efectivamente los portadores de dicho alelo A tenían niveles más bajos de MGP circulante ( $p<0,001$ ) (Tabla 45 y Figura 8).

**Tabla 45. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo agrupado según un modelo de herencia dominante, para el polimorfismo rs1800801.**

rs1800801 agrupado	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
Genotipos AA+GA	86,2	51,1-149,3
Genotipo GG	139,7	61,9-357,0

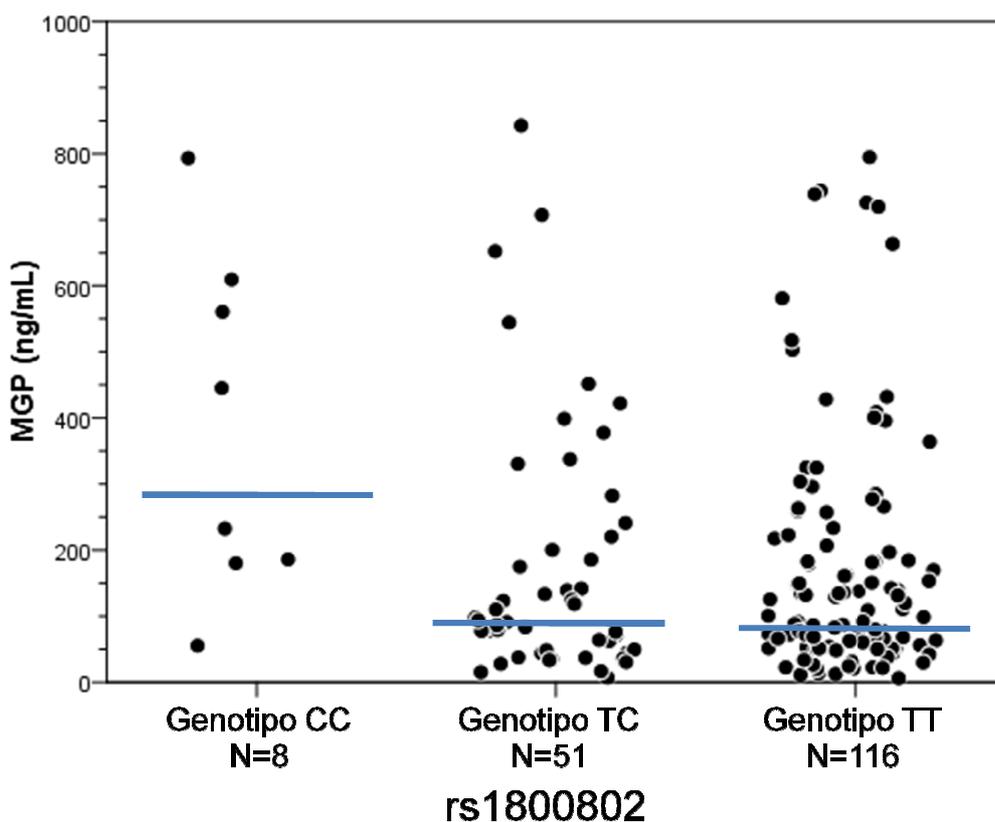


**Figura 8. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800801 agrupados siguiendo un modelo de herencia recesiva. Las barras horizontales indican la mediana.**

En cuanto al polimorfismo rs1800802, situado también en la región promotora del gen, se observaron diferencias significativas en los niveles de MGP circulante según los distintos genotipos, de forma que, en este caso, los individuos homocigotos para el alelo menos frecuente presentaban valores más altos de MGP que el resto de genotipos ( $p=0,017$ ) (Tabla 46 y Figura 9).

**Tabla 46. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs1800802.**

rs1800802	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
Genotipo CC	304,2	181,7-547,9
Genotipo TC	92,9	57,8-207,3
Genotipo TT	86,5	53,5-210,6

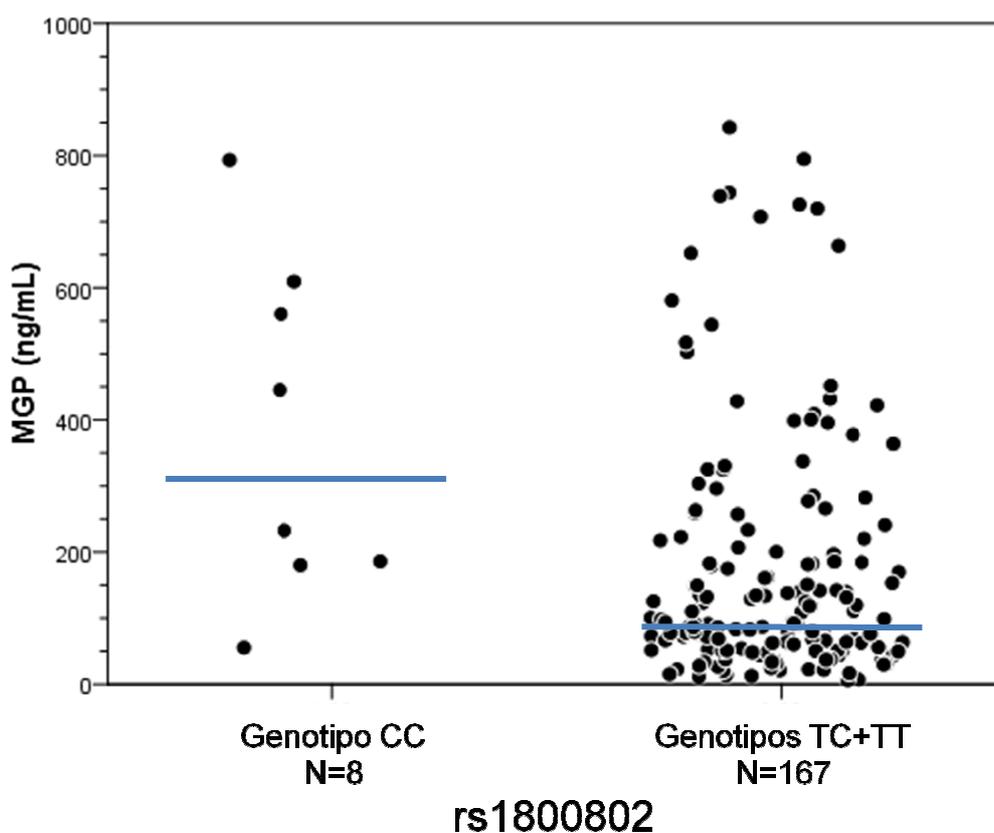


**Figura 9. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes agrupados según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800802. Las barras horizontales indican la mediana.**

Una vez vista la distribución de los niveles de MGP se aplicó un modelo de herencia recesiva de forma que se agruparon los genotipos heterocigoto y homocigoto del alelo más frecuente y se comprobó que, efectivamente, los homocigotos para el alelo menos frecuente presentaban niveles significativamente más altos de MGP que el resto de genotipos ( $p < 0,001$ ) (Tabla 47 y Figura 10).

**Tabla 47. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo agrupado según un modelo de herencia dominante, para el polimorfismo rs1800802.**

rs1800802 agrupado	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
Genotipo CC	304,2	181,7-547,9
Genotipos TC+TT	89,8	54,4-212,0

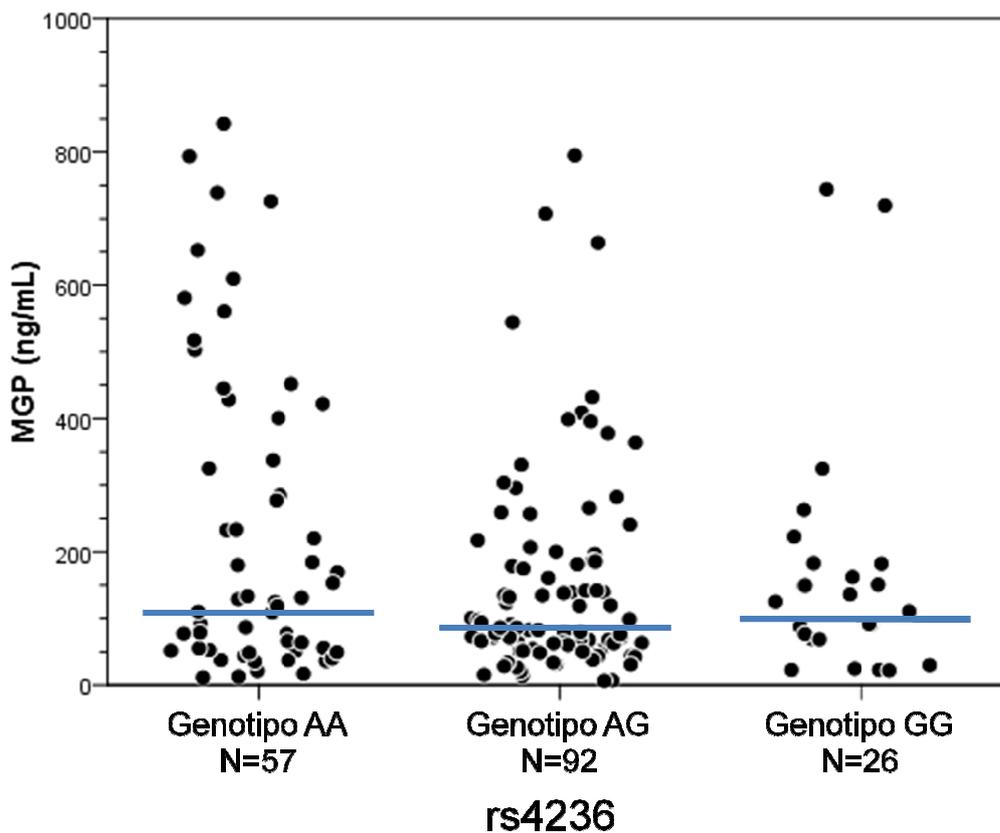


**Figura 10. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según los distintos genotipos del polimorfismo rs1800802 agrupados siguiendo un modelo de herencia dominante. Las barras horizontales indican la mediana.**

En cuanto al polimorfismo rs4236, que produce un cambio no sinónimo en la proteína (Thr102Ala), no había diferencias significativas en cuanto a los niveles de MGP en los distintos genotipos ( $p=0,15$ ) (Tabla 48 y Figura 11).

**Tabla 48. Niveles de MGP medidos en plasma de pacientes según el genotipo para el polimorfismo rs4236.**

rs4236	Mediana ng/ml	Rango intercuartílico
Genotipo AA	105,7	61,1-346,7
Genotipo AG	88,6	51,1-173,8
Genotipo GG	100,7	65,6-146,4



**Figura 11. Distribución de los niveles de MGP medidos en plasma de pacientes agrupados según los distintos genotipos del polimorfismo rs4236. Las barras horizontales indican la mediana.**

#### 5.14 Análisis multivariante de los niveles de MGP

De los análisis previos se deduce que los niveles circulantes de MGP podrían venir determinados, al menos en parte, por polimorfismos funcionales en el gen. Para confirmarlo se construyó un modelo lineal para predecir los niveles de MGP en plasma en función de los 3 polimorfismos y del estadio de ERC, y las 4 variables resultaron estadísticamente significativas (Tabla 49).

**Tabla 49. Modelo lineal multivariante de los niveles de MGP en función de los polimorfismos de MGP.**

Variable	Coefficiente	P-valor
ERC2-3	Referencia	
ERC4-5	42,5	0,094
Diálisis	286,4	<0,001
rs1800801 (GG)	Referencia	
rs1800801 (GA)	-312,2	0,032
rs1800801 (AA)	-289,9	0,035
rs1800802 (TT)	Referencia	
rs1800802 (TC)	9,5	0,067
rs1800802 (CC)	106,2	0,039
rs4236 (AA)	Referencia	
rs4236 (AG)	-14,8	0,759
rs4236 (GG)	-302,6	0,026

Se observan diferencias entre los enfermos en diálisis y los que tienen enfermedad en estadios precoces (ERC2-3) ( $p < 0,001$ ), resultando que los enfermos en diálisis tienen un valor de MGP superior en 286,4 unidades. En cuanto a los polimorfismos del gen de la MGP, en los tres casos los genotipos homocigotos para el alelo menos frecuente contribuyen a los niveles de MGP circulantes, en concreto rs1800801 y rs4236 bajando los niveles y rs1800802 aumentándolos respecto a los homocigotos para los respectivos alelos más frecuentes. En el caso del rs1800801, también el genotipo heterocigoto contribuye a unos menores niveles de MGP circulante (Tabla 49).



## **6. Discusión**



El riesgo de desarrollar calcificaciones vasculares es mayor en los pacientes con insuficiencia renal crónica que en la población normal, lo que está relacionado con una mayor probabilidad de padecer eventos cardiovasculares.<sup>106</sup> De ahí, la importancia de identificar un marcador precoz del riesgo de desarrollar calcificaciones vasculares que permita clasificar a los pacientes renales de alto riesgo, para diseñar acciones preventivas que evitarían los costosos tratamientos paliativos posteriores.

Existen alteraciones genéticas que predisponen a la calcificación.<sup>107, 108</sup> El Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI) ha publicado recientemente un catálogo con más de 14000 asociaciones encontradas polimorfismos-fenotipo con una  $p < 1 \times 10^{-5}$  donde se han rastreado al menos 100000 polimorfismos. En este catálogo se pueden encontrar estudios de asociación entre polimorfismos y calcificación vascular.<sup>109</sup> En un estudio donde se analizaron 2,5 millones de polimorfismos en 2620 individuos de sexo masculino, fumadores o con hábito tabáquico anterior, se encontró asociación entre calcificación a nivel de la arteria coronaria y el polimorfismo rs1537370 de la región cromosómica 9p21 ( $p=2,3 \times 10^{-11}$ ); el rs3825807 ( $p=6,5 \times 10^{-6}$ ) del locus ADAMTS7 y con el rs12526453 ( $p=1,0 \times 10^{-3}$ ) del locus PHACTR1.<sup>110</sup>

El estudio genético objeto de esta tesis doctoral se centró en varias proteínas de la matriz extracelular, por ser el sitio donde ocurre la calcificación (MMP-1, -2, -3 y -9; BMP-2, -4 y -7; OPN, MGP, OC y fetuina) y algunos factores de transcripción que regulan la expresión de proteínas implicadas en la calcificación (RUNX2, MSX1 y MSX2). Después de un análisis preliminar, se seleccionaron 31 polimorfismos y se buscó asociación con calcificación, tanto a nivel de las arterias femorales como carótidas.

La técnica de imagen utilizada para la detección de las calcificaciones tanto a nivel femoral como de las arterias carótidas fue la ecografía. Existen varias técnicas de imagen que pueden ser utilizadas para la determinación de calcificación vascular: CT, radiografía simple, PET, etc. La elección de la técnica puede condicionar la obtención de diferentes resultados. Es necesario, utilizar una técnica de imagen con la que podamos realizar un buen diagnóstico de la enfermedad para que exista una buena correlación con el posible marcador en estudio.

La ecografía es una técnica de imagen que permite a través de la evaluación del GIM (definido como la distancia existente entre la interfase luz-íntima y la interfase media-adventicia de la pared distal) determinar el número y el tamaño de las placas ateromatosas. Las placas son definidas como engrosamientos focales del GIM con una altura  $>1,2$  mm o superior al 50% del GIM adyacente. Además, la ecografía, también puede dar información sobre la composición de las placas. Así, las placas hiperecogénicas que producen sombra de ecos, se consideran placas calcificadas. Por otro lado, tiene la ventaja de ser una técnica disponible y barata en comparación con

técnicas más complejas como el CT o la PET, además de ser una técnica que no irradia al paciente. Sin embargo, tiene la desventaja de ser una técnica subjetiva en cuanto a que depende de la experiencia del observador en la valoración de las imágenes, es decir, es una técnica observador-dependiente. Si bien esto es cierto, en la población analizada por el proyecto NEFRONA, utilizada en esta tesis, las lecturas de las imágenes ecográficas fueron realizadas por dos observadores independientes que, además, desconocían las características clínicas de los participantes, lo que minimizó el posible error en la interpretación de las imágenes.

Existen varios trabajos que señalan al GIM como marcador de enfermedad cardiovascular en población general. Así, un aumento del GIM es considerado como factor de riesgo independiente de la incidencia de enfermedad cardiovascular.<sup>111</sup> Sin embargo, este marcador no ha sido tan estudiado, o los trabajos no muestran resultados suficientemente concluyentes, en poblaciones de alto riesgo como pueden ser los pacientes con ERC.<sup>112-114</sup>

Por otro lado, el único método cuantitativo para la determinación de calcio vascular es mediante CT utilizando el score de calcificación de Agatston, aunque también ha resultado útil la radiografía simple empleando métodos semicuantitativos, como los descritos por Adragao y Kauppila, y que han demostrado un buen poder predictivo de eventos cardiovasculares en la población con ERC.

Por otro lado, dentro de las aplicaciones de la técnica de imagen PET, utilizada en Medicina Nuclear, es posible, mediante la utilización de 18 fluoruro sódico como radiofármaco, discriminar entre macro- y micro- calcificaciones vasculares. Se puede considerar macro-calcificaciones cuando son núcleos mayores de 50  $\mu\text{m}$  y micro-calcificaciones cuando son menores de 50  $\mu\text{m}$ .<sup>115</sup> Esta clasificación es importante ya que las macro-calcificaciones suelen estar relacionadas con estabilidad de la placa mientras que las micro-calcificaciones sugieren un mayor riesgo de rotura de placa y, por lo tanto, aumento del riesgo de eventos cardiovasculares, entre otros.<sup>116</sup> En un trabajo reciente, se compararon las imágenes obtenidas del PET (utilizando como radiofármaco 18 fluoruro sódico) con las obtenidas del CT de pacientes con carótidas calcificadas que posteriormente fueron sometidos a endarterectomías carotídeas. Se observaron diferencias en la distribución de la calcificación entre las imágenes obtenidas con el PET y el CT. Así, captaciones observadas en el PET que no fueron detectadas con el CT se relacionaron con micro-calcificaciones y captaciones detectadas con el CT que en la imagen del PET se clasificaron como zonas frías correspondieron a macro-calcificaciones donde probablemente no existían o eran leves los nacimientos de núcleos micro-calcificados.<sup>117</sup> Estos hallazgos proponen al PET como técnica no sólo de cuantificación de calcificaciones vasculares sino para clasificar la estabilidad de la placa y por lo tanto valorar el riesgo de padecer eventos cardiovasculares o cerebrovasculares, entre otros. Como inconveniente, es una técnica que no está disponible en todos los centros sanitarios.

Otros factores a tener en cuenta a la hora de buscar un marcador de enfermedad son las características de la población a estudio. Es bien sabido que las calcificaciones vasculares se desarrollan de forma más precoz y en mayor porcentaje en hombres que en mujeres. Además, las mujeres en edad fértil están más protegidas debido a la regulación hormonal que ejercen los estrógenos. Muchos estudios se apoyan en estas diferencias para buscar marcadores genéticos de calcificación vascular en poblaciones de un solo sexo y evitar así posibles enmascaramientos.<sup>118</sup> Muchos trabajos donde buscan marcadores de enfermedad ateromatosa o factores de riesgo cardiovascular están segregados por sexo.<sup>119</sup> En este sentido se han encontrado asociaciones entre marcadores genéticos y calcificación vascular tanto en hombres como en mujeres por separado. Así, estudios restringidos sólo a mujeres, donde la prevalencia de calcificación vascular es menor que en hombres, se encuentran asociaciones entre calcificación coronaria y proteínas de la matriz implicadas en el proceso de calcificación.<sup>120</sup>

Sin embargo, también hay estudios que han demostrado asociaciones genéticas con el riesgo de desarrollar calcificaciones vasculares donde incluyen tanto hombres como mujeres. En nuestro trabajo, realizamos un análisis de asociación en conjunto, donde el 60,8% de la muestra estaba representado por hombres y el 39,2% por mujeres. Además, nuestros grupos de enfermedad renal, presentan menos mujeres que el grupo control. De todos los análisis realizados, sólo se encontró asociación con calcificación para dos proteínas de matriz, MGP y MMP1, y dos factores de transcripción, RUNX2 y MSX2. En concreto, para la MGP se observó que el polimorfismo rs1800801 se asoció con calcificación a nivel de la arteria femoral. La presencia del alelo raro fue más frecuente en individuos con mayor número de calcificaciones. Sin embargo, no encontramos asociación de este polimorfismo con calcificación a nivel de la arteria carótida. Estos resultados están en consonancia con otros trabajos como el estudio AXA, en el que se incluyeron 788 voluntarios sanos, 326 hombres y 462 mujeres, y se observó asociación entre el polimorfismo rs1800801 y calcificación femoral, no encontrando asociación a nivel de la arteria carótida.<sup>82</sup> Es interesante destacar que en el estudio AXA se utilizó la misma técnica para el análisis de las calcificaciones vasculares.

Hasta la fecha, ningún estudio GWAS ha encontrado asociación con polimorfismos de la MGP. La mayoría han sido realizados, fundamentalmente, sobre calcificación coronaria y en el único estudio GWAS en el que se analizó *post hoc* calcificación aórtica, el gen MGP no apareció como candidato.<sup>121-123</sup>

Al contrario que en nuestros resultados, un estudio donde se incluyeron pacientes con calcificación en arterias coronarias sin placa aterosclerótica, con calcificación en arterias coronarias con placa aterosclerótica, con calcificación en arteria aórtica sin placa aterosclerótica, no encontraron asociación entre los

polimorfismos rs1800801 y rs4236 y calcificación a nivel de la aorta y de la carótida cuando estaba en la placa de ateroma y, en cambio, sí encontraron asociación cuando la calcificación no estaba situada en la placa aterosclerótica. En este estudio, la determinación de las calcificaciones fue realizada mediante CT.<sup>124</sup> Esto pone de manifiesto la importancia de la técnica utilizada para la determinación de calcificación vascular.

Para el polimorfismo rs1800802 no encontramos asociación con calcificación en ninguno de los territorios estudiados. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio AXA.<sup>82</sup> Además, en un estudio multicéntrico donde participaron 624 individuos (308 mujeres y 316 hombres) tampoco se encontró asociación entre este polimorfismo y calcificación a nivel aórtico.<sup>125</sup> Sin embargo, encontramos asociación para ese polimorfismo y la progresión de calcificación a 24 meses, de forma que el genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente (CC) e incluso el heterocigoto (TC) eran más frecuentes entre los individuos con progresión y más específicamente entre los individuos con progresión en femoral. De hecho, se encontró que los individuos que tenían el genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente, contribuían significativamente al modelo multivariante, siendo los mayores contribuyentes a juzgar por las OR. Al estratificar por estadio de ERC, se comprueba que la contribución de este polimorfismo se mantiene específicamente en el estadio 2-3 de ERC. Esta asociación era debida principalmente a la contribución a la progresión de la calcificación en arteria femoral, como se vio en el correspondiente modelo de regresión logística. Sin embargo, en contraposición, otros autores observaron que el genotipo CC se asoció con una menor progresión de calcificación a nivel de la aorta abdominal en pacientes en hemodiálisis.<sup>126</sup> Sus frecuencias genotípicas muestran diferencias con las de nuestra cohorte, quizá por ser población japonesa. Cabe destacar que, para la determinación de calcificaciones, en este estudio se utilizó CT, lo que podría explicar las diferencias con el trabajo de esta tesis.

Respecto al polimorfismo rs4236 de MGP, en nuestro estudio no encontramos asociación con calcificación ni con progresión de la calcificación para los territorios estudiados. Sin embargo, en el estudio AXA mencionado anteriormente se encuentra asociación con calcificación a nivel femoral. Además, en otro estudio donde se incluyeron 622 individuos (tanto hombres como mujeres) que no presentaban enfermedad coronaria ni cirugía cardíaca previa, sí que se observó asociación con progresión de calcificación coronaria.<sup>127</sup>

El polimorfismo rs4242182 de MSX2 se asoció con mayor número de calcificaciones en las dos arterias, con diferencias significativas entre el genotipo TT y CT. Este polimorfismo produce un cambio de aminoácido Met129Thr y se ha asociado con problemas en el desarrollo craneal.<sup>128</sup> Estratificando la población por estadio de ERC en un análisis multivariante, este polimorfismo mantiene la contribución a la

calcificación con una OR=2,32 para el genotipo heterocigoto, aunque sólo en los pacientes en estadio 2-3, es decir, en estadios tempranos de la enfermedad renal. En el análisis multivariante también se pierde la contribución del género, con una aportación más importante del hecho de ser fumador. Este resultado sugiere que este polimorfismo podría considerarse un marcador precoz de calcificación vascular en la ERC.

Hay que tener en cuenta, que en nuestro trabajo se observó una mayor frecuencia de calcificaciones en la arteria femoral que en la carótida en todos los grupos de individuos destacando un 5,1% de individuos sanos con calcificación en la femoral, que va hasta un 24,2% en los pacientes en diálisis. En carótida, en cambio, la frecuencia va desde un 0,4% en individuos controles hasta un 18,1% en pacientes en diálisis. Estos porcentajes diferentes pueden influir en las asociaciones encontradas.

De los genes con polimorfismos potencialmente asociados a calcificación vascular, sólo los de MGP y MMP1 codifican proteínas que aparecen en la circulación. Por ello, se determinaron los niveles circulantes de ambas en muestras de plasma. En el caso de MMP1 no se obtuvieron niveles detectables en ninguno de los grupos estudiados y por eso no se pudieron hacer análisis de asociación. Sin embargo, existen trabajos donde observan mayor concentración plasmática de MMP (-1, -3 y -7) en pacientes con un GIM carotídeo aumentado en comparación con pacientes con grosores normales.<sup>71</sup>

Los niveles de MGP fueron significativamente más altos según aumenta el estadio de enfermedad renal. En este sentido, varios estudios, observan niveles más altos de MGP en estadios avanzados de la enfermedad frente a los encontrados en estadios tempranos.<sup>129, 130</sup> Estos trabajos determinan niveles de proteína en su forma descarboxilada, es decir, en su forma inactiva, lo que puede sugerir que en nuestras muestras hubiera un alto porcentaje de forma inactiva en los estadios de enfermedad renal avanzada.

Por otra parte, también encontramos niveles más altos de MGP circulante en los pacientes calcificados, especialmente en arteria femoral. Varios estudios no encuentran asociación entre niveles de MGP y calcificación.<sup>92, 93</sup> Sin embargo, existen estudios apuntan una asociación positiva entre los niveles plasmáticos de MGP descarboxilada (forma inactiva) y el aumento de calcificación vascular.<sup>129</sup> En otros trabajos, se observa una asociación inversa entre concentración de MGP total y aumento de calcificación coronaria.<sup>131</sup> Se podría pensar que un inhibidor de la calcificación, como la MGP, debería de estar disminuido en pacientes con mayor número de calcificaciones, cuando es cuantificado en plasma. Sin embargo, un incremento de la concentración total de MGP no tiene que reflejar necesariamente un aumento de las formas metabólicamente activas. Además, en otro trabajo, se encuentran niveles de MGP más bajos en pacientes con calcificaciones sin placa

aterosclerótica, a nivel aórtico y carotideo pero más altos en pacientes con placa aterosclerótica en las mismas arterias, comparando esos niveles con los encontrados en sujetos controles sanos.<sup>93</sup>

Por otro lado, cuando analizamos la contribución de los niveles de MGP a la calcificación en un modelo multivariante observamos que se pierde la asociación. Además, llama la atención que se pierden las contribuciones de todos los factores de riesgo excepto la edad. Estos resultados pueden ser debidos al pequeño número de individuos en los que se analizaron niveles de MGP circulante y además eran todos pacientes. Se analizó la contribución de MGP, incluyendo esta variable en un modelo multivariante ya construido previamente a partir de un número muy alto de valores de potenciales factores de riesgo que incluían, además, a sujetos controles. Quizás se debería haber construido un modelo multivariante considerando sólo los valores de los posibles factores de riesgo de los pacientes en los que se había determinado la concentración plasmática de MGP.

Además, se estudió la posible asociación entre los niveles de MGP circulante y los distintos polimorfismos estudiados en el gen. Los 3 polimorfismos estudiados se asociaron con los niveles de la proteína. Tanto para el polimorfismo rs1800801 situado en la región promotora del gen, como para el rs4236, los portadores del alelo menos frecuente presentaban niveles más bajos de MGP circulante, aunque no se había encontrado asociación de estos polimorfismos con calcificación en ninguno de los territorios estudiados. Resultados similares se encontraron en el estudio de Crosier y col. que encuentran niveles de esta proteína más bajos asociados con el alelo minoritario de estos polimorfismos en una población sin enfermedad renal con una edad entre 60 y 80 años.<sup>92</sup>

En cuanto al polimorfismo rs1800802, situado también en la región promotora del gen, se observó que los individuos homocigotos para el alelo menos frecuente, que era el genotipo que había resultado asociado con mayor progresión de calcificación, presentaban valores significativamente más altos de MGP que el resto de genotipos. Esto sugeriría que los valores circulantes de MGP podrían ser utilizados como marcadores de progresión en población con ERC, además del polimorfismo rs1800802. Sin embargo, estudios en otras poblaciones no encontraron asociación.<sup>92</sup>

En cuanto a la etiología de enfermedad renal, en nuestro estudio se incluyeron solo pacientes cuya enfermedad estaba causada por nefropatía glomerular, enfermedad vascular, nefropatía diabética, enfermedades metabólicas y nefropatía tubulointersticial, descartando las debidas a fármacos o tóxicos, las enfermedades quísticas, las displasias o hipodisplasias renales, nefropatías hereditarias, mieloma múltiple, amiloidosis y cualquier tipo de tumor o enfermedad sistémica que podría enmascarar una posible causa genética de la calcificación vascular. No se tuvo en cuenta las diferentes etiologías como posibles factores de riesgo independientes de

calcificación vascular. Tampoco se estudió asociación entre los polimorfismos candidatos y dichas etiologías.

Además, en este trabajo, no se ha tenido en cuenta las posibles interacciones que pueden causar los tratamientos farmacológicos pautados en los individuos durante el estudio. Entre estos tratamientos destacan: tratamientos con calcimiméticos (cinacalcet); tratamientos con derivados de formas activas de la vitamina D (calcitriol, colecalciferol), tratamientos con quelantes de fósforo, tratamientos con antiagregantes, tratamiento con estatinas y tratamientos hipotensores. Todos ellos, son susceptibles de interferir en la evolución natural que seguirían las calcificaciones vasculares en los sujetos a estudio.

Así, dado que niveles elevados de fósforo inician, de forma activa, la calcificación vascular, es lógico pensar que los captadores de fósforo pueden llegar a reducir las calcificaciones vasculares. En un estudio donde se administró sevelamer (un captador de fósforo) a pacientes renales en estadio 4 y 5, se redujo la calcificación a nivel aórtico y/o mitral en más del 70% de los casos. Además la progresión de enfermedad renal en estos pacientes fue más lenta.<sup>132</sup>

Los tratamientos hipolipemiantes, como la administración de estatinas, también pueden influir en el desarrollo de calcificaciones vasculares. Las estatinas son los fármacos de elección para el tratamiento de la dislipemia. Además, han demostrado que son útiles en la prevención de la enfermedad cardiovascular. Los estudios descritos hasta ahora, sobre el uso de estatinas en el tratamiento y ralentización de la progresión de la enfermedad aterosclerótica apuntan a que estos fármacos son eficaces en estadios tempranos de la enfermedad no quedando tan demostrada su eficacia en estadios avanzados.<sup>133, 134</sup> Por otro lado, la utilización de antiagregantes como la vitamina K pueden modificar el estado de la proteína MGP. Niveles elevados de vitamina K, pueden inducir que la proteína se encuentre en su estado activo de  $\gamma$ -carboxilación pudiendo afectar a las concentraciones totales de MGP plasmáticas.

Si bien parecen necesarios más estudios en esta área, los resultados epidemiológicos y experimentales discutidos son alentadores y refuerzan la necesidad de investigar sobre biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz y un tratamiento más específico de las alteraciones del metabolismo óseo y vascular. Como se acaba de explicar, es sabido que las variaciones genéticas pueden influir en las alteraciones del metabolismo óseo y mineral. Por lo tanto, es razonable postular que variantes en los genes implicados en estos procesos puedan ser utilizadas como un indicador como de la progresión de la calcificación vascular.<sup>135</sup>



## **7. Conclusiones**



1. En los pacientes con enfermedad renal es más frecuente la calcificación a nivel de arteria femoral que de carótida, con un 24% frente a un 18% en pacientes en diálisis.
2. En nuestra muestra de población sana también se encontró un 5% de personas con calcificación vascular, mayoritariamente en arteria femoral.
3. De los 31 polimorfismos analizados, solo se encontraron asociaciones estadísticamente significativas para 5 de los polimorfismos pertenecientes a 4 de los genes candidatos: MGP, MMP1, RUNX2 y MSX2.
4. De los tres polimorfismos cuyas frecuencias eran diferentes en individuos con y sin calcificación, solo rs4242182 del gen del factor de transcripción MSX2 se asoció independientemente a la calcificación vascular presentando una OR=2,3 para el genotipo heterocigoto en pacientes en estadios tempranos de enfermedad renal.
5. El polimorfismo rs1800802 situado en la región promotora del gen MGP, se asoció de forma independiente con progresión de la calcificación total en estadios tempranos de la enfermedad renal, especialmente por la contribución debida a la asociación con progresión en arteria femoral. Con una OR=4,4 para el genotipo homocigoto del alelo menos frecuente, es la variable que aporta una OR más alta en nuestro modelo.
6. Ninguno de los polimorfismos estudiados se asoció con enfermedad renal, utilizando como variable dependiente el valor del filtrado glomerular calculado como MDRD4, siendo el mayor contribuyente a este último la presencia de hipertensión.
7. Los niveles circulantes de MGP fueron significativamente más elevados en los grupos de enfermedad renal a medida que progresa la enfermedad, presentando una correlación inversa estadísticamente significativa con el filtrado glomerular.
8. Los niveles circulantes de MGP fueron significativamente más altos en los pacientes con calcificación en la arteria femoral comparados con los no calcificados. Sin embargo, esta variable no contribuyó a predecir calcificación cuando se incluyen en el modelo los factores de riesgo independientes observados en nuestro estudio.
9. En un modelo lineal multivariante, tanto los tres polimorfismos de MGP analizados como el estadio de enfermedad renal contribuyeron independientemente a la predicción de los niveles circulantes de MGP.

10. Hemos identificado polimorfismos en los genes MSX2 y MGP que se asocian independientemente con calcificación vascular en estadios tempranos de la enfermedad renal y que, por tanto, podrían tenerse en cuenta a la hora de predecir el riesgo de calcificación de un paciente. Más estudios en otros genes y marcadores y en otras poblaciones son necesarios para conseguir una predicción lo más temprana posible, antes de que la calcificación empiece a producirse.

## **8. Referencias**



1. Shaw LJ, *et al.* Coronary artery calcium as a measure of biologic age. *Atherosclerosis*;188:112-9.
2. Renneberg RJMW, *et al.* Arterial calcifications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2010;14:2203-10.
3. Ankle Brachial Index C, *et al.* Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA* 2008;300:197-208.
4. Resnick HE, *et al.* Relationship of high and low ankle brachial index to all-cause and cardiovascular disease mortality: the Strong Heart Study. *Circulation* 2004;109:733-9.
5. Smiley CM, *et al.* Calciphylaxis in moderate renal insufficiency: changing disease concepts. *Am J Nephrol* 2000;20:324-8.
6. Shanahan CM. Vascular calcification--a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1166-9.
7. Micheletti RG, *et al.* Calcification of the internal elastic lamina of coronary arteries. *Mod Pathol* 2008;21:1019-28.
8. Shanahan CM, *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-76.
9. Edmonds ME, *et al.* Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284:928-30.
10. Valdivielso JM. [Vascular calcification: types and mechanisms]. *Nefrologia* 2011;31:142-7.
11. Duhn V, *et al.* Breast arterial calcification: a marker of medial vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:377-82.
12. Benz K, *et al.* Vascular inflammation and media calcification are already present in early stages of chronic kidney disease. *Cardiovasc Pathol* 2017;27:57-67.
13. Akbari A, *et al.* Canadian Society of Nephrology commentary on the KDIGO clinical practice guideline for CKD evaluation and management. *Am J Kidney Dis* 2015;65:177-205.
14. Coresh J, *et al.* Evidence for increased cardiovascular disease risk in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:73-81.
15. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, *et al.* Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* 2003;42
16. Gerstein HC MJ, Yi Q, *et al.* . doi:10.1001/jama.286.4.421. Albuminuria and Risk of Cardiovascular Events, Death, and Heart Failure in Diabetic and Nondiabetic Individuals. *JAMA*. 2001; ;286(4):421-426.
17. Otero A, *et al.* Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia* 2010;30:78-86.
18. Cannata-Andia JB, *et al.* Use of phosphate-binding agents is associated with a lower risk of mortality. *Kidney Int* 2013;84:998-1008.
19. J. Craig Longenecker\* jC, Neil R. Powe. Traditional Cardiovascular Disease Risk Factors in Dialysis Patients Compared with the General Population: The CHOICE Study. *J. Am Soc Nephrol* 2002;13
20. Cannata-Andia JB, *et al.* Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006;17:S267-73.
21. Wilson PWF, *et al.* Abdominal Aortic Calcific Deposits Are an Important Predictor of Vascular Morbidity and Mortality. *Circulation* 2001;103:1529-34.
22. Kiel DP, *et al.* Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcified tissue international* 2001;68:271-6.

23. Russo D, *et al.* Coronary artery calcification in patients with CRF not undergoing dialysis. *Am J Kidney Dis* 2004;44:1024-30.
24. Goodman WG, *et al.* Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *New England Journal of Medicine* 2000;342:1478-83.
25. Panuccio V, *et al.* Heart valve calcifications, survival, and cardiovascular risk in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2004;43:479-84.
26. Reilly MP, *et al.* Coronary artery calcification and cardiovascular risk factors: impact of the analytic approach. *Atherosclerosis* 2004;173:69-78.
27. Yuan J, *et al.* Prevalence and risk factors for cardiovascular disease among chronic kidney disease patients: results from the Chinese cohort study of chronic kidney disease (C-STRIDE). *BMC Nephrol* 2017;18:23.
28. Agatston AS, *et al.* Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827-32.
29. Bellasi A, *et al.* Correlation of simple imaging tests and coronary artery calcium measured by computed tomography in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006;70:1623-8.
30. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009:S1-130.
31. Kauppila LI, *et al.* New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* 1997;132:245-50.
32. Inoue T, *et al.* Aortic arch calcification evaluated on chest X-ray is a strong independent predictor of cardiovascular events in chronic hemodialysis patients. *Heart Vessels* 2012;27:135-42.
33. Dwivedi G, *et al.* Predictive value of cardiac computed tomography and the impact of renal function on all cause mortality (from Coronary Computed Tomography Angiography Evaluation for Clinical Outcomes). *Am J Cardiol* 2013;111:1563-9.
34. Karohl C, *et al.* Noninvasive imaging for assessment of calcification in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:567-77.
35. Doherty TM, *et al.* Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11201-6.
36. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2959-64.
37. de Oliveira RB, *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *J Bras Nefrol* 2013;35:147-61.
38. Cozzolino M, *et al.* Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:429-36.
39. Goldsmith D RE, Covic A. . 2004;. Vascular calcification: a stiff challenge for the nephrologist. *Kidney Int.* 2004;66
40. Block GA, *et al.* Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int* 2005;68:1815-24.
41. Ueland T GL, Dahl CP, Aukrust P, Aakhus S, Solberg OG, *et al.* Undercarboxylated matrix Gla protein is associated with indices of heart failure and mortality in symptomatic aortic stenosis. . *J Intern Med.* 2010;268:483-92.
42. Koos R, *et al.* Relation of circulating Matrix Gla-Protein and anticoagulation status in patients with aortic valve calcification. *Thromb Haemost* 2009;101:706-13.
43. Bostrom KI. Cell differentiation in vascular calcification. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 2:69-74.
44. Schoppet M, *et al.* Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: what's circulating? *Kidney Int* 2008;73:384-90.
45. Luo G, *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.

46. Abedin M, *et al.* Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1161-70.
47. Price PA, *et al.* Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998;18:1400-7.
48. Yao Y, *et al.* Matrix Gla protein deficiency causes arteriovenous malformations in mice. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:2993-3004.
49. Fisher LW, *et al.* Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:460-5.
50. Xie Y, *et al.* Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001;60:1645-57.
51. Giachelli C. Vascular calcifications mechanisms , 2004: 15: 2959-2964. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2959-64.
52. Reinholt FP, *et al.* Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4473-5.
53. Jono S, *et al.* Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research* 2000;87:E10-7.
54. Carreira AC, *et al.* Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 2014;93:335-45.
55. Kawamura C, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* 2000;96:2005-11.
56. Bunyaratavej P, *et al.* Bone morphogenetic proteins secreted by breast cancer cells upregulate bone sialoprotein expression in preosteoblast cells. *Exp Cell Res* 2000;260:324-33.
57. Hruska KA, *et al.* Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation research* 2005;97:105-14.
58. Cheng SL, *et al.* MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003;278:45969-77.
59. Shao JS, *et al.* Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005;115:1210-20.
60. Panizo S, *et al.* RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circulation research* 2009;104:1041-8.
61. Krishnan V, *et al.* Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202-9.
62. Engelse MA, *et al.* Vascular calcification: expression patterns of the osteoblast-specific gene core binding factor alpha-1 and the protective factor matrix gla protein in human atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2001;52:281-9.
63. Ducy P, *et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
64. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:162-72.
65. Nagase H, *et al.* Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-73.
66. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
67. Raffetto JD KR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008;346-59.
68. Harper E, *et al.* The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry* 1971;10:3035-41.
69. Gupta SP. Matrix metalloproteinase inhibitors: specificity of binding and structure-activity relationships. *EXS* 2012;103:v-vi.
70. Chung AW, *et al.* Upregulation of matrix metalloproteinase-2 in the arterial vasculature contributes to stiffening and vasomotor dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Circulation* 2009;120:792-801.

71. Gaubatz JW, *et al.* Association of circulating matrix metalloproteinases with carotid artery characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1034-42.
72. Osnabrugge RL, *et al.* Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1002-12.
73. Chen D, *et al.* Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* 2004;22:233-41.
74. Freedman BI, *et al.* Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) gene polymorphisms are associated with inverse relationships between vascular calcification and BMD: the Diabetes Heart Study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2009;24:1719-27.
75. Stykarsdottir U, *et al.* Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS biology* 2003;1:E69.
76. Zheng HF, *et al.* WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet* 2012;8:e1002745.
77. Koller DL, *et al.* Meta-analysis of genome-wide studies identifies WNT16 and ESR1 SNPs associated with bone mineral density in premenopausal women. *J Bone Miner Res* 2013;28:547-58.
78. Korvala J, *et al.* Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet* 2012;55:515-9.
79. Yamada Y, *et al.* Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density. *Matrix Biol* 2002;21:389-92.
80. Yamada Y, *et al.* Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 gene with bone mineral density in Japanese men. *Metabolism* 2004;53:135-7.
81. Tsukamoto K, *et al.* Association of bone mineral density with polymorphism of the human matrix Gla protein locus in elderly women. *Journal of bone and mineral metabolism* 2000;18:27-30.
82. Herrmann SM, *et al.* Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000;20:2386-93.
83. Brancaccio D, *et al.* Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients. *American journal of nephrology* 2005;25:548-52.
84. Yoshikawa K, *et al.* Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clinical and experimental nephrology* 2013
85. Lander ES, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
86. Schmutz J, *et al.* Quality assessment of the human genome sequence. *Nature* 2004;429:365-8.
87. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 2011;470:187-97.
88. St Hilaire C, *et al.* NT5E mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med* 2011;364:432-42.
89. Companioni O, *et al.* [Genetic variants, cardiovascular risk and genome-wide association studies]. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:509-14.
90. Girelli D, *et al.* Genetic architecture of coronary artery disease in the genome-wide era: implications for the emerging "golden dozen" loci. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:671-82.
91. Tunon-Le Poutel D, *et al.* Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification. *Osteoporos Int* 2014;25:1237-46.

92. Crosier MD, *et al.* Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009;55:59-65.
93. Wang Y, *et al.* Common genetic variants of MGP are associated with calcification on the arterial wall but not with calcification present in the atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6:271-8.
94. O'Neill TW, *et al.* The prevalence of vertebral deformity in European men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1010-8.
95. Tunon-Le Poutel D, *et al.* Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification. *Osteoporos Int* 2013
96. Newby AC, Johnson JL. Genetic strategies to elucidate the roles of matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaque growth and stability. *Circ Res* 2005;97:958-60.
97. Roman-Garcia P, *et al.* Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis* 2009;20:383-6.
98. Solache-Berrocal G1 BA, 4, Martín M3, Román-García P1, Llosa JC2, Naves-Díaz M1, Cannata-Andía JB1, Rodríguez I1 Asociación del polimorfismo 1G>2G de la MMP1 con calcificación de la válvula aórtica. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2016
99. McGeachie M, *et al.* Integrative predictive model of coronary artery calcification in atherosclerosis. *Circulation* 2009;120:2448-54.
100. Dhore CR, *et al.* Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1998-2003.
101. Junyent M, *et al.* [Usefulness of imaging techniques and novel biomarkers in the prediction of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease in Spain: the NEFRONA project]. *Nefrología* 2010;30:119-26.
102. Coll B, *et al.* Large artery calcification on dialysis patients is located in the intima and related to atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:303-10.
103. Gabriel S, *et al.* SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet* 2009;Chapter 2:Unit 2 12.
104. R: A language and environment for statistical computing [Manual de software informático]. Viena, Austria. <http://www.r-project.org>; ISBN 3-900051-07-0
105. Pohlert T. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R package. <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR> 2014
106. Wilson PW, *et al.* Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 2001;103:1529-34.
107. Parhami F, *et al.* Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997;17:680-7.
108. Gerdhem P, Obrant KJ. Effects of cigarette-smoking on bone mass as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry and ultrasound. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2002;13:932-6.
109. Welter D, *et al.* The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D1001-6.
110. van Setten J, *et al.* Genome-wide association study of coronary and aortic calcification implicates risk loci for coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2013;228:400-5.
111. Lorenz MW, *et al.* Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115:459-67.
112. Desbien AM, *et al.* Kidney function and progression of carotid intima-media thickness in a community study. *Am J Kidney Dis* 2008;51:584-93.

113. Ekart R, *et al.* Predictive value of carotid intima media thickness in hemodialysis patients. *Artif Organs* 2005;29:615-9.
114. Liu JH, *et al.* Subclinical peripheral artery disease in patients undergoing peritoneal dialysis: risk factors and outcome. *Perit Dial Int* 2009;29:64-71.
115. Kelly-Arnold A, *et al.* Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:10741-6.
116. Hutcheson JD, *et al.* Small entities with large impact: microcalcifications and atherosclerotic plaque vulnerability. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:327-32.
117. Irkle A, *et al.* Identifying active vascular microcalcification by (18)F-sodium fluoride positron emission tomography. *Nat Commun* 2015;6:7495.
118. Osako MK, *et al.* Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res* 2010;107:466-75.
119. Martin M, *et al.* Association of serum phosphorus with subclinical atherosclerosis in chronic kidney disease. Sex makes a difference. *Atherosclerosis* 2015;241:264-70.
120. Dalmeijer GW, *et al.* Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women. *J Nutr Biochem* 2013;24:624-8.
121. van Setten J, *et al.* Genome-wide association study of coronary and aortic calcification implicates risk loci for coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2013;228:400-5.
122. O'Donnell CJ, *et al.* Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation* 2011;124:2855-64.
123. Ferguson JF, *et al.* Candidate gene association study of coronary artery calcification in chronic kidney disease: findings from the CRIC study (Chronic Renal Insufficiency Cohort). *Journal of the American College of Cardiology* 2013;62:789-98.
124. Wang Y, *et al.* Common genetic variants of MGP are associated with calcification on the arterial wall but not with calcification present in the atherosclerotic plaques. *Circulation. Cardiovascular genetics* 2013;6:271-8.
125. Tunon-Le Poulstel D, *et al.* Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2014;25:1237-46.
126. Yoshikawa K, *et al.* Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:882-9.
127. Cassidy-Bushrow AE, *et al.* Matrix gla protein gene polymorphism is associated with increased coronary artery calcification progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:645-51.
128. Ciurea AV, Toader C. Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J Med Life* 2009;2:5-17.
129. Schurgers LJ, *et al.* The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:568-75.
130. Kurnatowska I, *et al.* Plasma Desphospho-Uncarboxylated Matrix Gla Protein as a Marker of Kidney Damage and Cardiovascular Risk in Advanced Stage of Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 2016;41:231-9.
131. Jono S, *et al.* Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004;91:790-4.
132. Di Lullo L, *et al.* Progression of cardiac valve calcification and decline of renal function in CKD patients. *J Nephrol* 2013;26:739-44.
133. Parolari A, *et al.* Do statins improve outcomes and delay the progression of non-rheumatic calcific aortic stenosis? *Heart* 2011;97:523-9.

134. Wierzbicki AS, *et al.* Aortic stenosis and lipids: does intervention work? *Curr Opin Cardiol* 2010;25:379-84.
135. Richards JB, *et al.* Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008;371:1505-12.