Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Desenvolupament d'un biomarcador per l'avaluació de la capacitat cristal·litzadora del plasma

Clara Reynés Capó

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 41572146Z

Treball tutelat per Miguel David Ferrer Reynés
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

☐ S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:
Malaltia renal crònica, calcificació cardiovascular, cristal·lització, hidroxiapatita, biomarcador.

ÍNDEX

1. RESUM pàg 4
2. ABREVIACIONS pàg 4
3. INTRODUCCIÓ pàg 5
   - 3.1 Malaltia renal crònica pàg 5
   - 3.2 Epidemiologia de la malaltia renal crònica pàg 6
   - 3.3 Teràpia renal substitutiva pàg 7
   - 3.4 Conseqüències metabòliques de la malaltia renal crònica pàg 8
   - 3.5 Calcificació cardiovascular pàg 11
   - 3.6 Tractaments de la calcificació cardiovascular pàg 13
   - 3.7 Mesures de la calcificació cardiovascular pàg 14
   - 3.8 Biomarcadors sanguinis pàg 14
4. OBJECTIUS I DISSENY EXPERIMENTAL pàg 17
5. MATERIALS I MÈTODES pàg 18
   - 5.1 Mostra de sang pàg 18
   - 5.2 Reactius emprats pàg 18
   - 5.3 Estudis de cristal·lització pàg 18
   - 5.4 Determinació de l'eficàcia dels inhibidors pàg 20
   - 5.5 Caracterització de les partícules cristal·litzades pàg 21
   - 5.6 Anàlisi estadística pàg 22
6. RESULTATS I DISCUSSIÓ pàg 23
   - 6.1 Estudis de cristal·lització pàg 23
   - 6.2 Determinació de l'eficàcia dels inhibidors pàg 27
   - 6.3 Caracterització de les partícules cristal·litzades pàg 28
7. CONCLUSIÓ pàg 30
8. BIBLIOGRAFIA pàg 31

1. RESUM

La malaltia renal crònica (CKD) és una patologia cada cop més present en la població mundial. D'aquesta deriven múltiples complicacions, a causa de la desregulació del metabolisme de calci i fosfat, entre les quals destacam la calcificació vascular, el que contribueix a augmentar la mortalitat en pacients en diàlisi. Es volgué optimitzar un mètode per detectar la susceptibilitat plasmàtica a la calcificació, prèviament establert, per això es procedí a la inducció de la formació dels cristalls de fosfat càlcic i la posterior caracterització d'aquests; així com també es provaren diferents inhibidors (pirofosfat sòdic (PPi) i tiosulfat sòdic (STS)) per comprovar que el mètode és sensible a la capacitat inhibidora de certes substàncies. El mètode desenvolupat va resultar ser reproduïble i sensible a l'increment i la inhibició de la cristal·lització. A l'hora de caracteritzar els cristalls, es va observar que no eren les partícules calciproteiques (CPPs) que s'havien observat en l'article de referència.

2. ABREVIACIONS

CaR: Receptor sensible al calci.

CKD: Malaltia renal crònica.

CPPs: Partícules calciproteiques.

CVC: Calcificació cardiovascular.

FEp: Excreció fraccional de fosfat.

FGF23: Factor de creixement de fibroblasts.

FRS: Framingham risk score.

GFR: Ràtio de filtració glomerular.

HAP: Hidroxiapatita.

MGP: Proteïna de la matriu-gla.

OPG: Osteoprotegerina.

PPi: Pirofosfat sòdic.

PTH: Hormona paratiroide.

Scl: Esclerostina.

STS: Tiosulfat sòdic.

3. INTRODUCCIÓ

3.1 Malaltia renal crònica

La fallada renal és un problema a nivell mundial, que amb el temps va augmentant la seva incidència i prevalença, i pot conduir a moltes complicacions, com ara una pèrdua completa de la funció dels ronyons, complicacions cardiovasculars, fins i tot pot arribar a una mort prematura.[1]

La "*National Kidney Fundation (NKF) Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI) Advisory Board*" aprovà, al 2000, la creació d'unes guies de pràctiques clíniques per poder definir i classificar els diferents estadis de la malaltia renal crònica (CKD). Es pot definir així la CKD com un dany renal d'una duració de mínim 3 mesos, amb anormalitats estructurals o funcionals del ronyó i que pot presentar, o no, una disminució del ràtio de filtració glomerular (GFR); també es pot definir com un GFR inferior a 60 mL/min/1,73 m^2 durant un mínim de 3 mesos, amb o sense dany renal.[2]

Hi ha diversos factors de risc, com podrien ser una l'anèmia, la hipertensió, la malnutrició, les malalties òssies, una menor qualitat de vida, la diabetis, la naturalesa africana o americana, l'avançada edat, etc., que poden promoure un dany a nivell renal, i que si no es tracta provocarà una disminució del GFR. Aquest fet acabaria en una fallada renal crònica, la qual només es pot tractar amb diàlisi o amb trasplantament. Altres factors de risc com el lupus, el ronyó poliquístic, la glomerulonefritis o una infecció vírica són menys habituals.[1,3]

En la CKD es poden diferenciar diferents estadis segons el GFR (***Taula 1***). Normalment, les primeres etapes de la CKD (estadis 1 i 2) són asimptomàtiques, encara que hi ha un risc important de la progressió del dany renal. En els estadis 3 i 4 es comença a observar el deteriorament de la funció renal, i és finalment a l'estadi 5 quan el ronyó ja no és funcional per si sol, i ja es necessita un tractament més agressiu, com el trasplantament o la diàlisi.[3]

***Taula 1**. Adaptació de l'article "KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification".[2] Descripció i classificació dels diferents estadis de la CKD segons el GFR.*

Estadi	Descripció	GFR (mL/min/1,73m^2)
1	Dany renal amb GFR normal o elevat	≥90
2	Dany renal amb un GFR lleugerament disminuït	60-89
3	Descens moderat del GFR	30-59
4	Important descens del GFR	15-29
5	Fallada renal	<15 (o diàlisi)

Tot i això, poca gent arriba a morir per la pròpia deficiència de la funció renal, sinó que durant la malaltia els pacients solen sofrir diverses complicacions, on les més destacades solen ser: l'anèmia, problemes ossis i cardiovasculars. D'aquestes, les malalties cardiovasculars són les que provoquen una mortalitat major.[3] Si els pacients són diagnosticats en les primeres etapes de la malaltia poden tractar-se per evitar aquestes complicacions i retardar la progressió de la CKD.

La mortalitat relacionada amb aquesta malaltia ha anat augmentant, convertint-se en una de les primeres causes de mort a nivell mundial, juntament amb el càncer i les malalties cardiovasculars.

La incidència i prevalença de pacients amb CKD que arriben a l'estadi 5 també va augmentant, incrementant-se la necessitat de trasplantaments, el que suposa una gran despesa econòmica, i els resultats no sempre són bons, ja que s'ha observat un gran nombre de rebutjos.[4]

3.2 Epidemiologia de la malaltia renal crònica

La "*Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.)*" va dur a terme un estudi epidemiològic de la CKD a Espanya en persones majors de 20 anys i els resultats foren els observats en la ***taula 2 i 3.*** Es pot veure com l'edat mitjana de participants es troba al voltant dels 49,5 anys, ja que és en l'edat d'entre 40 i 64 anys on predomina la CKD.

En els estudis realitzats s'ha observat com un 90,8% dels participants no pateix la malaltia, en front del 9,2% que si presenta CKD. Dels participants que sí presenten la malaltia, la majoria es troba en l'estadi 3, essent els estadis 4 i 5 els minoritaris. Independentment de l'edat, molts dels factors de risc de la CKD són modificables: la hipertensió, la diabetis mellitus, la obesitat, la dislipèmia i el tabaquisme.

***Taula 2**. Estudi epidemiològic realitzat a Espanya, en una població major de 20 anys. Es diferencien tres rangs d'edats, els dos sexes, la localització i les diferents ètnies. Adaptació de l'article "Prevalence of chronic renal disease in Spain: Results of the EPIRCE study"[5]. [a]Les estimacions de la freqüència es calculen sobre la mostra ponderada.*

	Nº participants	(%)[a]
Anys (mitjana)	**2746**	**49,5**
20-39	885	36,5
40-64	1283	37,7
>64	578	25,8
Sexe		
Home	1148	47,4
Dona	1598	52,6
Localització		
Urbà	1805	66,1
Rural	941	33,9
Ètnia	**2695**	
Caucàsica	2669	99,1
Africana	13	0,46
Asiàtica	1	0,04
Altres	12	0,44

***Taula 3.** Prevalença dels diferents estadis de la CKD en la població espanyola. Els diferents estadis es classifiquen segons el GFR, com s'ha comentat en la taula 1. Els resultats es donen en %. Adaptació de l'article "Prevalence of chronic renal disease in Spain: Results of the EPIRCE study".[5]*

	Població espanyola	Prevalença segons el GFR (%)					
	N	Normal	Estadi 1	Estadi 2	Estadi 3	Estadi 4	Estadi 5
Total	2746	90,8	0,99	1,3	6,5	0,27	0,03

3.3 Teràpia renal substitutiva

El tractament per aquesta malaltia ha de ser personalitzat en cada cas, segons l'estadi en que es troba el pacient, i pot incloure: prevenció i tractament de malalties cardiovasculars, prevenció de complicacions renals, trasplantament de ronyó i diàlisi.[2]

Per determinar que el pacient es troba en el darrer estadi de la CKD, és necessària la presència de dos criteris: per una banda la presència d'urea en sang, i per altra la necessitat

d'una teràpia renal substitutiva. Aquesta darrera és crònica, i inclou la diàlisi i el trasplantament renal. Per una part, el trasplantament es durà a terme en el moment en que hi hagi un ronyó disponible compatible i el pacient es trobi en les condicions adequades.[6]

Per altra part, la diàlisi és un procés amb el qual s'extreuen les toxines i l'excés d'aigua de la sang. S'empra com a teràpia renal substitutiva en pacients que presenten danys renals, com la CKD, proporcionant un reemplaçament artificial per la funció de filtració del ronyó. Si bé es tracta d'un tractament indispensable pel pacient, ja que s'aplica quan el ronyó no és capaç de realitzar la seva funció, també és arriscat i pot haver-hi complicacions com hemorràgies, hipotensió i arítmies a causa dels canvis bruscs de volums. Tot i això, s'ha de dir que l'esperança de vida d'un pacient en diàlisi és d'uns 2-3 any, i que la qualitat de vida és molt baixa.[4,7,8]

Addicionalment, els pacients dialitzats sofreixen des-regulacions en el metabolisme mineral[9] i la diàlisi no millora la situació de les malalties cardiovasculars. De fet, els pacients en diàlisi moren entre 10 i 30 vegades més per causes cardiovasculars.[3]

3.4 Conseqüències metabòliques de la malaltia renal crònica

De les diverses alteracions metabòliques que es poden donar, trobam l'hiperparatiroidisme secundari. Es tracta d'una alteració en el metabolisme ossi i mineral, resultant de la CKD, sobretot en pacients que es troben en estadis avançats de la malaltia (estadi 3, 4 o 5), i és necessari el seu ràpid diagnòstic per evitar la progressió dels problemes ossis i possibles problemes cardíacs.

La hormona paratiroide (PTH), secretada per la glàndula paratiroide, ajuda a controlar l'equilibri entre la concentració de calci i fòsfor en el cos; de fet, aquesta hormona regula el nivell de calci en sang, l'absorció de calci per part de l'intestí i l'excreció de calci per l'orina, regulant així altres minerals i metabòlits relacionats amb el metabolisme ossi, com poden ser el fòsfor i la vitamina D.

L'hiperparatiroidisme secundari en CKD és a causa d'una hiperproducció de PTH, causada per les variacions en el metabolisme ossi resultant de la insuficiència renal. Entre aquestes variacions s'observa una deficiència en vitamina D i una hiperexcreció de fòsfor per part de les nefrones funcionals restants, per poder mantenir els nivells normals de fòsfor; tot això indueix una estimulació de la síntesi i secreció de la PTH.

A mesura que la malaltia va progressant, les nefrones cada cop perden més capacitat d'excreció, derivant en la incapacitat per mantenir els nivells de fòsfor en sang i, per tant, es dóna una hiperfosfatèmia.

Un altre problema és la gran afinitat entre el calci (catió divalent) i el fòsfor (anió monovalent), i el fet que la concentració en plasma d'un dels dos augmenti fa que hi hagi un elevat risc de formar un complex insoluble, el que pot dur a provocar una calcificació en teixits que no són els habituals, com les artèries, i tot això derivar en diferents malalties. Si es dóna la precipitació del complex format per fòsfor i calci, es produirà una disminució dels nivells de calci en sang (hipocalcèmia) que juntament amb la hiperfosfatèmia i la deficiència de vitamina D, produiran un augment dels nivells de PTH en sang. ***Figura 1.***

La calcificació extra-esquelètica, sobretot la calcificació cardiovascular (CVC), en pacients amb CKD, pot donar lloc a diverses malalties cardiovasculars, fent que augmenti la mortalitat i morbiditat dels pacients.[10,11]

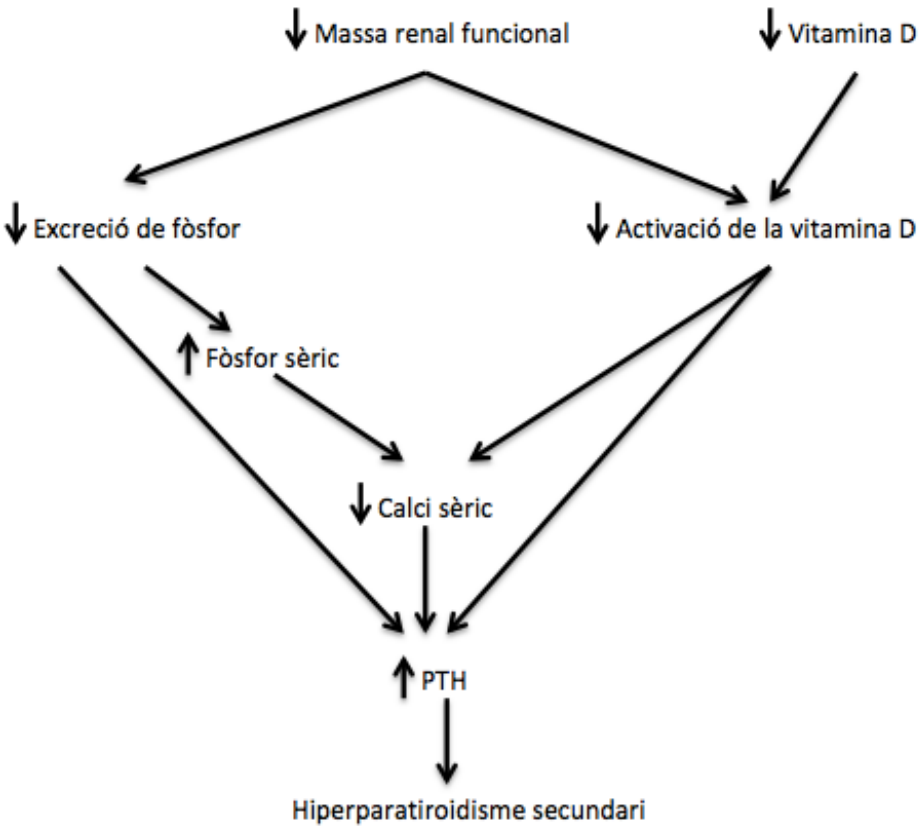

Figura 1. *Patofisiologia de l'hiperparatiroidisme secundari. Adaptació de "Secondary Hyperparathyroidism and Chronic Kidney Disease"*[10].

L'equilibri homeostàtic del fòsfor es regula sobretot amb l'absorció intestinal del fòsfor provinent de la dieta, i l'excreció d'aquest per l'orina. Aquests dos esdeveniments es controlen mitjançant tres hormones: la PTH, el calcictriol i un factor de creixement de fibroblasts (FGF23). El FGF23 requereix d'un co-receptor, Klotho, per dur a terme la seva funció, entre les quals destacam provocar una menor reabsorció del fòsfor per part del ronyó, una menor síntesi de PTH, i una estimulació de la síntesi de calcitriol, per tant, crear un balanç negatiu del fosfat. Això indica que un defecte en el complex FGF23-Klotho suposa una hiperfosfatèmia.[11,12]

Hi ha dues maneres d'augmentar l'excreció de fòsfor per l'orina, i així reduir la hiperfosfatèmia. Una pot ser incrementant el GFR, és a dir, una hiperfiltració. Per altra banda, també es pot augmentar la excreció fraccional de fosfat (FEp). Els pacients que presenten CKD, no sempre poden augmentar el GFR, però sí que augmenten el FEp per mantenir el balanç de fosfat. Aquest augment del FEp s'ha associat a un increment en sèrum de FGF23, per tant si el FGF23 disminueix, també es reduirà el FEp, produint-se un augment en sang de fòsfor. A més, en la CKD també es donen una sèrie d'adaptacions en l'esquelet, el que provoca desordres ossis que incrementen la hiperfosfatèmia. [14]

Un altre aspecte a destacar és la disminució de la capacitat de producció de calcitriol, el que fa que es disminueixi l'absorció de calci, derivant en hipocalcèmia, i a més la estimulació de la secreció de la PTH. El fet que disminueixi el calcitriol, també representa una disminució de la senyal dels osteoblasts de produir el FGF23.[14]

El calci també presenta un paper molt important en la calcificació. De fet, una hipercalcèmia puntual és comú en pacients sotmesos a diàlisis, resultat de diverses teràpies.

Uns dels principals mecanismes del control dels nivells de calci són els metabòlits actius de la vitamina D, la PTH i la calcitonina. El calcitriol, derivat de la vitamina D, augmenta l'absorció intestinal de calci i la resorció de l'os, i disminueix l'excreció; per tant, incrementa el nivell de calci sèric. Per la seva part, la PTH, disminueix l'excreció renal de calci, i promou la 1-alfa hidroxilasa en el ronyó, el que provoca un augment de la producció del calcitriol. Finalment, la calcitonina disminueix el nivell sèric de calci, disminuint la resorció ossia. ***Figura 2.***

La vitamina D activa presenta diferents derivats, com el calcitriol, alfa-calcidol, doxercalciferol i paricalcitol, que s'empren per tractar l'hipertiroidisme en pacients amb CKD. Aquesta vitamina actua disminuint la PTH, però també presenta efectes negatius, ja que augmenta l'absorció de calci i fosfat per part de l'intestí, incrementant els seus nivells en

sang. Actualment s'ha trobat el paricalcitol, un anàleg actiu de la vitamina D que actua exclusivament sobre la glàndula paratiroide. [11,16]

En resum, la progressiva pèrdua de funció renal, provoca una deficiència del calcitriol, degut a la baixa activitat de la 1-alfa hidroxilasa al ronyó. A més també es dóna un augment dels nivells de FGF23, inhibidor de la 1-alfa-hidroxilasa. Aquestes condicions condueixen a una hipocalcèmia, que juntament amb la hiperfosfatèmia, provoquen la sobreestimulació de la secreció de la PTH, causant l'hiperparatiroidisme secundari. Aquest hiperparatiroidisme secundari és el que provoca un increment en la reabsorció de calci a nivell renal i a l'os, generant hipercalcèmia, que juntament amb la situació d'hiperfosfatèmia pot derivar amb el temps en calcificació vascular.[15]

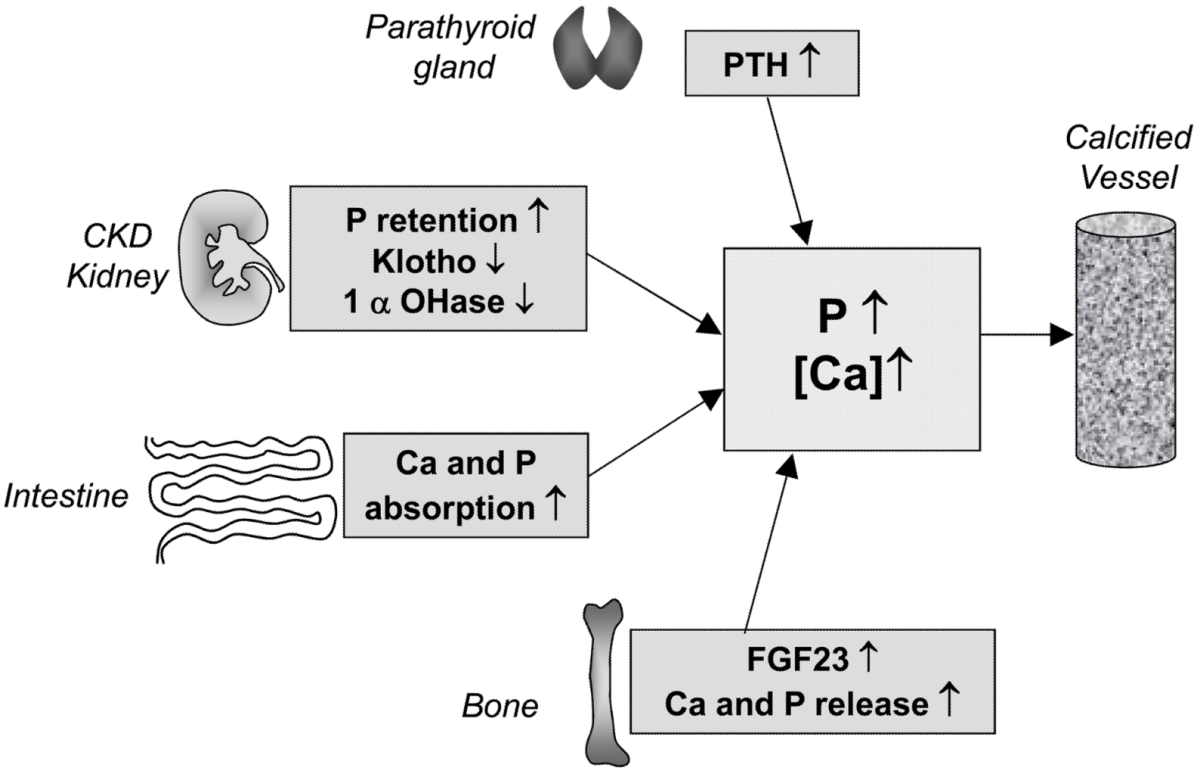

Figura 2. *Esquema resum de les conseqüències metabòliques de la CKD, que finalment provoquen una calcificació vascular*[15]*.*

3.5 Calcificació cardiovascular

La CVC és la complicació més comú en els pacients de CKD, de fet, és una de les principals causes de mort en aquests pacients.[11] De fet, hi ha estudis que demostren que els pacients en hemodiàlisi tenen una major prevalença de sofrir CVC.[12]

La calcificació està considerada la darrera etapa de la mineralització. Aquest procés es dóna fisiològicament només en ossos i dents, el que indica una estricta regulació per evitar la

calcificació dels teixits blans.[17] No obstant, en determinades situacions patològiques es pot produir calcificació a aquests teixits blans. En produir-se un gran augment de la concentració de fosfat s'indueix la formació de cristalls insolubles de fosfat càlcic. Aquest procés es coneix amb el nom de nucleació. Seguit d'aquesta nucleació, els cristalls de fosfat càlcic sofreixen una fase de transformació (monetite, brushite, OCP, ACP, hidroxiapatita -HAP-).

La calcificació vascular es pot donar en dues capes diferents de la paret arterial: per una banda tenim la túnica íntima, i per altre la túnica mitja. És en aquesta darrera on té lloc la calcificació en els pacients amb CKD.[18]

En la sang de pacients sans, la concentració de fosfat és al voltant de 1 mM, en canvi, en pacients que es troben en el darrer estadi d'una malaltia renal, aquesta concentració es troba al voltant de 1,4-2,8 mM, i s'ha observat com l'endoteli vascular augmenta la seva producció de radicals d'oxigen, el que conduiria a l'apoptosi de les cèl·lules. La mort de les cèl·lules vasculars i l'elevada concentració de fòsfor indueixen l'expressió de BMP-2, Runx2 i ostepontina, els quals són factors osteogènics que promouran la transició de les cèl·lules musculars llises de la paret vascular, a osteoblasts. A més, en augmentar el nivell de calci extracel·lular, juntament amb el fosfat, augmenta la deposició mineral en les cèl·lules vasculars.[18] Aquest fet relaciona la hiperfosfatèmia amb la CVC.[13]

Un cop les cèl·lules vasculars han sofert el canvi fenotípic a osteoblasts i produeixen matriu òssia, es dóna la biomineralització, procés per el qual es depositen els cristalls. En la sang, gràcies a diferents proteïnes que presenten un efecte inhibidor per la formació dels cristalls, es mantenen solubles. El sèrum presenta una proteïna, la fetuina-A, que inhibeix el creixement dels cristalls de fosfat càlcic. Un cop s'ha donat la nucleació, la fetuina-A, s'uneix als cristalls que encara són petits (0,1 nm de diàmetre), inhibint el seu creixement. Aquestes partícules s'agreguen i formen les que són les partícules calciproteiques (CPPs) primàries, unes nano-partícules d'entre 50-100 nm de diàmetre. Aquestes CPPs primàries sofreixen un reordenament que els converteix en estructures més estables, recobertes per una monocapa de fetuina-A que recobreix el nucli mineral, evitant així el creixement dels cristalls. Aquestes darreres són les CPPs secundàries, d'entre 100-200 nm de diàmetre.

Les CPPs formen col·loides, és a dir, no precipiten espontàniament, per això es poden considerar un mecanisme de defensa front la precipitació dels cristalls de fosfat càlcic. S'ha pogut observar com aquestes CPPs estan presents en la sang dels pacients de CKD, però no

en persones sanes, i a més, a major progressió de la malaltia, major presència de CPPs en el sèrum[13,12,18,19]

Un altre inhibidor present en la sang és la proteïna de la matriu-gla (MGP), que es troba en les cèl·lules musculars llises de la capa mitja. Amb un *knock-out* per aquesta proteïna s'ha observat una calcificació en la capa arterial mitja, i fins i tot la ruptura d'aquesta, però s'ha vist que MGP actua localment per prevenir la calcificació.[18,19,20]

La osteoprotegerina (OPG) és un producte dels osteoblasts, i presenta un paper important en la remodelació òssia evitant l'excés de diferenciació dels osteoclasts i la resorció òssia. Mitjançant *knock-outs* s'ha pogut comprovar que presenta un paper inhibidor de la calcificació, tot i que no és capaç de revertir-la.[12,18,19]

Finalment, el pirofosfat inorgànic és un inhibidor de la formació d'HAP sintetitzat per les cèl·lules musculars llises de les artèries, i l'addició d'aquest en el medi, prevé de la calcificació de l'aorta en rates.[18,19]

3.6 Tractaments de la calcificació vascular

Actualment, no hi ha cap tractament per revertir la calcificació, el que es sol fer és tractar per evitar que progressi.[18]

Una bona teràpia, per fer front a la hiperfosfatèmia, seria disminuir la quantitat de fosfat en sang, per exemple a través d'una disminució de la seva ingesta. És recomanable que la restricció d'ingesta de fosfat s'inicií en el moment en que s'observa un augment dels nivells de FGF23 en sang, el que indica un excés de fosfat, per disminuir així el risc a la CVC.[13]

Una forma de tractar la hiperfosfatèmia és amb quelants de fosfat. Un quelant és una substància que forma complexes amb ions de metalls pesats. Els primers quelants de fosfat contenien calci, però això augmentava la càrrega de calci en sang, provocant una hipercalcèmia. Però actualment trobam quelants de fosfat sense calci i amb la mateixa eficàcia que els primers, evitant així possibles hipercalcèmies.[9,11] El carbonat de lantani és un altre quelant de fosfat, que també s'empra per disminuir el nivell de fosfat en CKD, tot i que s'han pogut observar acumulacions d'aquest element en diferents teixits, encara que no s'ha descrit cap rellevància mèdica.[11]

També s'han desenvolupat bifosfonats, anàlegs del pirofosfat, per inhibir la funció de l'osteoclast i la resorció òssea.[18] En estudis realitzats en animals, els bifosfonats no redueixen els nivells de calci i fosfat, el que fan és inhibir la calcificació, però els resultats són inconsistents.[11,16]

Els calcimimètics són un altre tipus de substància que mimetitzen la funció del calci, activant al·lostèricament el receptor sensible al calci (CaR), ja que es va veure que una pèrdua de la funció d'aquest receptor estimulava la calcificació en les cèl·lules vasculars. El *cinacalcet* és un calcimimètic aprovat clínicament, i s'ha vist que disminueix els nivells de calci i fosfat en sang, així com els productes derivats de la interacció entre aquests dos ions.[11,16] A més, s'ha provat que la combinació de teràpies amb calcimimètics i calcitriol prevé la CVC i redueix la mortalitat.

3.7 Mesures de la calcificació cardiovascular

S'han desenvolupat diferents *scores* per classificar els pacients segons el risc cardiovascular. El més emprat possiblement sigui el *Framingham risk score* (FRS), que s'encarrega de determinar el risc cardiovascular a 10 anys d'un individu, encara que presenta la limitació de no tenir en compte la història familiar, ni diferents components del síndrome metabòlic.

Actualment, s'han desenvolupat altres *scores*, com el CAC *score*, que consisteix en una tomografia computada cardíaca del calci coronari. Es tracta d'un mètode no invasiu que permet observar plaques calcificades en les artèries coronàries. El CAC *score* s'ha validat com a marcador de risc cardiovascular.[18,21,22,23]

Un altre exemple seria *l'Agatston score*, que determina el grau de calcificació de l'artèria coronària, també mitjançant tomografia computada. Aquest augmenta així com avancen els diferents estadis de la CKD, i és significativament major en l'estadi 5 que en l'estadi 1 o 2 dels pacients amb CKD. A més, s'ha considerat un *Agatston score* >400 com a molt greu[24].

Es tracta un mètode fiable i reproduible que combina el volum de la placa i la densitat[25]; i es mesura en unitats de *Hounsfield*. Aquest *Agatston score* és diferent en pacients que pateixen del ronyó i pacients que no. Els pacients dialitzats, poden tenir un elevat *Agatston score* coronari sense presentar estenosis coronària[26].

Les calcificacions vasculars avaluades amb una radiografia simple permeten diferenciar la calcificació de la túnica mitja, i de la túnica íntima. Aquest mètode presenta l'avantatge de la simplicitat a l'hora de realitzar-se i de interpretar-se, a més de no ser molt car.

Per altra part, el *Kauppila score* avalua la presència de calcificació vascular en la paret anterior i posterior de l'aorta abdominal, emprant una radiografia lateral simple.

Els dos darrers mètodes mencionats són determinacions semi-quantitatives de la CVC[27].

3.8 Biomarcadors sanguinis

S'estudia la possibilitat de definir diferents biomarcadors sanguinis de la CKD i les seves complicacions. Com s'ha dit, les CPPs es troben formades per fosfat, calci i fetuina-A principalment, i es pensa que la detecció d'aquestes en sang de pacients amb CKD podria obrir un nou futur per al diagnòstic i tractament de la CKD. A més, s'ha pogut observar com a major progressió de la malaltia, major presència de CPPs en el sèrum.[13,28,29]

El fosfat és un dels biomarcadors més investigats en els pacients de CKD, ja que s'ha vist que elevades concentracions de fosfat en sèrum s'associen a problemes cardiovasculars. Els nivells de fosfat per damunt de 6 mg/dL promouen la calcificació encara que, en concentracions menors i amb la presència d'altres factors sinergístics, pot iniciar la calcificació *in vivo*. Tot i això, no és considerat molt bon marcador, sobretot en les primeres etapes de la CKD.

La fetuina-A, com s'ha comentat, podria ser un altre biomarcador. S'ha pogut observar en molt baixes concentracions en pacients dialitzats, així com un increment de la mortalitat cardiovascular en aquests.[12,28,30]

En un estudi realitzat es va arribar a la conclusió que només FGF23, OPG i MGP es troben relacionats amb CVC. D'aquests només MGP i FGF23, tenen un poder discriminatori per identificar pacients amb calcificació de l'aorta. Per a la calcificació coronària, només els nivells de OPG i MGP són útils. Per tant, MPG sembla ser el millor biomarcador per detectar les dues malalties, i per obtenir una millor discriminació, s'haurien de combinar diferents biomarcadors.[12,30,31]

La esclerostina (Scl) és una proteïna secretada pels osteòcits i participa en la regulació de la massa òssia. Es troba elevada tant en pacients que es troben en les primeres etapes de la CKD com en pacients en diàlisis. S'ha vist que la Scl està associada a una elevada mortalitat per CVC en pacients dialitzats. Diferents estimuladors de la Scl són calcitriol, BMPs, glucocorticoids, leptina, citoquines, calcitonina i fosfat, mentre que la PTH inhibeix la producció de la Scl.[32,33,34]

Durant la CKD, sobretot en els darrers estadis i en pacients dialitzats, augmenta molt el risc de patir complicacions, com una CVC severa. Hi ha diverses maneres de detectar la calcificació un cop s'ha generat (raigs X, tomografia, etc.), però també és important tenir biomarcadors primerencs de la capacitat cristal·litzadora de la sang, com poden ser les CPPs.

En aquest treball ens centrarem en l'anàlisi de la formació de cristalls de calci a plasma com a possible biomarcador de la calcificació vascular. Per això s'ha emprat un article de referència: "*Nanoparticle-Based Test Measures Overall Propensity for Calcification in Serum*"[17]. En aquest s'indueix la calcificació mitjançant la supersaturació del plasma, afegint $CaCl_2$, com a font de calci, i fosfat. Varen observar que a major concentració de calci i fosfat més s'accelerava el procés de la formació de les CPPs primàries i secundàries.

Per tant, en aquest treball s'induirà la calcificació i es realitzaran una sèrie d'assajos per determinar d'una manera més ràpida la formació dels cristalls de calci.

4. OBJECTIUS I DISSENY EXPERIMENTAL

La cristal·lització de fosfat càlcic, o HAP, és un procés fisiològic que té lloc de manera contínua al desenvolupament dels teixits durs, como els ossos o les dents. Però en condicions patològiques es pot produir una desregulació del procés, fent que es mineralitzin teixits blans, com l'aparell cardiovascular. Per tant, la deposició de cristalls de HAP causats per la supersaturació de calci i fosfat promouen la CVC, provocant diferents malalties.

Avui en dia, encara no s'ha establert de manera definitiva cap biomarcador per determinar el potencial cristal·litzador del plasma d'un individu o el risc de desenvolupar CVC. Per això, els objectius d'aquest treball consisteixen en realitzar una recerca bibliogràfica dels diferents biomarcadors de cristal·lització proposats fins el moment, i dels trobats, triar-ne un per assajar-lo experimentalment i intentar optimitzar la tècnica perquè pugui ser emprada al laboratori de manera rutinària.

Es va elegir un article de referència: *"Nanoparticle-Based Test Measures Overall Propensity for Calcification in Serum"*[17] i s'intentà millorar la tècnica per a que es pogués dur a terme al laboratori de manera rutinària. Es va induir la formació de cristalls de fosfat càlcic en diferents combinacions de concentracions de calci i fosfat i un cop elegides les idònies es provà la reproductibilitat del mètode, així com l'eficàcia de dos inhibidors (tiosulfat sòdic (STS) i pirofosfat sòdic (PPi)) per frenar la formació dels cristalls. Es procedí a caracteritzar les partícules cristal·litzades mitjançant la quantificació de proteïnes pel mètode de Bradford i la seva visualització per microscòpia electrònica.

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1 Mostra de sang

La sang emprada en aquests experiments prové de voluntaris sans participants d'un estudi major en què s'avaluen diferències en la capacitat cristal·litzadora del plasma en voluntaris sans i pacients dialitzats, aprovat pel Comitè d'Ètica d'Investigació de les Illes Balears. Tots els participants varen ser degudament informats del procediment i varen firmar un consentiment informat.

5.2 Reactius emprats

Els reactius emprats per induir la cristal·lització de fosfat càlcic en la sang foren: una dissolució de NaCl 0,15 M, en aigua bi-destil·lada, a pH 7,4 (de Fisher BioReagents); una dissolució mare de $CaCl_2$ 41,67 mM en NaCl 0,15 M, a pH 7,4 (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); una dissolució mare de Na_2HPO_4 33,3 mM en NaCl 0,15 M, a pH 7,4 (de Panreac, Barcelona); A partir de les dues darreres dissolucions es realitzaren una bateria de dissolucions de menor concentració. S'empraren dos inhibidors: el PPi ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) (de MERCK) preparat a una concentració 4mM en NaCl 0,15 M a pH 7,4; i el STS ($Na_2S_2O_3$) (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 M en NaCl 0,15 M, a pH 7,4.

Per dur a terme els assajos de les CPPs, es preparà una dissolució de NaCl 140 mM i HEPES 100 mM, en aigua bi-destil·lada, a pH 7,4 (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i una dissolució de HCl 0,15 M en aigua bi-destil·lada. Amb la dissolució de NaCl i HEPES es varen preparar dues dissolucions de $CaCl_2$ 40 mM i Na_2HPO_4 19,44 mM, ambdues a pH 7,4.

5.3 Estudis de cristal·lització

5.3.1 Corbes de cristal·lització

Es realitzaren diferents corbes de cristal·lització de fosfat càlcic o HAP per les diferents combinacions de Na_2HPO_4 (1 mM, 2 mM, 4 mM i 6 mM, concentracions finals dins els pouets) i $CaCl_2$ (6 mM, 8 mM, 10 mM, 12,5 mM, concentracions finals dins els pouets), i es distribuïren en la placa de 96 pouets de la manera en que s'observa a la ***taula 4***, amb 6 rèpliques de cada condició.

Taula 4. *Distribució de les diferents combinacions de Na_2HPO_4 i $CaCl_2$ en la placa de 96 pouets.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ca 6 mM P 1 mM						Ca 6 mM P 2 mM					
B	Ca 6 mM P 4 mM						Ca 6 mM P 6 mM					
C	Ca 8 mM P 1 mM						Ca 8 mM P 2 mM					
D	Ca 8 mM P 4 mM						Ca 8 mM P 6 mM					
E	Ca 10 mM P 1 mM						Ca 10 mM P 2 mM					
F	Ca 10 mM P 4 mM						Ca 10 mM P 6 mM					
G	Ca 12 mM P 1 mM						Ca 12 mM P 2 mM					
H	Ca 12 mM P 4 mM						Ca 12 mM P 6 mM					

Per dur a terme aquest assaig es feren alíquotes de 600 µL de plasma sanguini, les quals es centrifugaren durant 30 minuts a 10000g. A continuació es pipetejaren els diferents reactius per induir la cristal·lització de fosfat càlcic, en el següent ordre: 60 µL de Na_2HPO_4, 80 µL de plasma sanguini prèviament centrifugat i 60 µL de $CaCl_2$. Per obtenir les concentracions finals desitjades de Na_2HPO_4 i $CaCl_2$, es pipetejaren dissolucions 3,3x concentrades.

La lectura de l'absorbància es va realitzar durant 30 minuts amb mesures cada 3 minuts (lectures a temps 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 i 30 minuts). Entre les lectures la placa era agitada en un agitador de plaques a 750 rpm (Titramax 100, Heidolph). L'absorbància es mesurà a una longitud d'ona de 550 nm emprant l'espectrofotòmetre *PowerWave XS microplate spectrophotometer* (BioTek Instruments, Inc.), i el programa *KC Junior*.

5.3.2 Proves de reproductibilitat

Un cop realitzades les diferents lectures de les corbes de cristal·lització, s'escolliren les concentracions de $CaCl_2$ 10 mM amb Na_2HPO_4 1 mM, 2 mM, 4 mM i 6 mM. Es varen dur a terme les proves de reproductibilitat en aquestes condicions durant 3 dies consecutius, realitzant 6 rèpliques de cada condició.

El procediment experimental va ser el mateix que el descrit a l'apartat 5.3.1.

Les diferents condicions es distribuïren en la placa de 96 pouets com es mostra a la ***taula 5***.

Taula 5. *Distribució de les diferents combinacions de Na_2HPO_4 i $CaCl_2$ en la placa de 96 pouets.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ca 10 mM P 1 mM						Ca 10 mM P 2 mM					
B	Ca 10 mM P 4 mM						Ca 10 mM P 6 mM					

5.4 Determinació de la eficàcia dels inhibidors

Per determinar l'eficàcia de dos inhibidors de la cristal·lització, el PPi i el STS, s'empraren les concentracions de $CaCl_2$ i Na_2HPO_4, 10 mM i 2 mM respectivament.

Els inhibidors s'afegiren a les alíquotes de plasma, abans de centrifugar-les, amb una relació 1:20 (30 µL de inhibidor i 570 µL de plasma). Es provaren diferents concentracions d'inhibidors (com s'observen en la ***taula 6***), i per assolir-les es varen preparar 20x concentrats a partir de la dissolució mare 4 mM en el cas del PPi, i 2 M en el cas del STS. Es centrifugà el plasma amb l'inhibidor durant 30 minuts a 10000g. Les diferents condicions dels inhibidors es distribuïren en la placa de 96 pouets com es mostra a la ***taula 6***.

Es va determinar l'IC 50 de cada inhibidor amb el programa *GraphPad Prism*.

Taula 6. *Distribució de les diferents combinacions de PPi i STS, en la placa de 96 pouets. Les concentracions que es donen són en plasma.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PPi 0 µM						PPi 1 µM					
B	PPi 10 µM						PPi 20 µM					
C	PPi 40 µM						PPi 60 µM					
D	PPi 100 µM						PPi 200 µM					
E	STS 0 mM						STS 0,1 mM					
F	STS 1 mM						STS 10 mM					
G	STS 25 mM						STS 50 mM					
H	STS 75 mM						STS 100 mM					

El procediment experimental va ser el mateix que el descrit en l'apartat 5.3.1.

5.5 Caracterització de les partícules cristal·litzades

5.5.1 Assajos de cristal·lització

Amb la finalitat d'aprofundir en la composició de les partícules cristal·litzades, les mostres de plasma es varen incubar en diferents condicions:

- Incubació de 24h de 6mL de NaCl 0,15M i 4mL de plasma. Obtenint així un control negatiu de cristal·lització.
- Incubació de 24h de 4mL de plasma amb 2,5 mL de $CaCl_2$ 40 mM, 2,5 mL de Na_2HPO_4 19,44 mM, ambdós en NaCl i HEPES, i 1 mL de NaCl 0,15 M. Obtenint d'aquesta manera les condicions que es mencionen a l'article de Pasch, de $CaCl_2$ 10 mM i Na_2HPO_4 6 mM.[17]
- Incubació de 30 minuts de 4 mL de plasma amb 3 mL de $CaCl_2$ 41,67 mM i 3 mL de Na_2HPO_4 5 mM en NaCl 0,15 M. Obtenint així les condicions que es volen provar de $CaCl_2$ 12,5 mM i Na_2HPO_4 1,5 mM.

Totes les incubacions es varen fer per triplicat. Després de les incubacions, de cada tub de 10 mL, es feien 2 alíquotes de 4 mL cada una en tubs d'ultra-centrífuga, una alíquota destinada a la quantificació de proteïnes i una alíquota destinada a l'observació al microscopi electrònic. Es centrifugaren durant 2 hores a 24000g, a 4ºC amb la ultra-centrifuga (Optima L-100 XP Ultracentrifuge de Beckman Coulter). Després es realitzaren 2 rentats de 10 minuts cada un, a 24000g, a 4ºC, amb 2 mL d'aigua bi-destil·lada.

5.5.2 Quantificació de proteïnes pel mètode de Bradford

El precipitat obtingut amb la ultra-centrifugació es va resuspendre amb 280 µL de HCl 0,15 M, mitjançant sonicació (10 cicles de 3 segons, a una amplitud del 60%) (de Vibra cell TM, USA). Un cop sonicades les mostres, es procedí a realitzar la quantificació de proteïnes, adaptant el mètode de Bradford a les necessitats de la prova[35].

El mètode de Bradford (1975) es basa en la unió del colorant Blau de Coomassie G-250 amb les proteïnes. Aquest colorant es troba en una coloració vermella, que en trobar-se en un entorn hidrofòbic dins la proteïna, fa que adopti una coloració blava. Aquesta coloració és detectable espectrofotomètricament a 595nm, després de 2 minuts d'incubació.

Per dur a terme el mètode es realitzà un patró de BSA (*bovine serum albumin*) preparant 10 mL d'una dissolució mare de 1 mg/mL en HCl 0,15 M. Es prepararen les següents dissolucions: 0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,30, 0,50, 0,75, 1 mg/mL. Es va realitzar una dilució 1/5 del reactiu de Bradford. A la placa de 96 pouets es posaren 10 µL de mostra o patró i 250 µL del reactiu de Bradford. Les mostres resultants de les incubacions de 24 hores es diluïren 20 vegades en HCl 0,15 M. En canvi les mostres resultants de les incubacions de 30 minuts i els blancs es posaren directament.

S'agità la placa durant 30 segons i es mantingué en obscuritat durant 5 minuts. Posteriorment es realitzà la lectura de la placa a 595 nm.

5.5.3 Microscòpia electrònica

El precipitat obtingut amb la ultra-centrifugació, de les alíquotes destinades al microscopi electrònic, es va resuspendre amb 2 mL d'aigua bi-destil·lada, mitjançant sonicació (10 cicles de 3 segons a un 60% d'amplitud) (de Vibra cell TM, USA) .

Un cop resuspeses, es depositaven 2 gotes de 5 µL de mostra damunt la placa del microscopi electrònic. La mostra resultant de la incubació de 24 hores es diluí 100 vegades, en canvi les altres es dipositaren directament. Les mostres s'assecaren durant 30 minuts, es recobriren amb or i posteriorment es procedí a la visualització d'aquestes mitjançant un microscopi electrònic d'escombratge (Hitachi S-34000N, Japó).

5.6 Anàlisi estadística

Per dur a terme l'anàlisi estadística es va emprar el software per Windows: *Statistical Program for the Social Sciences (SPSS, versió 21.0; SPSS Inc, Chicago, IL).* Les dades emprades foren les pendents de les rectes, representades com logaritme del temps en l'eix X, i absorbància en l'eix Y, fent que les unitats dels resultats siguin absorbància/log min. Aquestes dades es presenten com a mitjanes ± error estàndard de la mitjana (SEM). Mitjançant una ANOVA de dos factors es va mirar si hi havia diferències significatives en les variabilitats inter-dia i intra-dia, i si les diferències eren a causa de la diferent concentració de fosfat o a causa del factor temps. Així mateix, es va analitzar si hi havia efecte interactiu entre els dos factors. Per altra part, es va realitzar una ANOVA d'un factor amb els resultats dels nivells de proteïna precipitats, per observar si hi havia diferències significatives en les proteïnes precipitades a les tres mostres. Es va considerar estadísticament significatiu un $p<0,05$.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats que es presenten a continuació són les mitjanes ± SEM, basades en les pendents de les rectes.

6.1 Estudis de cristal·lització

S'ha demostrat com una supersaturació de calci i fosfat en plasma provoca la formació de cristalls de fosfat càlcic[36], per tant en els estudis de cristal·lització es va induir la super-saturació del plasma, augmentant la concentració de calci i fosfat, per que es donés la precipitació.

En voler definir un possible mètode més ràpid que el proposat per Pasch[17], es varen provar diferents combinacions de concentracions de calci i fosfat per elegir la idònia; i alhora demostrar que l'elegida era reproduïble, donant validesa al mètode.

6.1.1 Corbes de cristal·lització

En la ***figura 3*** s'observen les diferents corbes obtingudes. En observar el coeficient de variància es vegé com així com augmenten les concentracions de fosfat i calci, menor és la variància, indicant que més estable i reproduïble és el mètode. De les corbes, s'elegí la que presenta una concentració de calci 10 mM, ja que presentava uns coeficients de variància baixos; i a diferència de la corba de calci 12,5 mM, la cristal·lització responia a la concentració de fosfat en el rang 1 – 4 mM.

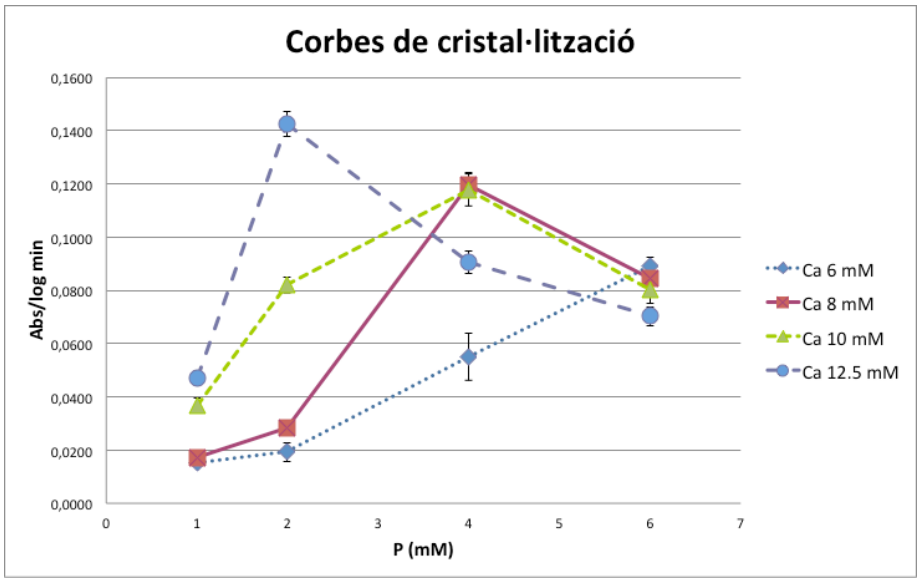

Figura 3. Corbes de cristal·lització. *En la figura s'observen les diferents corbes obtingudes de les diferents combinacions de calci i fosfat. Es representa la concentració de fosfat front la mitjana de les rectes, donada com Abs/log min.*

Es pot veure com la concentració de calci 6 mM respon d'una forma bastant lineal a les diferents concentracions de fosfat; el calci 8 mM i 10 mM també augmenten d'una manera

més o menys lineal entre les concentracions de fosfat 1 mM i 4 mM, tot i que, per la concentració de fosfat 2 mM, la concentració de calci 10 mM és més sensible que la concentració de 8 mM; a partir de la concentració de fosfat 4 mM comença el descens. Finalment, la concentració de calci 12,5 mM només ascendeix de manera lineal entre les concentracions de fosfat 1 mM i 2 mM, després ja es produeix el descens.

6.1.2 Proves de reproductibilitat

Un cop elegida la corba idònia de calci 10 mM, es procedí a provar la reproductibilitat d'aquesta, amb la finalitat de demostrar que es tractava d'un mètode estable i fiable. La reproductibilitat es provà al llarg de tres dies (inter-dia) i es varen obtenir els resultats observats en la ***figura 4***. Es realitzà una ANOVA per comprovar si hi havia diferències significatives entre les diferents concentracions de fosfat, i es va observar com en els tres dies si hi havia diferències significatives. En el cas de ***b***, que representa la concentració de fosfat 2 mM en els tres dies, s'observaven diferències amb ***a***, que representa la concentració de fosfat 1 mM. En el cas de ***c***, que representa la concentració de fosfat 4 mM, es varen poder observar diferències amb ***a*** i ***b***. Finalment, en el cas de ***d***, que representa la concentració de fosfat 6 mM, es varen veure diferències significatives amb ***a*** i ***c***, però no amb ***b***. Això indica que la concentració de fosfat afecta a la precipitació dels cristalls de fosfat càlcic en aquestes condicions experimentals.

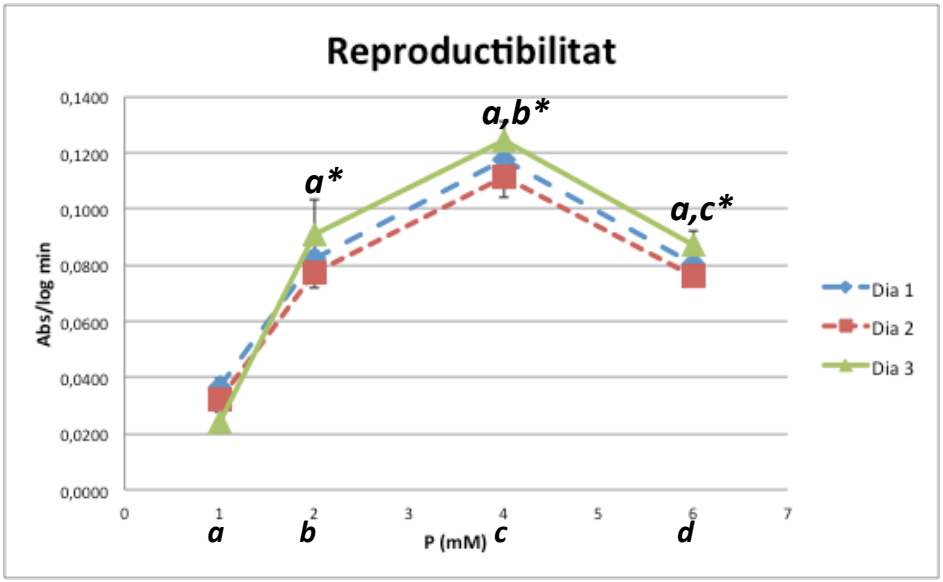

Figura 4. Proves de reproductibilitat. *Es representa la diferent concentració de fosfat, front les mitjanes de les rectes, donades com Abs/log min, durant els tres dies.* ***(a)*** *representa la concentració de fosfat 1 mM;* ***(b)*** *representa la concentració de fosfat 2 mM;* ***(c)*** *representa la concentració de fosfat 4 mM;* ***(d)*** *representa la concentració de fosfat 6 mM. La presència de diferències signiticatives es representa com a lletra*, indicant la concentració de fosfat amb la qual presenta diferència el punt. Es considera diferència significativa un p<0,05.*

En les ***taules 7 i 8*** es pot veure com es tracta d'un mètode reproduïble i fiable. En la taula intra-dia, es pot veure com les mitjanes al llarg dels tres dies, per una concentració de fosfat determinada, són similars, i els coeficients de variància són acceptables (al voltant del 15%) per concentracions de fosfat a partir de 2 mM, indicant la reproductibilitat del mètode, com també es pot veure en la ***figura 4***. En la taula inter-dia es veu com el coeficient de variància, així com va augmentant la concentració de fosfat, és menor, indicant una major estabilitat. Consideram acceptable un coeficient de variància al voltant del 15%.

Taula 7. Resultats intra-dia. *Es mostren les mitjanes de les pendents, en abs/log min, amb els respectius SD i CV (%), per cada concentració de fosfat, en els diferents dies, per separat.(*): valor perdut per errada experimental.*

INTRA-DIA				
Dia 1				
P (mM)	**1**	**2**	**4**	**6**
Rèplica				
1	0,0289	0,0792	0,1340	0,0682
2	0,0307	0,0819	0,1090	0,0804
3	0,0365	0,0882	0,0979	0,0628
4	0,0420	0,0755	0,1069	0,0852
5	0,0373	0,0746	0,1281	0,0886
6	0,0452	0,0932	0,1313	0,0967
Mitjana	**0,0368**	**0,0821**	**0,1179**	**0,0803**
SD	**0,0063**	**0,0073**	**0,0151**	**0,0128**
CV (%)	**17,1**	**8,9**	**12,8**	**15,9**

Dia 2				
P (mM)	**1**	**2**	**4**	**6**
Rèplica				
1	0,0218	0,0790	0,0819	0,0835
2	0,0426	0,0872	0,1185	0,0734
3	0,0387	0,0920	0,1199	0,0747
4	0,0301	0,0813	0,1184	0,0751
5	0,0256	0,0648	0,1306	0,0736
6	0,0334	0,0588	0,0989	0,0748
Mitjana	**0,0320**	**0,0772**	**0,1114**	**0,0759**
SD	**0,0078**	**0,0129**	**0,0177**	**0,0038**
CV (%)	**24,5**	**16,7**	**15,9**	**5,0**

Dia 3				
P (mM)	**1**	**2**	**4**	**6**
Rèplica				
1	0,0288	0,1029	0,0963	0,0688
2	0,0145	0,1103	0,0978	0,0763
3	*	0,0750	0,1254	0,0892
4	0,0302	0,0756	0,1133	0,0914
5	0,0272	0,0752	0,1773	0,0901
6	0,0331	0,1074	0,1356	0,1061
Mitjana	**0,0267**	**0,0911**	**0,1243**	**0,0870**
SD	**0,0072**	**0,0175**	**0,0301**	**0,0130**
CV (%)	**26,8**	**19,2**	**24,2**	**14,9**

Taula 8. Resultats inter-dia. *Es representen les 18 rèpliques de les lectures al llarg dels tres dies, per les diferents concentracions de fosfat. S'han calculat les mitjanes de les pendents, en abs/log min, la SD i el CV (%) per cada una de les concentracions de fosfat. (*): valor perdut per errada experimental.*

INTER-DIA				
P (mM)	**1**	**2**	**4**	**6**
Rèplica				
1	0,0289	0,0792	0,1340	0,0682
2	0,0307	0,0819	0,1090	0,0804
3	0,0365	0,0882	0,0979	0,0628
4	0,0420	0,0755	0,1069	0,0852
5	0,0373	0,0746	0,1281	0,0886
6	0,0452	0,0932	0,1313	0,0967
7	0,0218	0,0790	0,0819	0,0835
8	0,0426	0,0872	0,1185	0,0734
9	0,0387	0,0920	0,1199	0,0747
10	0,0301	0,0813	0,1184	0,0751
11	0,0256	0,0648	0,1306	0,0736
12	0,0334	0,0588	0,0989	0,0748
13	0,0288	0,1029	0,0963	0,0688
14	0,0145	0,1103	0,0978	0,0763
15	*	0,0750	0,1254	0,0892
16	0,0302	0,0756	0,1133	0,0914
17	0,0272	0,0752	0,1773	0,0901
18	0,0331	0,1074	0,1356	0,1061
Mitjana	**0,0322**	**0,0834**	**0,1178**	**0,0810**
SD	**0,0078**	**0,0138**	**0,0213**	**0,0111**
CV (%)	**24,4**	**16,5**	**18,1**	**13,7**

6.2 Determinació de la eficàcia dels inhibidors

Un cop validada la reproductibilitat del mètode es va avaluar la capacitat d'aquest per detectar inhibicions de la cristal·lització emprant dos inhibidors de la calcificació que s'empren com a tractament en pacients dialitzats.

D'una banda, el STS es tracta d'un compost que s'ha emprat durant anys per la intoxicació amb cianur. El STS serveix també com a tractament per la calcificació vascular, ja que actua com a quelant de calci, formant complexes solubles, facilitant així l'eliminació del metabòlit. El fet que eviti la precipitació del calci, fa que inhibeixi la calcificació vascular. El STS s'administra després de la sessió d'hemodiàlisi, i es pensa que el seu efecte està relacionat amb el fet que es troba circulant en sang fins que és eliminat en la pròxima hemodiàlisi[37,38,39,40].

Per la seva part, el PPi es tracta d'un inhibidor endogen de la cristal·lització. Actua bloquejant el creixement dels cristalls de HAP, prevenint així la calcificació vascular. Un problema associat al PPi és el fet de ser hidrolitzat per la fosfatasa alcalina, pel que el seu temps de vida mitja és molt curt; per això es va veure la necessitat de crear anàlegs del PPi, els bifosfonats, tot i que s'ha vist que no són un bon tractament, ja que, encara que tinguin una vida mitja més llarga i presentin la mateixa funció que el PPi, s'ha vist que, a més, inhibeixen la remodelació dels ossos.

Tot i això, s'ha pogut observar que si es tracten els pacients en diàlisis amb PPi, sis pics a la setmana, aquest evita la calcificació, encara que hi hagi una supersaturació de calci i fosfat[41,42,43].

Al nostre estudi es provaren diferents concentracions dels inhibidors per veure l'eficàcia d'aquests a l'hora d'inhibir la formació de cristalls de fosfat càlcic en plasma per una determinada concentració de calci (10 mM) i de fosfat (2 mM). Els resultats s'observen en la ***figura 5***, i es pot veure com es necessita una major concentració de STS per dur a terme el seu efecte inhibitori. A més es pot observar com el PPi assoleix un major % d'inhibició a una concentració molt menor que el STS. Per aquest motiu, es sol emprar més el PPi que el STS en pacients dialitzats.

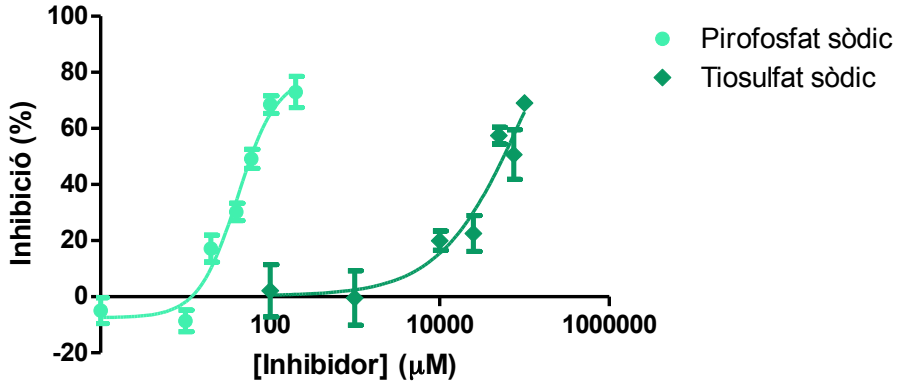

Figura 5. Gràfica de l'inhibició del PPi i STS. *Es tracta d'una funció de regressió no lineal, on es representa l'inhibició corresponent a cada concentració d'inhibidor (µM).*

Es va calcular el IC50 de cada un dels inhibidors mitjançant una funció de regressió no lineal, i el resultat va ser que el IC50 del PPi és 41,56 µM, i el IC50 del STS és 96 mM. Per tant podríem concloure que el mètode adaptat és capaç de detectar l'efecte inhibidor de la cristal·lització d'aquestes substàncies i que el PPi presenta una major eficàcia que el STS a l'hora d'aturar la formació de cristalls de fosfat càlcic a plasma.

6.3 Caracterització de les partícules cristal·litzades

6.3.1 Quantificació de proteïnes pel mètode de Bradford

El mètode de Bradford s'empra per la quantificació de proteïnes, i es basa en la unió del Blau de Coomassie G-250 amb les proteïnes, donant una coloració blava que es pot detectar espectrofotomètricament a 595nm[35].

En l'article de referència[17], observen les CPPs al cap de 24 hores d'incubació. Les condicions finals de Pasch per induïr l'aparició de les CPPs, són calci 10 mM i fosfat 6 mM. Però en el nostre cas ja observàvem precipitació al cap de 30 minuts, en unes concentracions de calci 10 mM i de fosfat 2 mM, el que va dur a pensar que possiblement el que precipitava no era el mateix. Les CPPs són complexes de fosfat càlcic i proteïnes, per tant, per saber si el que ens precipitava eren les CPPs, es va realitzar el mètode de Bradford, que detectaria les proteïnes.

A l'hora de preparar els reactius i les incubacions per dur a terme la caracterització de les partícules cristal·litzades es va produir un error, i en lloc de preparar les incubacions de les nostres condicions a una concentració de calci 10 mM i fosfat 2 mM, es varen preparar incubacions de calci 12,5 mM i fosfat 1,5 mM. Com es pot extreure de la ***figura 3*** (primera gràfica), la precipitació en les condicions de calci 12,5 mM i fosfat 1,5 mM seria molt propera

a la correcta amb calci 10 mM i fosfat 2 mM, per tant acceptam els resultats tenint en compte l'error.

Es va procedir a realitzar el Bradford de les condicions de Pasch, les condicions d'aquest estudi, i es realitzà un blanc. El resultat obtingut s'observa en la ***figura 6***. Com es pot veure en aquesta figura, segons les condicions de Pasch s'observa una gran quantitat de proteïnes, a diferència de les nostres condicions, on no s'observen proteïnes, ja que el resultat és similar al blanc.

Per tant, podem concloure, que el precipitat que observam no són CPPs, sinó que precipiten cristalls de fosfat càlcic no associat a proteïnes.

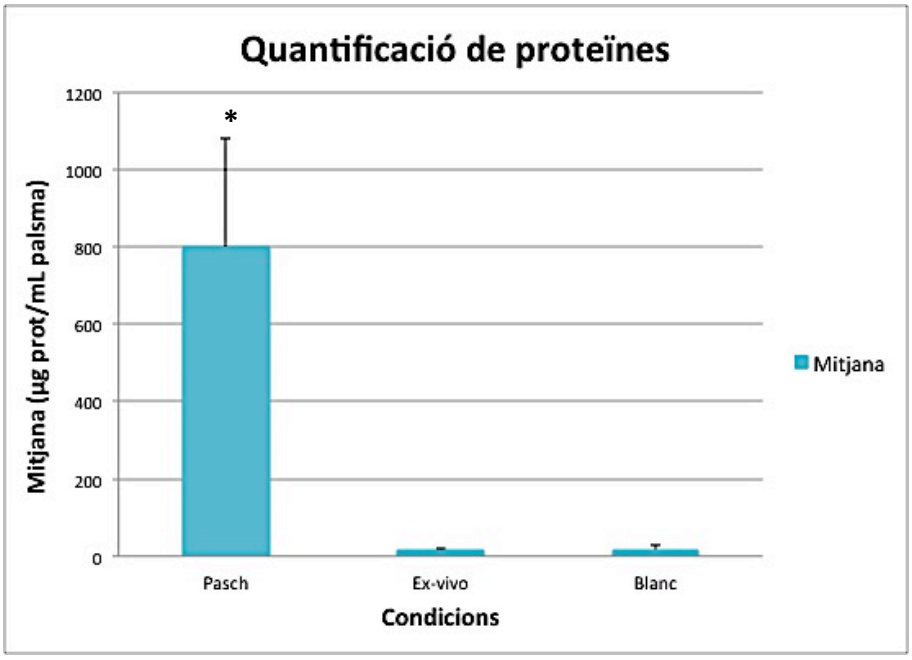

Figura 6. Quantificació de proteïnes pel mètode de Bradford. *Es representa la mitjana (µg prot/mL plasma) ± SEM per les diferents condicions d'incubació. Es va realitzar un ANOVA i es varen observar diferències significatives entre les condicions de Pasch i les del nostre estudi i el blanc. És considera diferència significativa per a p<0,05. (*): diferències significatives.*

6.3.2 Microscòpia electrònica

Paral·lelament a la quantificació de les proteïnes pel mètode de Bradford, es procedí a la caracterització de les partícules per mitjà del microscopi electrònic d'escombratge, a diferència de Pasch, que les caracteritzà a través del microscopi de transmissió. Es caracteritzaren les dues condicions interessants: les de Pasch i les d'aquest estudi. En la ***figura 7*** s'observen els resultats. Es pot veure com en el cas en que s'apliquen les condicions de Pasch, sí que es detecta la presència de les CPPs, però en el cas de les condicions *ex-vivo* no es varen observar. Això dóna suport als resultats obtinguts pel Bradford, que el precipitat que observàvem no eren CPPs.

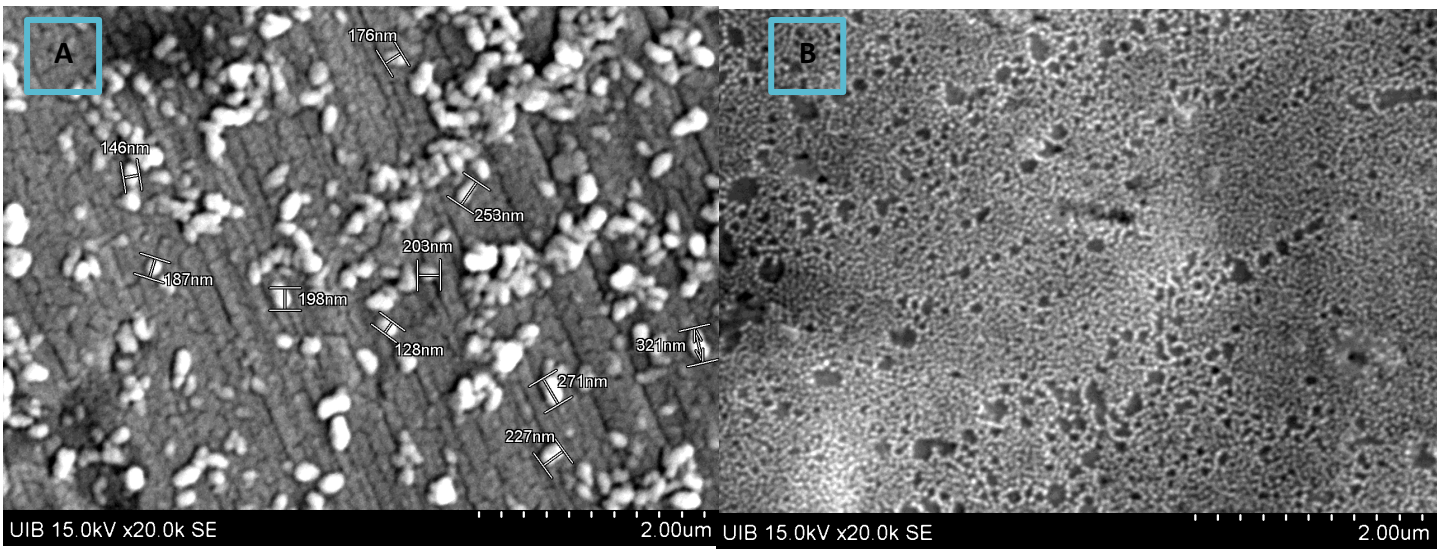

Figura 7. Imatges de la caracterització dels cristalls mitjançant SEM. (A) *Presència de CPPs en les condicions de Pasch.* ***(B)*** *Condicions ex-vivo on no s'observen les CPPs.*

7. CONCLUSIÓ

S'ha aconseguit desenvolupar un mètode d'inducció de la precipitació de cristalls de fosfat càlcic en plasma en un temps d'assaig reduït (30 minuts) afegint calci i fosfat a concentracions finals de 10 mM i 2 mM, respectivament. El mètode desenvolupat és reproduïble i sensible a l'increment (augmentant la concentració de fosfat) i la inhibició (afegint inhibidors) de la cristal·lització. A diferència del mètode desenvolupat per Pasch, en els 30 minuts que dura l'assaig desenvolupat no es formen partícules calciproteiques.

Per falta de temps, no es va poder realitzar la caracterització de les partícules cristal·litzades en les condicions de calci 10 mM i fosfat 2 mM, per tant, es suggereix seguir l'estudi provant aquestes condicions.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Andrew S et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **67,** 67 (2005).

2. To, C., Kdoqi, T. H. E., Group, W., Chronic, O. N. & Disease, K. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease : PART 1 . EXECUTIVE SUMMARY INTRODUCTION : CHRONIC KIDNEY DISEASE AS A PUBLIC HEALTH PROBLEM Table 1 . Goals of the CKD Work Group Table 2 . Definition of Chronic Kidney Disease. *Group* (2000).

3. Weiner, D. E. Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J. Manag. Care Pharm.* **13,** S1–S9 (2007).

4. Eknoyan, G. *et al.* The burden of kidney disease: Improving global outcomes. *Kidney Int.* **66,** 1310–1314 (2004).

5. Otero, A., de Francisco, A., Gayoso, P. & García, F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia* **30,** 78–86 (2010).

6. Agarwal, R. Defining end-stage renal disease in clinical trials: a framework for adjudication: Table 1. *Nephrol. Dial. Transplant.* gfv289 (2015). doi:10.1093/ndt/gfv289

7. Terekhov, N. T. Treatment of acute renal failure. *Vrach. Delo* **11,** 67–69 (1966).

8. Foote, C. *et al.* Survival Outcomes of Supportive Care versus Dialysis Therapies for Elderly Patients with End Stage Kidney Disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology* n/a–n/a (2015). doi:10.1111/nep.12586

9. Wang, C. *et al.* New Conclusions Regarding Comparison of Sevelamer and Calcium-Based Phosphate Binders in Coronary-Artery Calcification for Dialysis Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One* **10,** e0133938 (2015).

10. Tomasello, S. Secondary Hyperparathyroidism and Chronic Kidney Disease. *Diabetes Spectr.* **21,** 19–25 (2008).

11. Byon, C. H. & Chen, Y. Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature. *Curr. Osteoporos. Rep.* **13,** 206–215 (2015).

12. Lee, C. Te *et al.* Biomarkers associated with vascular and valvular calcification in chronic hemodialysis patients. *Dis. Markers* **34,** 229–235 (2013).

13. Kuro-o, M. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* **3,** 420–426 (2013).

14. Hruska, K. a, Mathew, S., Lund, R., Qiu, P. & Pratt, R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* **74,** 148–157 (2008).

15. Manuscript, A. NIH Public Access. *Changes* **29,** 997–1003 (2012).

16. Zheng, C.-M., Lu, K.-C., Wu, C.-C., Hsu, Y.-H. & Lin, Y.-F. Association of Serum Phosphate and Related Factors in ESRD-Related Vascular Calcification. *Int. J. Nephrol.* **2011,** 939613 (2011).

17. Pasch, a. *et al.* Nanoparticle-Based Test Measures Overall Propensity for Calcification in Serum. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23,** 1744–1752 (2012).

18. Disthabanchong, S. Vascular calcification in chronic kidney disease: Pathogenesis and clinical implication. *World J. Nephrol.* **1,** 43 (2012).

19. Hofmann Bowman, M. a. & McNally, E. M. Genetic Pathways of Vascular Calcification. *Trends Cardiovasc. Med.* **22,** 93–98 (2012).

20. Cranenburg, E. C. M. *et al.* The circulating inactive form of matrix Gla protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification. *J. Vasc. Res.* **45,** 427–436 (2008).

21. Youssef, G. & Budoff, M. J. Coronary artery calcium scoring, what is answered and what questions remain. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **2,** 94–105 (2012).

22. Stompór, T. Coronary artery calcification in chronic kidney disease: An update. *World J. Cardiol.* **6,** 115–29 (2014).

23. Koukoulaki, M. *et al.* Increased Prevalence and Severity of Coronary Artery Calcification in Patients with Chronic Kidney Disease Stage III and IV. *Nephron Extra* **2,** 192–204 (2012).

24. Ichii, M. *et al.* Quantitative analysis of abdominal aortic calcification in CKD patients without dialysis therapy by use of the agatston score. *Kidney Blood Press. Res.* **38,** 196–204 (2014).

25. Mahabadi, A. a. *et al.* Progression of coronary artery calcification by cardiac computed tomography. *Herz* 1–6 (2015). doi:10.1007/s00059-015-4342-z

26. Hoffmann, U., Brady, T. J. & Muller, J. Cardiology patient page. Use of new imaging techniques to screen for coronary artery disease. *Circulation* **108,** e50–e53 (2003).

27. Adragão, T. Evaluation of vascular calcifications in CKD patients. *Int. J. Artif. Organs* **32,** 81–86 (2009).

28. Komaba, H. & Fukagawa, M. Fetuin-mineral complex: a new potential biomarker for vascular calcification? *Kidney Int.* **75,** 874–876 (2009).

29. Smith, E. R. *et al.* Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. 1957–1966 (2012). doi:10.1093/ndt/gfr609

30. Mazzaferro, S. *et al.* News on Biomarkers in CKD-MBD. *Semin. Nephrol.* **34,** 598–611 (2014).

31. Liabeuf, S. *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease: Are biomarkers useful for probing the pathobiology and the health risks of this process in the clinical scenario? *Nephrol. Dial. Transplant.* **29,** 1275–1284 (2014).

32. Yigla, M. *et al.* Pulmonary hypertension is an independent predictor of mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **75,** 969–975 (2009).

33. Pelletier, S., Jean, G. & Fouque, D. [Sclerostin: a new biomarker of interest in nephrology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* **73,** 305–13 (2015).

34. Pelletier, S. *et al.* Serum sclerostin: the missing link in the bone-vessel cross-talk in hemodialysis patients? *Osteoporos. Int.* **26,** 2165–74 (2015).

35. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254 (1976).

36. Sandin, K., Hegbrant, J. & Kloo, L. A theoretical investigation of the supersaturation of basic calcium phosphate in serum of dialysis patients. *J. Appl. Biomater. Biomech.* **4,** 80–6 (2006).

37. O'Neill, W. C. & Hardcastle, K. I. The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27,** 521–526 (2012).

38. Ross, E. a. Evolution of treatment strategies for calciphylaxis. *Am. J. Nephrol.* **34,** 460–467 (2011).

39. Zitt, E. *et al.* Use of sodium thiosulphate in a multi-interventional setting for the treatment of calciphylaxis in dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28,** 1232–1240 (2013).

40. Pasch, A. *et al.* Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **74,** 1444–1453 (2008).

41. Riser, B. L. *et al.* Daily peritoneal administration of sodium pyrophosphate in a dialysis solution prevents the development of vascular calcification in a mouse model of uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant* **26,** 3349–57 (2011).

42. O'Neill, W. C., Sigrist, M. K. & McIntyre, C. W. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25,** 187–191 (2010).

43. Manuscript, A. NIH Public Access. *Extrapolation* **79,** 512–517 (2011).