



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Modelos experimentales y determinación analítica de los quelantes de fósforo en química clínica

Gabriel González del Valle Muntaner

Grado de química

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 43189236C

Trabajo tutelado per Joan Perelló Bestard
Departamento de Química Analítica

Se autoriza la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo:
Quelantes de fósforo, hiperfosfatemia, insuficiencia renal.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Objetivos | 4 |
| 2. Introducción. La insuficiencia renal: hiperfosfatemia e hipercalcemia..... | 5 |
| 3. Quelantes de fósforo (P-binders) | 9 |
| 3.1. ¿Qué son? | 9 |
| 3.2. Mecanismo de acción | 9 |
| 3.3. Uso de los P-binders en insuficiencia renal..... | 9 |
| 3.4. Principales P-binders | 11 |
| 3.4.1. Metálicos | 12 |
| 3.4.2. No metálicos | 14 |
| 3.5. Determinación analítica | 15 |
| 4. Modelos experimentales para el estudio de los P-binders | 17 |
| 4.1. In vitro | 17 |
| 4.1.1. Capacidad de unión de fosfato | 17 |
| 4.1.2. Simulación del paso gastrointestinal | 17 |
| 4.1.3. Potencial Z | 17 |
| 4.2. In vivo | 18 |
| 5. Trabajo experimental con uno de los modelos <i>in vitro</i> | 19 |
| 5.1. Material y reactivos..... | 19 |
| 5.2. Metodología..... | 19 |
| 5.2.1. Incubación del quelante de fósforo con la disolución de fosfato | 19 |
| 5.2.2. Determinación colorimétrica del fosfato mediante el método del fosfomolibdato | 20 |
| 5.2.3. Determinación del fosfato por ICP-AES | 20 |
| 5.3. Resultados y discusión | 21 |
| 6. Conclusiones | 25 |
| 7. Bibliografía | 26 |

1. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son:

- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre el problema de la hiperfosfatemia en el ámbito de la insuficiencia renal y sus posibles soluciones.
- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre los principales quelantes de fósforo, su clasificación y mecanismo de acción.
- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre los principales métodos experimentales *in vitro* e *in vivo* para evaluar eficacia de los quelantes de fósforo así como las metodologías para su determinación analítica.
- Implementar en el laboratorio un método experimental *in vitro* para evaluar la eficacia de quelantes de fósforo.

2. Introducción. La insuficiencia renal: hiperfosfatemia e hipercalcemia

Según la IUPAC (2014)¹, un agente quelante es una molécula en la cual ha de haber dos sitios de unión como mínimo para enlazarse a un solo “átomo” central, pero también se indica que a menudo este término se restringe a iones metálicos. En el presente trabajo, el concepto de quelante de fósforo se usa en su terminología médica, y no en su sentido estrictamente químico, pues clínicamente los quelantes de fósforo se refieren a la quelación de fosfato en el tracto gastrointestinal en su forma química adecuada según el pH de trabajo. Así, en condiciones fisiológicas, nos referimos principalmente a los aniones dihidrogenofosfato e hidrogenofosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) siendo los quelantes de fósforo generalmente cationes que pueden secuestrar el fosfato a nivel gastrointestinal y, a diferencia de su definición estricta, la interacción metal-fosfato tiene lugar por un único sitio de unión. Así pues, cuando nos referimos a quelantes de fósforo significa simplemente que hay una interacción entre el fosfato y un catión para “secuestrarlo”. Para simplificar la nomenclatura, a lo largo de este trabajo nos referiremos al fosfato secuestrado, en sus diferentes formas químicas en función del pH, como (P).

El fósforo se puede ingerir por medio de bebidas refrescantes, ya que contienen ácido fosfórico, y por medio de las proteínas de carnes y pescados. Su absorción se produce por todo el intestino delgado pero el lugar donde ocurre de manera más eficaz es en el yeyuno. Lo hace en forma de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} . Hay dos tipos de mecanismos de absorción que se han sugerido. Uno de ellos es mediante un transporte activo, dependiente de Na^+ , que es incrementado por la forma activa de la vitamina D y puede ser bloqueado por mercurio, arseniato y calcitonina. Se da normalmente en el intestino proximal². El otro mecanismo es un transporte pasivo que se da principalmente en el yeyuno e íleon². Es dependiente de la concentración de fosfato en el lumen intestinal. Si la concentración es baja, tiene lugar el primer mecanismo. Asimismo, la absorción está influenciada por el sistema endocrino y por la interacción con otras sustancias en el lumen. La forma activa de la vitamina D aumenta la absorción de fosfatos² y la hormona paratiroidea (HPT), a su vez, aumenta la síntesis de vitamina D. Por otra parte, la presencia de Ca^{2+} puede hacer que disminuya la absorción de fosfatos al formar un fosfato cálcico insoluble. El 30 % de los fosfatos ingeridos se excretan por los excrementos², siendo el riñón la vía principal de excreción.

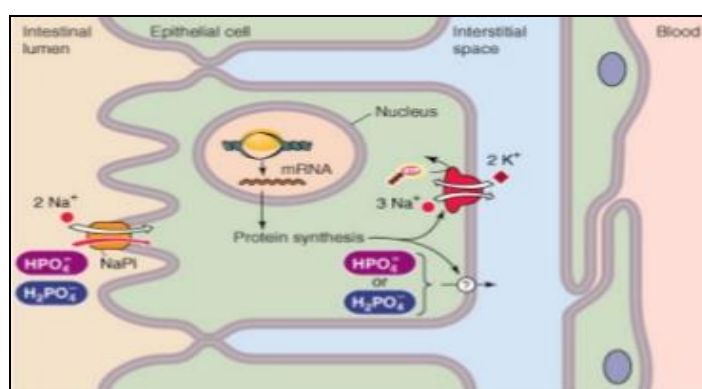


Figura 1. Absorción intestinal del fosfato.

Los problemas con los niveles de fósforo pueden venir de anomalías o enfermedades de ciertos órganos como pueden ser los riñones. El grado de anomalía de éstos determinará las futuras consecuencias que sufrirá el organismo y los métodos que se llevarán a cabo para paliarlas.

La insuficiencia renal es una enfermedad causada por el mal funcionamiento de los riñones. Los riñones en esta situación no filtran adecuadamente las toxinas y demás compuestos cuya eliminación es necesaria (a través de la orina) para no producir intoxicaciones o para mantener los niveles adecuados. Si los riñones no cumplen su función de filtración correctamente, se puede elevar la presión arterial, retener el exceso de líquidos y producir menor cantidad de glóbulos rojos. La insuficiencia renal puede manifestarse de forma aguda o crónica.

La insuficiencia renal aguda (IRA)³ es mayoritariamente de carácter reversible y generalmente se da en forma aislada, aunque en algunos casos puede venir acompañada de insuficiencias de otros órganos. Se diagnostica cuando los niveles de creatinina o nitrógeno ureico sanguíneo están anormalmente elevados durante varios días o semanas. La creatinina es un compuesto producido por la degradación de la creatina, que es útil en la actividad muscular, y el nitrógeno ureico es el nitrógeno perteneciente a la urea, que se forma al degradarse las proteínas. Normalmente, se trata controlando la entrada y salida de líquidos del cuerpo insertando un catéter urinario, un tubo flexible de látex que se inserta en la uretra y va hacia la vejiga.

La insuficiencia renal crónica (IRC)⁴ es irreversible y puede causar daños cardiovasculares, anemia o pericarditis. Se da en aproximadamente un 10 % de la población mundial⁵ y en su última fase se trata mediante diálisis para destoxificar la sangre. A diferencia de la IRA, el aumento de la creatinina en sangre se da progresivamente durante meses o años. Uno de los posibles efectos que puede causar la IRC es un aumento en la concentración de fosfato en sangre (debido a que no se excreta) que conduce a la enfermedad conocida como hiperfosfatemia. En IRC hay 5 estadios o fases de desarrollo (siendo 1 la más leve y 5 la más grave) y la hiperfosfatemia aparece en los estadios 4 ó 5, momento en el cual la homeostasis del cuerpo ya no puede controlar los niveles de fósforo.

La hiperfosfatemia acelera el proceso de calcificación cardiovascular⁶, que consiste en la deposición de sales de fosfato de calcio en los vasos sanguíneos y el corazón. En presencia de niveles de calcio y fosfato anormales, puede tener lugar la precipitación patológica de varios fosfatos de calcio, y de hecho el 80 % de los pacientes en diálisis presentan algún nivel de calcificación cardiovascular. La hipercalcemia y la hiperfosfatemia representan la fuerza motriz (termodinámica) de la calcificación cardiovascular. No obstante, existen sustancias que pueden promover o inhibir este proceso desde el punto de vista cinético, como por ejemplo la fetuina-A^{9,10}. Esta calcificación extraesquelética puede ser en vasos sanguíneos, miocardio o válvulas cardíacas y se ha encontrado en forma de tres estructuras: hidroxapatita, whitlockita y fosfato de calcio amorfo¹¹. Si bien todas son variedades distintas de fosfato cálcico, la whitlockita presenta un cierto nivel de impurezas de magnesio sustituyéndose Ca^{2+} por Mg^{2+} . En la siguiente tabla se observan los compuestos derivados de fosfatos de calcio que se producen en los organismos vivos. Los más insolubles son los que se forman en la calcificación cardiovascular.

Tabla 1. Solubilidad de los fosfatos de calcio que se forman en los organismos⁷.

| Ca/P | Composición | Nombre | pK _{ps} |
|------|--|---------------|------------------|
| 1 | CaHPO_4 | Monetita | 6,9 |
| 1 | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Brushita | 6,59 |
| 1,33 | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | OCP | 68,6 |
| 1,43 | $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$ | Whitlockita | 81,7 |
| 1,67 | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | Hidroxapatita | 117,2 |
| 1,50 | $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$ | HA defectuosa | 85,1 |

La calcificación arterial se produce en la túnica íntima y media^{8,10}. La calcificación producida en la túnica íntima viene acompañada de la acumulación de lípidos, pero si lo hace en la túnica media no es así. La calcificación en la túnica media, también llamada tipo Mönckeberg, implica una transformación de las células del músculo liso vascular en condrocitos u osteoblastos, es decir, células que producen matriz cartilaginosa y ósea respectivamente. Este hecho conduce a una rigidez del vaso, lo que provoca un aumento de la presión y velocidad de la onda del pulso^{9,10}. Se han sugerido 4 posibles mecanismos de calcificación vascular pero el mecanismo de formación exacto todavía no se conoce. Los mecanismos sugeridos son: pérdida de inhibición de calcificación, inducción de la formación ósea, complejos circulantes que son núcleos de calcificación derivados del hueso en continua remodelación y la muerte celular (actúan como núcleos de cristalización)⁶. Los pacientes con IRC y que presentan calcificación en la túnica media suelen ser más jóvenes que los que la presentan en la íntima. Más de la mitad de muertes por enfermedad renal terminal se deben a enfermedades cardiovasculares⁶.

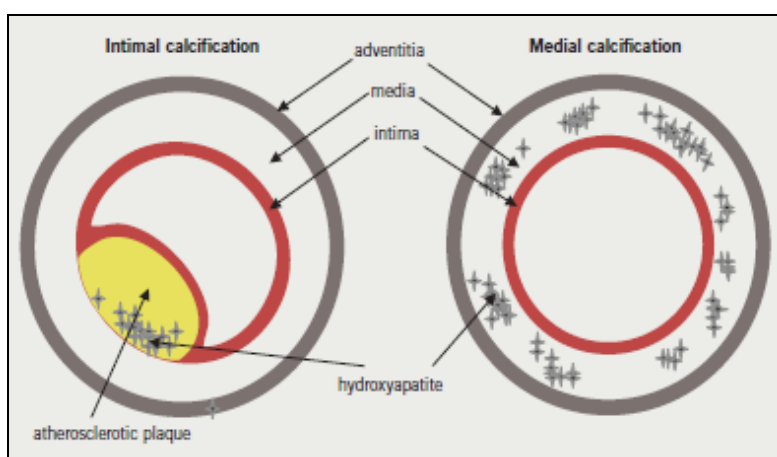


Figura 2. Estructura simplificada de los vasos sanguíneos y los tipos de calcificaciones¹⁰.

El calcio, al precipitar junto al fosfato, disminuye sus niveles en sangre y se produce hipocalcemia. La HPT se encarga de regular los niveles de calcio y fosfato. Si hay deficiencia de calcio, capta calcio de los huesos haciendo que se pierda masa ósea. La enfermedad de pérdida de hueso debida a insuficiencia renal crónica se llama osteodistrofia renal. De esta manera, el paciente, aparte de sufrir IRC, hiperfosfatemia e hipocalcemia, padece problemas en la circulación de la sangre y en los huesos. Pero, aparte de contribuir a la pérdida de masa ósea, la hormona se ve alterada por todos estos cambios, se convierte en insensible a los niveles de calcio, y provoca un excesivo transporte de calcio a la sangre que desemboca a hipercalcemia. Para mitigar este proceso, llamado hiperparatiroidismo secundario, dichos pacientes son tratados con calcimiméticos que son fármacos utilizados para disminuir los niveles de HPT¹⁰. Por otro lado, hay otras sustancias que regulan la homeostasis del calcio y/o fósforo que son la vitamina D y la hormona FGF-23 y se han de tener muy en cuenta sus niveles a la hora de tratar a los enfermos.

La vitamina D se encarga de la absorción de ambos y de la formación de hueso a partir de éstos. Los órganos encargados de activarla son los riñones y el hígado. Por este motivo, la cantidad de vitamina D que debe consumir un paciente de diálisis debe estar estrictamente controlada ya que por una parte es necesaria pero por otra puede agravar la hiperfosfatemia. La vitamina D puede ser activada en el cuerpo a partir de colecalciferol, al recibir rayos ultravioleta, por lo que la exposición a la luz solar debe ser controlada. Finalmente, la

vitamina D inhibe la secreción de HPT, por lo que su administración debe ser controlada minuciosamente.

La hormona FGF-23 (*fibroblast growth factor 23*) se encarga de la regulación del fósforo. Es secretada por los osteocitos cuando hay altos niveles de la forma activa de la vitamina D (calcitriol). Disminuye la expresión de un cotransportador sodio-fosfato en el túbulo proximal¹², es decir, en una parte de la nefrona que es la que se encarga de filtrar la sangre en el riñón. Por tanto, esta hormona evita la reabsorción de P y aumenta su excreción cuando hay niveles elevados de éste. Además, también reduce la activación de la vitamina D, con lo que disminuye la absorción intestinal de fósforo y calcio, e inhibe la secreción de HPT¹³.

3. Quelantes de fósforo (P-binders)

3.1. ¿Qué son?

Los quelantes de fósforo, conocidos también como *phosphate binders* o *P-binders* (en inglés), son fármacos encargados de interactuar con el fosfato ingerido para formar un producto insoluble en el tracto gastrointestinal antes de que se absorba principalmente en el intestino delgado¹⁴. Al no absorberse y, en consecuencia, no ser transportado a la sangre, se excreta a través de las heces.

3.2. Mecanismo de acción

Los quelantes de fósforo se enlazan al fosfato en el tracto gastrointestinal haciendo que el producto formado insoluble no interaccione de manera eficaz con las proteínas transportadoras de la membrana de las células intestinales. Estas células son conocidas como enterocitos y se encargan de absorber las sustancias deseables para la homeostasis del organismo y transportarlas al torrente sanguíneo. Al no producirse la absorción, el fosfato quelado sigue a través del tracto gastrointestinal hasta ser excretado por las heces. El fosfato se absorbe rápido a partir de los alimentos, por tanto los quelantes se han de tomar de forma concomitante con las comidas¹⁵.

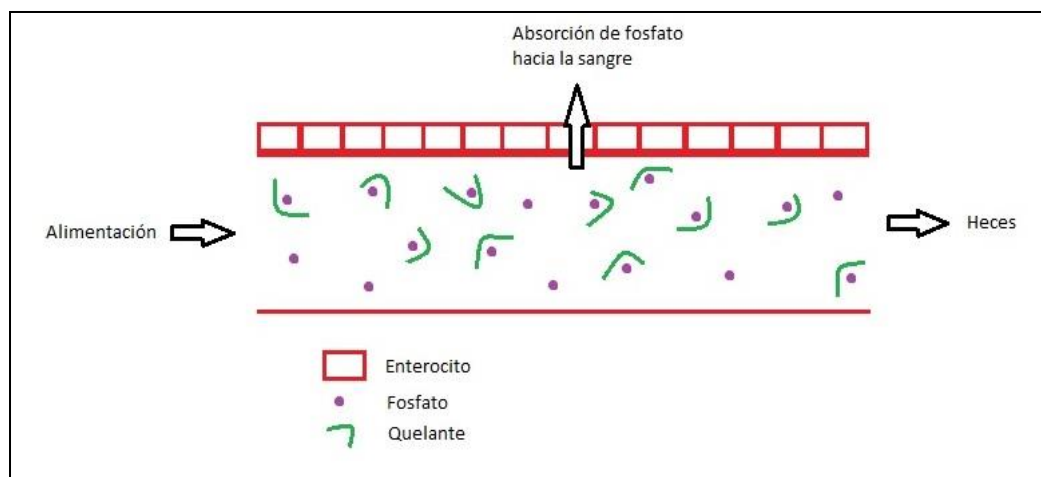


Figura 3. Mecanismo de acción de los quelantes de fosfato en el intestino.

3.3. Uso de los P-binders en insuficiencia renal

La primera medida en pacientes con hiperfosfatemia consiste en modificar la dieta para controlar la ingesta de fósforo. Sin embargo, esta medida es insuficiente para una correcta homeostasis y, adicionalmente conlleva un riesgo de desnutrición. Por tanto, una estrategia para regular los niveles de fosfato en sangre en pacientes que sufren IRC en estadio 5 (con tratamiento de diálisis), o a veces también de aquellos con función renal normal, es la terapia con quelantes de fósforo¹⁶. Al excretar mayor cantidad de fosfato hace que se pueda absorber más calcio en los enterocitos. Más del 25 % de los pacientes en diálisis todavía tienen niveles de fósforo en sangre por encima del rango normal a pesar de utilizar quelantes¹⁷.

Existen numerosos quelantes de fosfato que se han sintetizado y probado experimentalmente en diferentes investigaciones. Al principio se empezó utilizando quelantes basados en calcio; su eficiencia a nivel de control de la fosfatemia es adecuada, pero existe preocupación entorno a su utilización debido al aporte de calcio que provocan y su efecto sobre la calcificación cardiovascular en general y arterial en particular. Si bien siguen usándose en más del 40 % de enfermos de diálisis, se han buscado otras alternativas¹⁸ y siguen abiertas líneas de investigación para hallar nuevas sustancias con un perfil adecuado. Sin embargo, aún no

existen estudios regulatorios que demuestran que la reducción de fosfato en sangre de enfermos renales mediante tratamiento farmacológico reduce la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Si bien existe una correlación directa y se sabe que altos niveles de fosfato aumentan el riesgo de mortalidad, no se ha demostrado todavía que una reducción de la fosfatemia pueda prolongar la vida, pero sí que hay una asociación entre la supervivencia y el tratamiento con quelantes de fósforo¹⁹. En la siguiente figura 4 se ve que hay una relación de mayor supervivencia de los pacientes con altos niveles de fósforo en sangre si toman quelantes de fósforo para disminuirlos.

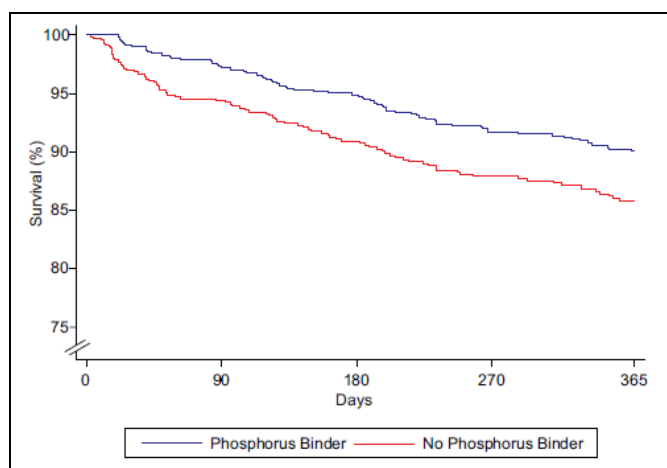


Figura 4. Relación entre la supervivencia de los pacientes con IRC tratados y no tratados con quelantes de fósforo frente al tiempo.

Tampoco hay certeza absoluta sobre si el tratamiento con quelantes debe ser estadios más tempranos o tardíos de la IRC. Su utilización por parte de nefrólogos se ve a veces impedida por el alto coste que supone y por un tema de prioridad respecto a otras intervenciones.

Por definición cualquier quelante de fosfato reducirá los niveles de fósforo en sangre. La elección de cuál utilizar puede depender de otros factores, tales como el coste, la tolerabilidad, la dosis, la preferencia del paciente y otros beneficios potenciales asociados con ciertos agentes^{17,20}. Lo que realmente se sabe es que la reducción es importante para el caso de hiperfosfatemia extrema ya que produce hiperparatiroidismo secundario (aumento de la HPT como consecuencia de la disminución de calcio y vitamina D en sangre) y calcificación cardiovascular.

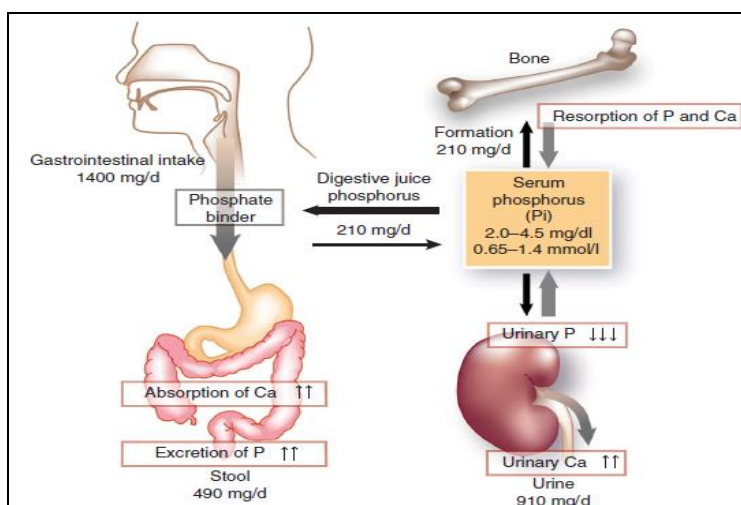


Figura 5. Efecto de los quelantes de fosfato en el cuerpo.

Para poder ver realmente qué lugar tienen actualmente los quelantes de fosfato en algunos países del mundo, se muestran en la siguiente gráfica los datos recogidos por el estudio DOPPS (*Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study*) en el 2011²¹, que son los últimos datos disponibles.

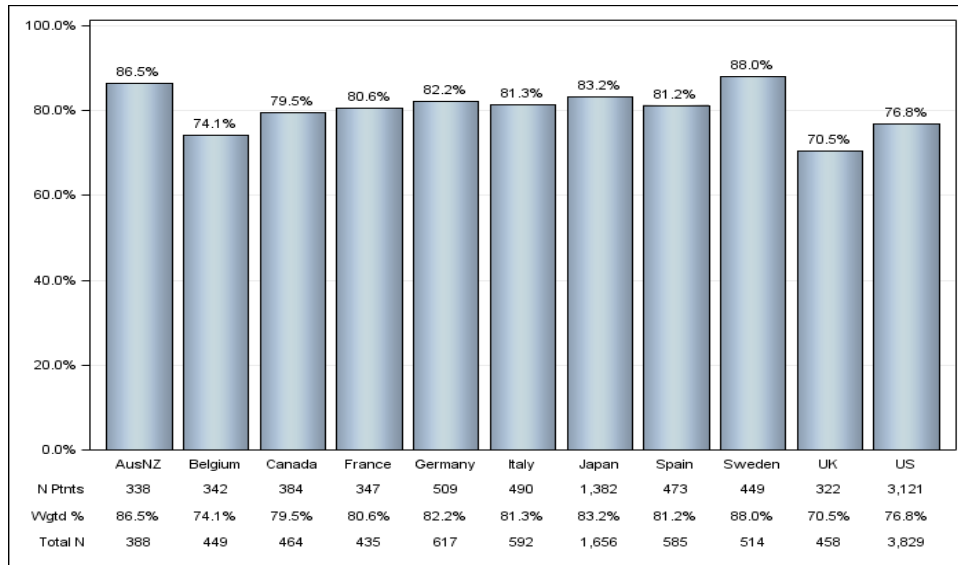


Figura 6. Uso mundial de los P-binders.

Como se puede observar en la figura 6, son muy utilizados en los diferentes países desarrollados. Los países que utilizan más este tipo de fármacos son Suecia (88 %) y Australia y Nueva Zelanda (86,5 %), mientras que Bélgica (74,1 %) y Reino Unido (70,5 %) su uso es sensiblemente menor, a pesar de continuar siendo de uso masivo. Nuestro país está en la media con un 81,2 % de uso en pacientes tratados con diálisis.

3.4. Principales P-binders

Hay numerosos P-binders en el mercado actualmente, cada uno con sus propias características y propiedades. Se suelen clasificar de acuerdo a la presencia o ausencia de elementos metálicos en su estructura, y dentro del grupo de los metálicos, en los que contienen calcio (Ca) y los que no contienen Ca.

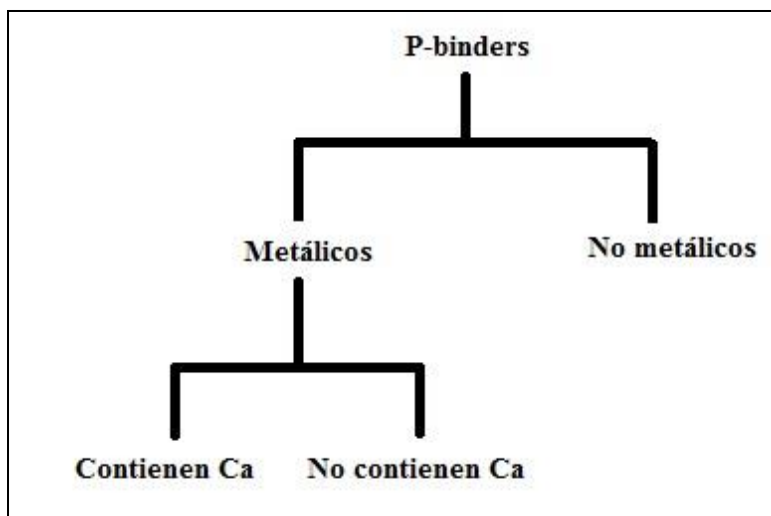


Figura 7. Clasificación de los diferentes tipos de P-binders.

3.4.1. Metálicos

3.4.1.1. Metálicos con Ca

A pesar de que los quelantes basados en calcio pueden acelerar el proceso de calcificación cardiovascular, su uso sigue siendo mayoritario debido a su bajo coste económico.

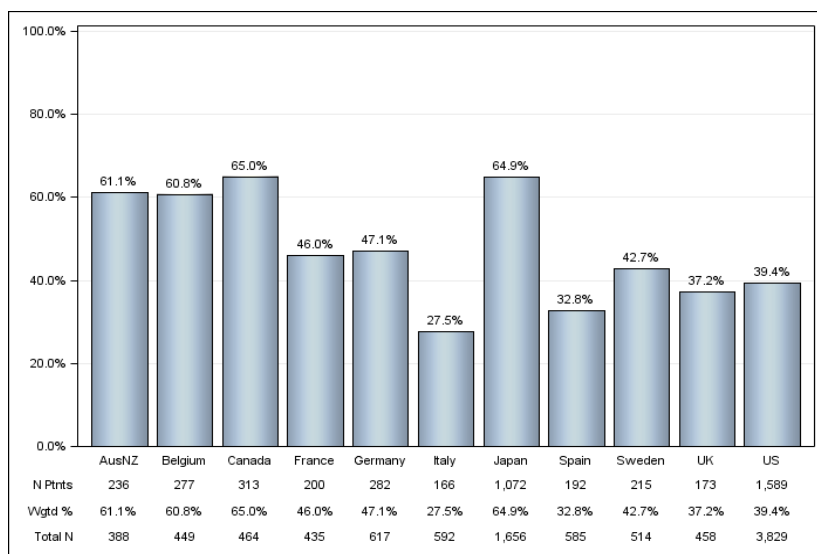


Figura 8. Uso mundial de los quelantes de fósforo basados en calcio.

La tabla siguiente pone en la balanza beneficio-riesgo algunos de los principales quelantes de fósforo basados en calcio que se utilizan en el mercado.

Tabla 2. Riesgos y beneficios de los principales quelantes de fósforo basados en calcio.

| Quelantes | Riesgos | Beneficios |
|--|--|---|
| Acetato de calcio ^{22,23,26} | <ul style="list-style-type: none"> - Hipercalcemia - Supresión excesiva de HPT - Asociado con calcificación vascular - Efectos secundarios gastrointestinales - Dosis elevada | <ul style="list-style-type: none"> - Tratamiento de primera línea actual - Relativamente barato - Eficaz en hiperfosfatemia |
| Carbonato de calcio ^{24,26} | <ul style="list-style-type: none"> - Hipercalcemia - Supresión excesiva de HPT - Asociado con calcificación vascular - Efectos secundarios gastrointestinales - Dosis elevada | <ul style="list-style-type: none"> - Tratamiento de primera línea actual - Barato - Eficaz (menos que el acetato de calcio) en hiperfosfatemia |
| Carbonato de magnesio/Acetato de calcio ^{25,26} | <ul style="list-style-type: none"> - Efectos secundarios gastrointestinales - Incremento del Mg sérico - Necesita frecuente monitoreo de seguridad | <ul style="list-style-type: none"> - Eficaz en hiperfosfatemia - Barato |

Los quelantes metálicos sin calcio, suelen contener Fe, La, Al o Mg principalmente. Algunos de ellos pueden causar otro tipo de problemas diferentes a los que causan los basados en Ca. Por este motivo y por su mayor coste no suelen utilizarse como primera línea de tratamiento. En Bélgica y Japón no se usan este tipo de quelantes y Estados Unidos, Francia y Suecia lo hacen de manera muy excepcional. España es de los países que más utilizan quelantes basados en aluminio y en magnesio junto con Australia y Nueva Zelanda, ya que en estos países hay restricciones de los costes de los medicamentos y no les permite usar quelantes libres de calcio y aluminio²¹.

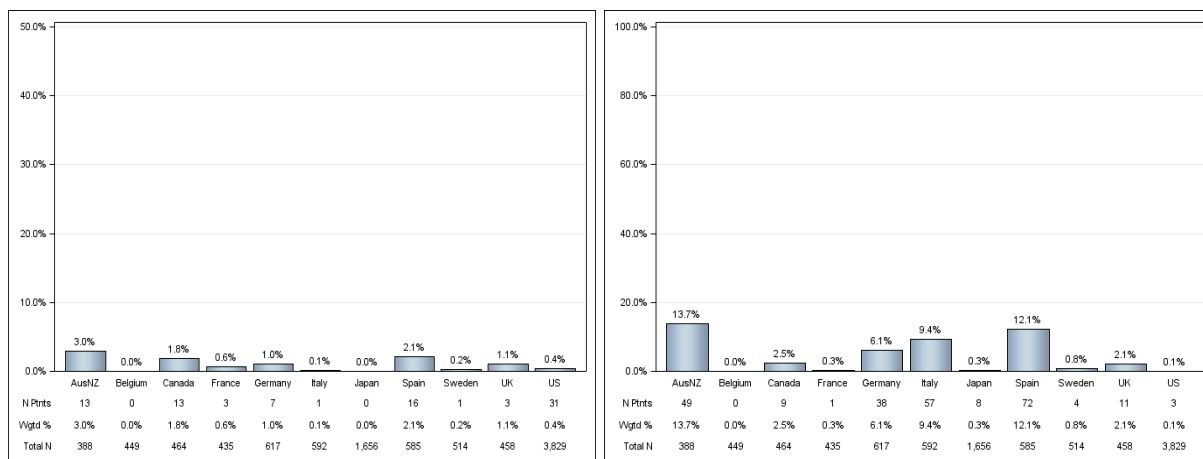


Figura 9 y 10. Uso mundial de los quelantes de fósforo basados en aluminio (izquierda) y magnesio (derecha).

La tabla siguiente resume algunas de las características de los principales quelantes de fósforo metálicos sin Ca.

Tabla 3. Riesgos y beneficios de los principales quelantes de fósforo con elementos metálicos sin Ca.

| Quelantes | Riesgos | Beneficios |
|---|---|---|
| Oxohidróxido sucroférico (PA-21) ^{16,27} | <ul style="list-style-type: none"> - Efectos secundarios gastrointestinales | <ul style="list-style-type: none"> - Menor cantidad de píldoras diarias - Eficaz en hiperfosfatemia - Libre de calcio y aluminio - No afecta a los parámetros hematológicos |
| Carbonato de lantano ^{15,20,26} | <ul style="list-style-type: none"> - Caro - Preocupación por la acumulación de lantano en los tejidos corporales - Dosis de píldora - Hipercalcemia - Efectos secundarios gastrointestinales - Calambres - Mialgia - Edema periférico | <ul style="list-style-type: none"> - Eficacia independiente del pH - Libre de calcio y aluminio - Dosis baja de píldora - Apetecible, pastilla masticable - Seguro |
| Hidróxido de aluminio ^{20,26} | <ul style="list-style-type: none"> - Asociado a enfermedades óseas (osteomalacia), demencia y otras. - Necesita frecuente monitoreo de seguridad - Seguridad del nivel de dosis en cuestión | <ul style="list-style-type: none"> - Eficaz en hiperfosfatemia - Barato - Libre de calcio |
| Hidróxido de magnesio ^{20,26} | <ul style="list-style-type: none"> - Efectos secundarios gastrointestinales - Hipermagneseemia - Alteración de la absorción de hierro por vía oral | <ul style="list-style-type: none"> - Eficaz en hiperfosfatemia - Barato - Libre de calcio y aluminio |

Existen otros quelantes de fósforo con elementos metálicos sin calcio que son también utilizados, algunos de los cuales se listan a continuación:

- Fermagato²⁸ ($[\text{Mg}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_{12}]\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- SBR-759²⁹ (Hierro (III) polimérico)
- PT20³⁰ (Adipato de óxido férrico)
- JTT-751³¹ (Hidrato de citrato férrico)
- C-PAM-10³² (maghemita nanocristalina)
- Fe-EDA-SAMMS³³ (hierro-etilendiamina sobre sílice nanoporosa)
- Sucralfato³⁴

3.4.2. No metálicos

Los quelantes de fósforo no metálicos más usados son el clorhidrato y carbonato de sevelamer, siendo el clorhidrato el más utilizado entre todos los no metálicos. Al no haber presencia de metales, no causan hipercalcemia, hipermagnesemia, osteomalacia y demás enfermedades derivadas de éstos. Suecia, el país con mayor frecuencia de uso de quelantes, es también el que más utiliza el sevelamer en comparación con los demás países. En cambio, se ve que algunos de los siguientes países que más los usaban, en este caso no son muy partidarios de su uso. España está entre los que más confían en este fármaco¹⁹.

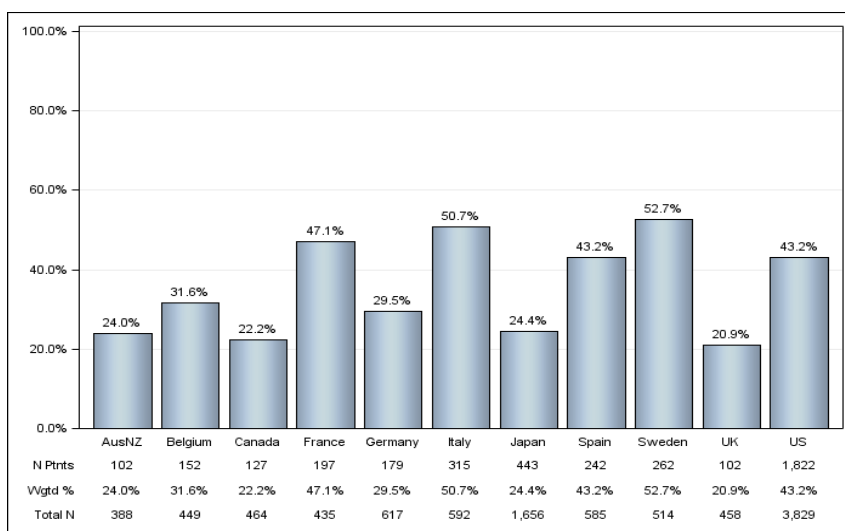


Figura 9. Uso mundial del sevelamer.

3.4.2.1. Clorhidrato de sevelamer

Es una resina polimérica de intercambio aniónico en forma de cloruro débilmente básica y que también enlaza el fosfato por medio de enlaces de hidrógeno. Reduce el colesterol y lipoproteínas de baja densidad. Tiene un efecto antiinflamatorio general. Tiene el riesgo de producir acidosis metabólica y enlazarse a vitaminas liposolubles. Su eficacia es elevada y es relativamente costoso^{26,35}.

3.4.2.2. Carbonato de sevelamer

Es una forma mejorada del clorhidrato de sevelamer porque evita la acidosis metabólica. El carbonato de sevelamer es un polvo para suspensión oral y presenta una novedosa alternativa para el paciente tratado con quelantes de fósforo en forma de tableta. Tiene la misma seguridad y eficacia que el clorhidrato, pero tiene menos efectos secundarios del tracto gastrointestinal³⁵.

3.4.2.3. Colestipol

Es una resina de intercambio aniónico resultado de la copolimerización de AEDT y epiclrorhidrina. Su síntesis es fácil y barata y tiene menor riesgo de acidosis en comparación con el clorhidrato de sevelamer. Este compuesto también es utilizado para reducir el colesterol ya que se une a los ácidos biliares y al impedir su reabsorción, el colesterol se transforma en ácidos biliares³⁶.

3.4.2.4. Colestilan

Es una resina de intercambio aniónico sintetizado por copolimerización de 2-metilimidazol y epiclrorhidrina. Tiene menor riesgo de acidosis en comparación con el clorhidrato de sevelamer. También es utilizado para reducir el colesterol ya que se une a los ácidos biliares¹⁷.

2.4.2.5. Bixalomer

Es un polímero que se une al fosfato por enlaces iónicos y de hidrógeno a través de un grupo amino con carga positiva. Muestra baja absorción de ácidos biliares, ácidos grasos y fosfolípidos. A diferencia del clorhidrato de sevelamer, el bixalomer no contiene cloruros y evita la acidosis metabólica. Además presenta menos efectos secundarios gastrointestinales que el sevelamer. Es un quelante prometedor para el tratamiento a largo plazo¹⁸.

3.4.2.6. VS-501

Es un derivado de un polímero natural de una planta que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria. Provoca menos efectos secundarios gastrointestinales que el sevelamer. Y debido a su alta densidad se necesita menor cantidad en comparación al sevelamer³⁷.

3.5. Determinación analítica

La determinación analítica de quelantes de fósforo en muestras biológicas se da en el suero de la sangre y únicamente se analizan los cationes de los quelantes metálicos ya que las resinas no son absorbidas en el tracto gastrointestinal debido a su gran tamaño. De hecho, la farmacocinética clásica, que supone un elemento de gran importancia para la comprensión de la farmacología de los diferentes medicamentos, pierde relevancia en el caso de los quelantes de fósforo, pues su acción tiene lugar en el tracto gastrointestinal y es deseable que su absorción sea mínima, pues de esta forma se evitan posibles efectos secundarios. Sin embargo, aunque no sea habitual en el desarrollo clínico, en modelos preclínicos, es posible seguir la farmacocinética del fármaco, marcando el producto radioactivamente y siguiendo la emisión radioactiva a diferentes puntos de tiempo en diferentes órganos y tejidos.

En el caso de quelantes de fósforo que contienen calcio y magnesio, al tratarse de cationes presentes en la sangre, se comprueba con técnicas analíticas de rutina si sus niveles son anormalmente altos. El calcio existe principalmente en el suero sanguíneo, en tanto que los glóbulos rojos contienen muy pequeñas cantidades. El calcio y el magnesio en el suero pueden existir, en parte, ionizados, pero en mayor proporción, formando complejos. Cuando se dializa o ultrafiltra el suero, sólo una parte de ambos atraviesan la membrana. Este calcio y magnesio dializables pertenecen a los ionizables y una parte a los complejados. La mayor parte del calcio y magnesio existentes en forma de complejos están unidos a proteínas y, por tanto, no se difunden a través de las membranas. Determinando el calcio y magnesio dializables se hallan los existentes en forma iónica y los que están unidos a compuestos orgánicos de bajo peso molecular. El calcio y magnesio ionizables se pueden determinar, por valoración, por precipitación, o por reacción con colorantes, pues todas las reacciones en las que se combinen los iones suponen una intervención en los equilibrios existentes. Al disminuir el contenido en calcio y magnesio libres se restituirán los equilibrios correspondientes formando más iones a partir de los complejos. Por tanto, al tratar el suero

con una disolución de oxalato, primero precipitan los existentes en forma iónica. A continuación se libera calcio y magnesio a expensas de los complejados y precipita a su vez con el oxalato. Esta reacción prosigue hasta que ha precipitado la mayor parte del calcio y magnesio. Sin embargo, una parte del calcio sérico está tan firmemente unido a las proteínas que no se puede arrancar en medio neutro por el oxalato. Principalmente existen 2 posibilidades para determinar el calcio en el suero³⁸:

1) Precipitación del calcio y magnesio como oxalato en el suero nativo o desproteínizado y valoración del precipitado disuelto.

2) Valoración directa del calcio y magnesio en el suero nativo o desproteínizado.

El método a elegir dependerá de las exigencias. Cuando sólo se quiere tener una idea sobre el nivel de calcio y magnesio en el suero, sin precisar una especial exactitud, podrá valorarse directamente el calcio y magnesio en el suero. Cuando sea preciso alcanzar una exactitud especialmente grande, habrá que desproteínizar el suero, precipitar el calcio y magnesio en la disolución obtenida y valorarlos una vez que se haya disuelto el precipitado originado.

El hierro sérico se valora con AEDT a pH 2-3 ya que en estas condiciones forma un complejo muy estable, aunque haya presencia de Cu, Ni, Ca, Mn y Mg, sin interferencia de éstos porque forman complejos muy débiles³⁸.

Se puede determinar el lantano sérico mediante un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)³⁹ y el aluminio con un espectrómetro de absorción atómica electrotrémico (ETAAS)⁴⁰.

4. Modelos experimentales para el estudio de los P-binders

4.1. In vitro

4.1.1. Capacidad de unión de fosfato

En este modelo experimental, se prueba la capacidad de los quelantes para adsorber/precipitar fosfatos a diferentes valores de pH, ya que el quelante cuando esté en el organismo está expuesto a distintas condiciones de pH según la zona del tracto gastrointestinal. El método consiste en la incubación del quelante en una disolución de hidrogenofosfato de sodio (40 mM). Con el objetivo de mantener la homogeneidad de la suspensión durante todo el ensayo, se trabaja con agitación constante y todo el sistema se termostatiza a 37 °C durante 2 ó 3 horas^{32,41} con el objetivo de trabajar en condiciones lo más cercanas a las fisiológicas. Una vez se ha completado la etapa de incubación, se filtra el quelato formado y el P no quelado se determina mediante el método del azul de molibdeno. La diferencia entre el P inicial y el no quelado permite calcular la cantidad de P quelado, y por tanto la capacidad del *P-binder* de unirse a fosfato. La determinación analítica del P libre se basa en la formación de un complejo de molibdeno con fosfato en medio ácido que luego, mediante un reductor (ej.: SnCl₂), forma óxidos de molibdeno que presentan un color azul, más intenso o menos, dependiendo de la concentración de P. El azul de molibdeno presenta el máximo de absorción en 660 nm. Se ha de trabajar en condiciones muy controladas y leer la absorbancia de las disoluciones en un periodo de tiempo fijo puesto que su lectura cambia con el tiempo³².

Si en lugar de hacer el seguimiento del fosfato se miden las concentraciones de *P-binder*, se puede utilizar la fórmula siguiente para medir la capacidad de unión a fosfato^{33,42}.

$$r = \frac{(L_i) - (L)}{W_p} * V_t$$

Donde r son los mmoles de quelato por gramo de quelante, [L_i] es la concentración inicial de quelante (mmol/l), L es la concentración medida de quelante (mmol/l), V_t es el volumen de líquido en el recipiente y W_p es la masa de quelante.

4.1.2. Simulación del paso gastrointestinal

Una mejora del método anterior, permite simular la capacidad de unión a fosfato exponiendo el *P-binder* a diferentes condiciones de pH, del mismo modo que ocurre en el tracto gastrointestinal. De esta forma, y basándose en el mismo principio que el método anterior, se incuba el quelante en estudio con hidrogenofosfato de sodio (40 mM). El pH del medio se ajusta inicialmente a 1,2 (condiciones estomacales) mediante un titulador automático a baja agitación a 37 °C. El pH se va aumentando en diferentes puntos de tiempo hasta que se llega a pH 7,5, condiciones en la parte final del intestino grueso. Se toman alícuotas en diferentes puntos de tiempo, las cuales se filtran y se determina el fosfato no quelado en la disolución filtrado, permitiendo calcular la capacidad quelante en los diferentes puntos de tiempo, utilizando el mismo método del azul de molibdeno³² descrito en el apartado anterior.

4.1.3. Potencial Z

El potencial Z es una herramienta adicional a las dos descritas en los apartados anteriores. Una vez calculada la capacidad quelante por alguno de los dos métodos anteriores, es posible medir la movilidad electroforética de las partículas de quelante a diferentes valores de pH. Esta técnica permite en primer lugar calcular el tamaño de partícula (quelato de fósforo) formado e investigar la carga superficial de dichas partículas en el tracto gastrointestinal. Con la movilidad electroforética se determina el potencial Z mediante la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon} \mu_e$$

Donde ζ es el potencial Z, η es la viscosidad del medio, ε es la permitividad dieléctrica y μ_e es la movilidad electroforética^{32,43}.

4.2. In vivo

Nos referimos en este apartado a modelos animales, excluyendo los modelos clínicos. Los modelos animales para determinar la eficacia de los quelantes de fósforo se basan generalmente en el trabajo con ratas o ratones, y en menor medida en gatos⁴⁴.

Los modelos más usados con diferencia son los modelos de rata. Para poder evaluar el efecto de quelantes de fósforo se requieren modelos que provoquen hiperfosfatemia. Si bien la hiperfosfatemia se puede conseguir con dosis elevadas de vitamina D, dicho modelo trabaja con función renal normal, por lo que sus resultados serían menos extrapolables a la práctica clínica.

Por este motivo, es preferible trabajar con modelos de uremia, donde se induce la insuficiencia renal a los animales, la cual provoca hiperfosfatemia. La insuficiencia renal puede inducirse de diversas formas, aunque lo más habitual es utilizar los modelos de nefrectomía parcial^{45,46} o bien el modelo de adenina^{25,44}.

La nefrectomía parcial^{45,46} consiste generalmente en la extirpación de un riñón del animal y la eliminación de dos tercios del otro riñón. Este modelo de reducción de masa renal se conoce con el nombre de nefrectomía 5/6. Al tener una función renal disminuida, los animales desarrollan una insuficiencia renal que se refleja en el incremento de los niveles plasmáticos de creatinina y en un incremento de la calcemia y la fosfatemia, pues la masa renal resultante no tiene capacidad para filtrar eficazmente la sangre.

En los modelos de adenina^{25,47} se administra este producto por vía oral. La adenina es metabolizada por la rata y uno de sus metabolitos se elimina por vía renal, con la particularidad de que a su paso por las nefronas del riñón dicho metabolito cristaliza rompiendo físicamente el tejido renal y provocando una insuficiencia renal crónica. Aunque la inducción de la insuficiencia renal es diferente a la del modelo de nefrectomía, el efecto final es el mismo, conduciendo a un incremento de los niveles plasmáticos de creatinina, calcio y fósforo, permitiendo en consecuencia el estudio del efecto de los *P-binders* sobre la hiperfosfatemia.

Una vez se tiene el modelo puesto a punto, se recogen muestras de sangre a diferentes puntos de tiempo y se cuantifica el fosfato en la sangre. Estas determinaciones suelen hacerse habitualmente por métodos colorimétricos^{25,45,46,47}, siendo el método del fosfomolibdato el más usado, en su versión de kit comercial. En algún caso se ha descrito la utilización del ICP-AES (*Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy*)⁴¹.

5. Trabajo experimental con uno de los modelos *in vitro*

En este apartado se explica el trabajo experimental desarrollado para implementar uno de los métodos *in vitro* descritos anteriormente en el capítulo 3.1.1., consistente en medir la capacidad de unión de fosfato de diferentes quelantes de fósforo. Para el desarrollo de este modelo *in vitro* se ha trabajado con 3 quelantes de fósforo: hidróxido de aluminio, carbonato de lantano y carbonato de calcio.

Para cada uno de ellos se han elegido 3 valores de pH para medir esta capacidad quelante: 3, 5,5 y 8, valores que se hallan dentro del rango de pH fisiológico a lo largo del paso por el tracto gastrointestinal.

Este trabajo pretende reproducir uno de los apartados descritos en la publicación de Nguyen et al 2014 con el objetivo de trabajar con una investigación de publicación reciente y complementar el trabajo bibliográfico realizado para la presentación de esta memoria de trabajo de fin de grado.

5.1. Material y reactivos

El material y los reactivos necesarios para este experimento se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Material y reactivos utilizados en el experimento.

| Material | Reactivos |
|---|---|
| Matraces aforados de 100, 500 y 1000 ml | Ácido clorhídrico concentrado (Scharlab SL, Sentmenat, España) |
| Pipeta aforada de 50 ml | Molibdato amónico (Probus SA, Badalona, España) |
| Pipetas automáticas de 1 y 5 ml y puntas de plástico | Hidrogenofosfato de sodio (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) |
| Vasos de precipitados de 100, 600 y 1000 ml | Dihidrogenofosfato de potasio (Probus SA, Badalona, España) |
| Botella de 100 ml de color topacio | Ácido nítrico concentrado (Scharlab SL, Sentmenat, España) |
| Vidrios de reloj, pesasustancias, espátula | Cloruro de estaño (II) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) |
| Jeringa de plástico de 1 ml y filtros para jeringa de 0,45 µm | Hidróxido de aluminio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) |
| Pipetas Pasteur de plástico | Carbonato de lantano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) |
| Imanes, agitadores magnéticos, estufa | Carbonato de calcio (Panreac Química SA, Montcada i Reixac, España) |

5.2. Metodología

5.2.1. Incubación del quelante de fósforo con la disolución de fosfato

En primer lugar, se prepara una disolución de dihidrogenofosfato de sodio 40 mM. Esta disolución se ajusta al pH deseado para luego incubar en la estufa a 37 °C. Mediante agitadores magnéticos se agita constantemente las disoluciones con distintas cantidades del quelante en estudio. Para ello se pesan con exactitud alrededor de 1, 10, 100 y 1000 mg de cada uno de los *P-binders* que se pretenden estudiar.

Tras 2 horas exactas de incubación se recoge una alícuota de la suspensión, se filtra con filtros de 0,45 μm y se realiza la determinación del fosfato no quelado.

5.2.2. Determinación colorimétrica del fosfato mediante el método del fosfomolibdato

Se introducen 100 μl del filtrado anterior en matraces de 100 ml. A los matraces se les añade 10 ml de una disolución de molibdato amónico tetrahidratado ($1,21 \cdot 10^{-2}$ M), 2 ml de disolución de cloruro estannoso dihidratado ($3,55 \cdot 10^{-2}$ M) y enrasando con agua desionizada. Pasados 20 minutos después de preparar las disoluciones, se miden sus absorbancias a 660 nm mediante un espectrofotómetro UV-visible (UV-mini 1240, Shimadzu). A este tiempo las absorbancias están estabilizadas y se minimiza el error de la variación de las absorbancias con el tiempo. Se ha estudiado la variación de las lecturas de absorbancia con el tiempo usando uno de los quelantes, con el fin de demostrar esta estabilización.

La disolución de molibdato amónico se prepara disolviendo 15 g de molibdato amónico tetrahidratado calentándolo en agua y, una vez disuelto, añadiendo 350 ml de HCl concentrado y enrasando hasta un litro.

Para la preparación de la disolución de cloruro estañoso añadida se prepara una disolución madre. Esta disolución concentrada consta de 8 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 50 ml de HCl concentrado. De ésta se añaden 5 ml en un matraz de 100 ml y se enrasa con agua desionizada.

La recta de calibrado se prepara diariamente con disoluciones desde 0 hasta 1,5 ppm de fósforo. Estas disoluciones son preparadas introduciendo la misma cantidad de molibdato amónico y cloruro estañoso que las demás pero con distintas cantidades de una disolución de KH_2PO_4 (50 ppm de fósforo).

5.2.3. Determinación del fosfato por ICP-AES

Con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos por colorimetría, se ha llevado a cabo una determinación alternativa de fosfato a través del fósforo total medido por espectroscopia de emisión atómica utilizando un plasma de acoplamiento inductivo (en inglés: *inductively coupled plasma* o *ICP*). Se añade 100 μl del filtrado en matraces de 100 ml, 2 ml de HNO_3 concentrado y se enrasan con agua desionizada. El ICP⁴⁸ consiste en 3 tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen corrientes de argón. Rodeando la parte superior del tubo más exterior se encuentra una bobina de inducción, refrigerada por agua, que está alimentada por un generador de radiofrecuencia. La ionización del argón que fluye se inicia por medio de una chispa que proviene de una bobina Tesla. Una vez que se han formado los iones de argón en un plasma, son capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura a un nivel tal que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente; la temperatura puede llegar a ser de 10.000 K. El dispositivo utilizado para la inyección de la muestra es un nebulizador neumático, aunque pueden ser mediante otros métodos.

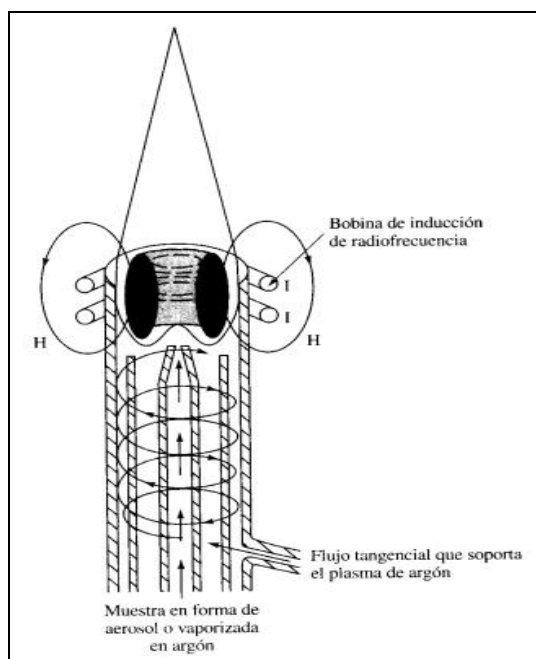


Figura 10. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo.

En esta parte del trabajo experimental se ha trabajado con un ICP-AES de Perkin-Elmer modelo 2000. Mediante un software adecuado se introducen las concentraciones de las disoluciones patrón y se indica la posición de las muestras y el elemento o elementos que se desean analizar (fósforo en este caso).

5.3. Resultados y discusión

En primer lugar se ha estudiado el efecto del tiempo en la lectura de las absorbancias de las disoluciones en el método del azul de molibdeno desde su preparación. Se ha demostrado que a partir de los 10 minutos la lectura la absorbancia apenas varía.

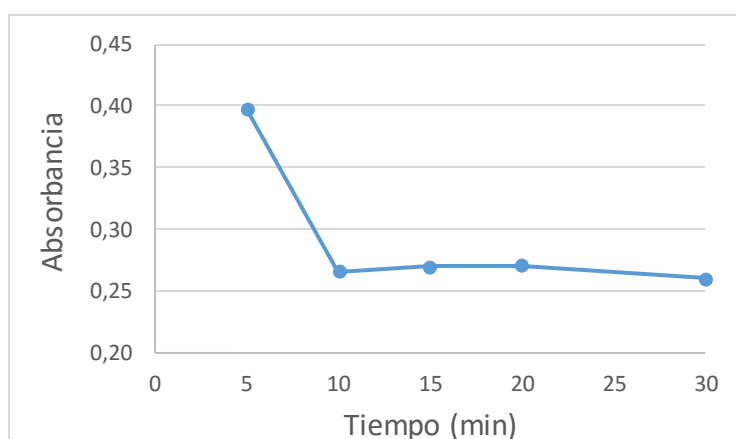


Figura 11. Variación de las absorbancias frente al tiempo en el método del azul de molibdeno.

En el estudio de la eficacia de los diferentes quelantes se ha decidido efectuar las lecturas de absorbancia a los 20 minutos para mantener el mismo protocolo que en la publicación de referencia³².

Aplicando el protocolo descrito en Nguyen et al³², utilizando el método del azul de molibdeno, se han obtenido los siguientes resultados:

Tabla 5. Porcentaje de fósforo quelado por diferentes P-binders en función del pH, utilizando el método del azul de molibdeno.

| Quelante | mg quelante | pH | % P quelado | pH | % P quelado | pH | % P quelado |
|---|-------------|----|-------------|-----|-------------|----|-------------|
| Al(OH) ₃ | 1 | 3 | - | 5.5 | - | 8 | - |
| | 10 | | - | | 4.3 | | - |
| | 100 | | 10.5 | | 20.1 | | 1.3 |
| | 1000 | | 97.0 | | - | | - |
| La ₂ (CO ₃) ₃ | 1 | 3 | 2.8 | 5.5 | 2.4 | 8 | 7.1 |
| | 10 | | 6.2 | | - | | 8.9 |
| | 100 | | 29.0 | | 22.6 | | 12.2 |
| | 1000 | | 59.2 | | - | | - |
| CaCO ₃ | 1 | 3 | 3.2 | 5.5 | - | 8 | 1.6 |
| | 10 | | 29.0 | | 11.0 | | 3.3 |
| | 100 | | 64.5 | | - | | 19.9 |
| | 1000 | | 82.1 | | - | | - |

Los vacíos en la tabla representan valores que experimentalmente han dado negativos, por lo que a efectos de interpretación se considera que no ha habido quelación de fosfato.

A pH=3 se observan valores razonables de porcentajes de quelación; sin embargo, a valores superiores de pH los resultados son erráticos y poco interpretables, debido probablemente a interferencias espectrales en el método colorimétrico. Por ello, se cuantificó el fosfato en las mismas disoluciones a través de la determinación del fósforo total mediante ICP-AES³³, que es un método mucho más robusto y donde las interferencias son menos probables.

Los resultados obtenidos mediante ICP-AES se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 6. Porcentaje de fósforo quelado por diferentes P-binders en función del pH, cuantificando el P por ICP-AES.

| Quelante | mg quelante | pH | % P quelado | pH | % P quelado | pH | % P quelado |
|---|-------------|----|-------------|-----|-------------|----|-------------|
| Al(OH) ₃ | 1 | 3 | 8.2 | 5.5 | 1.2 | 8 | 0.3 |
| | 10 | | 7.4 | | 3.8 | | - |
| | 100 | | 26.6 | | 20.3 | | 12.5 |
| | 1000 | | 88.6 | | 81.7 | | 63.2 |
| La ₂ (CO ₃) ₃ | 1 | 3 | 6.5 | 5.5 | 3.1 | 8 | 0.2 |
| | 10 | | 10.2 | | 3.9 | | 3.7 |
| | 100 | | 36.0 | | 23.4 | | 6.8 |
| | 1000 | | 74.8 | | 69.6 | | 26.6 |
| CaCO ₃ | 1 | 3 | - | 5.5 | - | 8 | - |
| | 10 | | 27.7 | | 45.1 | | - |
| | 100 | | 55.7 | | 52.8 | | 33.4 |
| | 1000 | | 74.7 | | 76.5 | | 8.4 |

Igual que en el caso anterior, los vacíos en la tabla representan valores que experimentalmente han dado negativos y a efectos de interpretación se considera que no ha habido quelación de fosfato.

La representación de los resultados anteriores nos permite obtener una visión gráfica de los resultados anteriores. Los resultados del % de P quelado para cada valor de pH se han representado en función de los mg de quelante, y con el objetivo de expandir el eje de abscisas se presenta también la representación semilogarítmica, muy habitual en farmacología.

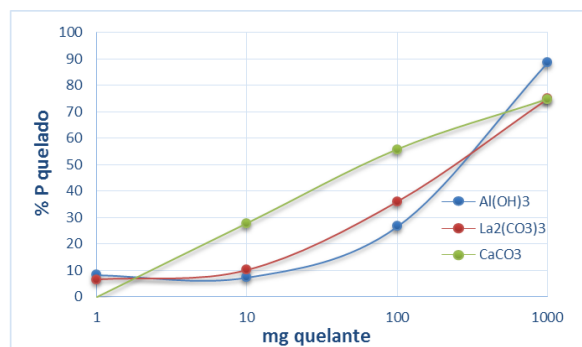
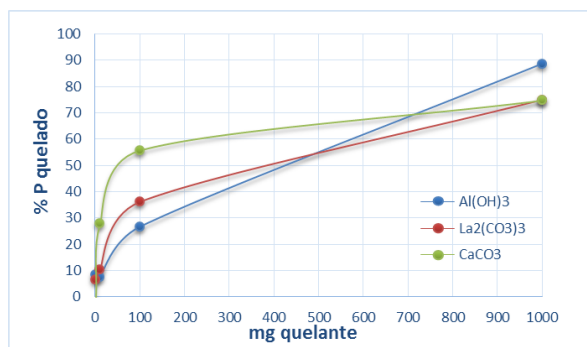


Figura 12. Representación del porcentaje de fósforo quelado frente a los mg de quelante a pH 3.

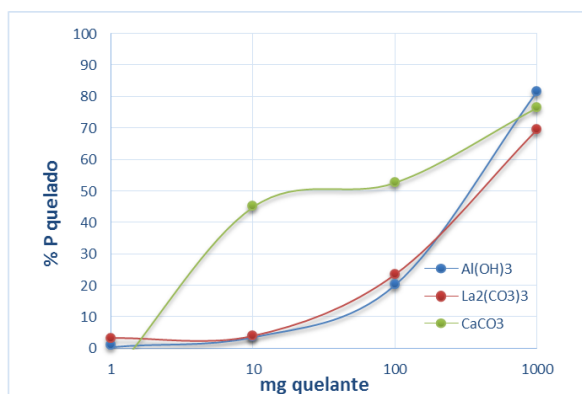
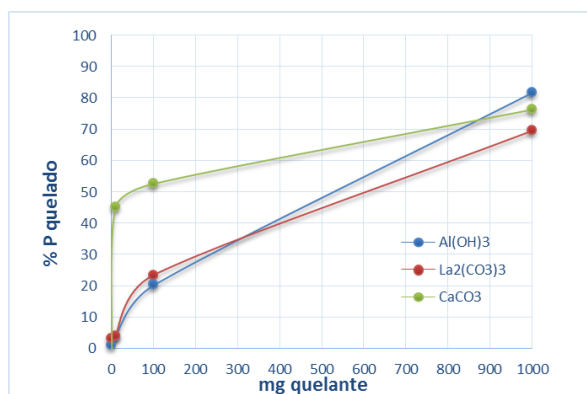


Figura 13. Representación del porcentaje de fósforo quelado frente a los mg de quelante a pH 5.5.

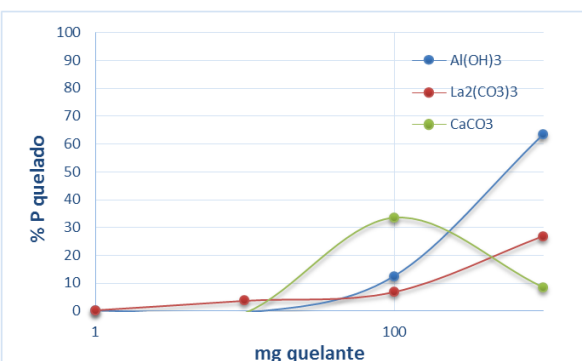
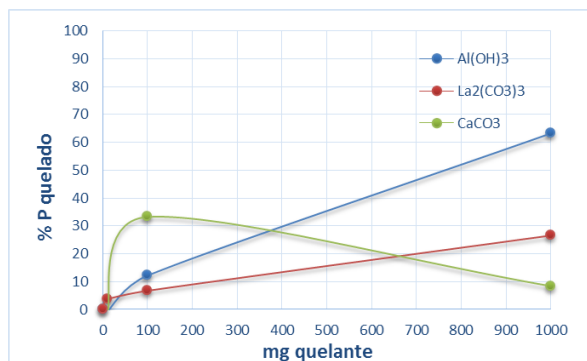


Figura 14. Representación del porcentaje de fósforo quelado frente a los mg de quelante a pH 8.

Los resultados obtenidos en este caso son bastante consistentes. Hay que remarcar que simplemente se ha reanalizado la concentración de P utilizando una técnica analítica distinta,

pero utilizando las mismas disoluciones, por lo que podemos concluir que el procedimiento de incubación y la implementación del protocolo se ha realizado de forma correcta, pero que hay algún problema en el uso del método del azul de molibdeno, posiblemente alguna interferencia espectral. Si bien los resultados a pH=3 son similares con ambas metodologías, a pH 5, 5 y 8 solamente se obtienen resultados adecuados con el ICP-AES.

En general, se aprecia como la capacidad quelante disminuye al aumentar el pH. Este hecho es debido a la disminución de la solubilidad de los diferentes cationes al aumentar el pH, por lo que hay menos concentración efectiva de *P-binder* para quelar el fosfato. Por tanto, en el estómago (pH = 1-4), estos quelantes interaccionarían muy bien con los fosfatos (hasta un 90 %) y reduciría la cantidad disponible para ser absorbida. Si bien su eficacia disminuye al aumentar el pH, se sigue produciendo quelación en el intestino, pues aunque la eficacia del proceso es menor, la superficie de intercambio es muy elevada, es por eso que un modelo de simulación de paso gastrointestinal sería más adecuado.

No se observan grandes diferencias entre los 3 quelantes estudiados, aunque el CaCO_3 presenta una mayor eficacia desde 1 hasta 100 mg; sin embargo, el $\text{Al}(\text{OH})_3$ es el quelante con idóneo cuando se administran 1000 mg en estas condiciones.

6. Conclusiones

- Se ha efectuado una búsqueda bibliográfica sobre la problemática de la hiperfosfatemia y su tratamiento actual con quelantes de fósforo.
- Se ha desarrollado una búsqueda bibliográfica sobre los principales quelantes de fósforo, su clasificación, uso y mecanismo de acción.
- Se ha constatado que el uso de ciertos fármacos está condicionado no solamente por su perfil de eficacia y seguridad, sino también por su coste.
- Se ha desarrollado una búsqueda bibliográfica sobre los métodos experimentales y analíticos para la determinación de los quelantes de fósforo y la evaluación de su eficacia.
- Se ha implementado una metodología experimental *in vitro* para determinar la eficacia de 3 quelantes de fósforo: hidróxido de aluminio, carbonato de lantano y carbonato cálcico.
- Dicha implementación ha producido algunos resultados incoherentes, debido seguramente a interferencias espectrales en la longitud de onda de trabajo (660 nm).
- Se ha optimizado el método experimental anterior cambiando la determinación de fosfato descrita en la bibliografía (método colorimétrico) por una determinación del fósforo por plasma ICP-OES, evitándose así las interferencias espectrales al usar una técnica más selectiva.

7. Bibliografía

- ¹ IUPAC: “IUPAC Compendium of chemical terminology - The gold book”, (<http://goldbook.iupac.org/>). Consultado el 1 de abril de 2015.
- ² Mataix Verdú, J. “Nutrición y alimentación humana”. 2ª edición. Madrid: Ed. Ergón, 2009. ISBN: 978-84-8473-664-6.
- ³ Schrier R, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114, 5-14 (2004).
- ⁴ Mezzano A, Aros C. Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev Med Chile* 133, 338-348 (2005).
- ⁵ <http://www.kidney-facts.com/rinones-en-riesgo/enfermedad-renal-cronica/&lang=es>. Consultado el 6 de abril de 2015.
- ⁶ Giachelli C. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15, 2959-2964 (2004).
- ⁷ Driessens F, Verbeeck R. “Biominerals”. 1ª edición. Boca Ratón: CRC Press, 1990. ISBN: 0-8493-5280-0.
- ⁸ Martín Pardillos, A. Estudios sobre la calcificación vascular medial: Efecto del envejecimiento, arsénico y fluor. Tesis Dra. Anat Pat Zaragoza, Universidad de Zaragoza, Fac Anat Pat, Med Leg y For y Toxic, 2013.
- ⁹ Veerly P, D’Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med* 15, 405-416 (2009).
- ¹⁰ Sinha S, Eddington H, Kalra P. Vascular calcification: mechanisms and management. *Br J Cardiol* 15, 316-321 (2008).
- ¹¹ Moe S, Chen N. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 19, 213-216 (2008).
- ¹² Fukumoto S. Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism – Pivotal role of Fibroblast Growth Factor 23 –. *Inter Med* 47, 337-343 (2008).
- ¹³ Sánchez-González M^a C, Salanova L, Ruano P. FGF-23: ¿solo regulador del metabolismo del fósforo o algo más? *Reumatol Clin* 7, S5-S7 (2011).
- ¹⁴ <http://emedicine.medscape.com/article/241185-treatment#d10>. Consultado el 10 de abril de 2015.
- ¹⁵ Carretero Colomer M. Carbonato de lantano. Tratamiento para la hiperfosfatemia. *Offram* 28, 62-64 (2009).
- ¹⁶ Hutchison A. Novel phosphate binders: plus ça change, plus c’est la même chose. *Kidney Int* 86, 471-474 (2014).
- ¹⁷ Locatelli F, Dimkovic N, Spasovski G. Efficacy of colestilan in the treatment of hyperphosphataemia in renal disease patients. *Informa healthcare* 15, 1475-1488 (2014).

- ¹⁸ Akizawa T, Kameoka C, Kaneko Y, Kawasaki S. Long-term treatment of hyperphosphatemia with bicalomer in Japanese hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 17, 612-619 (2013).
- ¹⁹ Isakova T, Gutiérrez O, Chang Y, Shah A, Tamez H, Smith K, Thadhani R, Wolf M. Phosphorus binders and survival on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 20, 388-396 (2009).
- ²⁰ Mohammed I, Hutchison A. Phosphate binding therapy in dialysis patients: focus on lanthanum carbonate. *Ther Clin Risk Manag* 4, 887-893 (2008).
- ²¹ <http://www.dopps.org/annualreport/>. Consultado el 22 de julio de 2015.
- ²² Qunibi W, Hootkins R, McDowell L, Meyer M, Simon M, Garza R, Pelham C, Mark V, Muenz L, He D, Nolan C. Treatment of hyperphosphatemia in hemodialysis patients: The Calcium Acetate Renagel Evaluation (CARE study). *Kidney Int* 65, 1914-1926 (2004).
- ²³ Delmez J, Tindira C, Windus D, Norwood K, Giles K, Nighswander T, Slatopolsky E. Calcium acetate as a phosphorus binder in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 3, 96-102 (1992).
- ²⁴ D'Haese P, Spasovski G, Sikole Aleksander, Hutchison A, Freemont T, Sulkova, S, Swanepoel C, Pejanovic S, Djukanovic L, Balducci A, Coen G, Sulowicz, W, Ferreira A, Torres A, Curic S, Popovic M, Dimkovic N, De Broe M. A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol™) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients. *Kidney Int* 63, S73-S78 (2003).
- ²⁵ Neven E, De Schutter T, Dams G, Gundlach K, Stepan S, Büchel J, Passlick-Deetjen J, D'Haese P, Behets G. A magnesium based phosphate binder reduces vascular calcification without affecting bone in chronic renal failure rats. *Plos One* 9, 1-9 (2014).
- ²⁶ Goldsmith D, Covic A. Oral phosphate binders in CKD – is calcium the (only) answer?. *Clin Nephrol* 81, 389-395 (2014).
- ²⁷ <https://www.tga.gov.au/auspar/auspar-sucroferric-oxyhydroxide>. Consultado el 29 de julio de 2015.
- ²⁸ McIntyre C, Pai P, Warwick G, Wilkie M, Toft A, Hutchison A. Iron-magnesium hydroxycarbonate (fermagate): A novel non-calcium-containing phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 4, 401-409 (2009).
- ²⁹ Gschwind H-P, Schmid D, Von Blanckenburg F, Oelze M, Van Zuilen K, Slade A, Stitah S, Kaufmann D, Swart P. Iron uptake and ferrokinesics in healthy male subjects of an iron-based oral phosphate binder (SBR759) labeled with the stable isotope ⁵⁸Fe. *Metallomics* 6, 2062-2071 (2014).
- ³⁰ Negri A, Ureña Torres P. Iron-based phosphate binders: do they offer advantages over currently available phosphate binders?. *Clin Kidney J* 8, 161-167 (2015).
- ³¹ Gupta A. Ferric citrate hydrate as a phosphate binder and risk of aluminum toxicity. *Pharmaceuticals* 7, 990-998 (2014).

- ³² Nguyen TM-H, Müller R, Taupitz M, Schnorr J, Hamm B, Wagner S. Novel oral phosphate binder with nanocrystalline maghemite-phosphate binding capacity and pH effect. *Int J Pharmaceut* 482, 21-26 (2015).
- ³³ Sangvanich T, Ngamcherdtrakul W, Lee R, Morry J, Castro D, Fryxell G, Yantasee W. Nanoporous sorbent material as an oral phosphate binder and for aqueous phosphate, chromate, and arsenate removal. *J Nanomed Nanotechnol* 5, nº 4 1-24 (2014).
- ³⁴ Leung A, Henderson I, Halls D, Dobbie J. Aluminium hydroxide versus sucralfate as a phosphate binder in uraemia. *Br Med J* 286, 1379-1381 (1983).
- ³⁵ Spaia S. Phosphate binders: Sevelamer in the prevention and treatment of hyperphosphataemia in chronic renal failure. *Hippokratia* 15, 22-26 (2011).
- ³⁶ Hood C, Wolley M, Kam A, Kendrik-Jones J, Marshall M. A feasibility study of Colestipol as an oral phosphate in hemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 20, 250-256 (2015).
- ³⁷ Wu-Wong J, Yung-wu C, Gaffin R, Hall A, Wong J, Xiong J, Wessale J. VS-501: a novel, nonabsorbed, calcium- and aluminum-free, highly effective phosphate binder derived from natural plant polymer. *Pharma Res Per* 2, nº 3 1-10 (2014).
- ³⁸ Holasek A, Flaschka H. "Métodos quelométricos y otros métodos volumétricos de análisis clínicos". 1ª edición. Madrid. Ed: Reverté SA, Barcelona (2006). ISBN: 84-291-1830-6.
- ³⁹ Handley S, Raja K, Sharpe C, Flanagan R. Measurement of serum lanthanum in patients treated with lanthanum carbonate by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 48, 178-182 (2011).
- ⁴⁰ D'Haese P, Van de Vyver F, de Wolff F, De Broe M. Measurement of Aluminum in Serum, Blood, Urine, and Tissues of Chronic Hemodialyzed Patients by Use of Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Clin Chem* 31, 24-29 (1985).
- ⁴¹ Nakaki J, Yamaguchi S, Torii Y, Inoue A, Minakami S, Kanno T, Murakami M, Tsuzuki M, Mochizuki H, Suyama K, Miyamoto M. Effect of fatty acids on the phosphate binding of TRK-390, a novel, highly selective phosphate-binding polymer. *Eur J Pharmacol* 714, 312-317 (2013).
- ⁴² Braunlin W, Zhorov E, Guo A, Apruzzese W, Xu Q, Hook P, Smisek D, Mandeville W, Holmes-Farley S. Bile acid binding to sevelamer HCl. *Kidney Int* 62, 611-619 (2002).
- ⁴³ Banchelli M, Nappini S, Montis C, Bonini M, Canton P, Berti D, Baglioni P. Magnetic nanoparticle clusters as actuators of ssDNA release. *Phys Chem Chem Phys* 16, 10023-10031 (2014).
- ⁴⁴ King J, Delpont P, Luus H, Erasmus H, Barnes P, Speranza C. Efficacy and acceptability of the new oral phosphate binder Lenziaren[®] in healthy cats fed a renal diet. *J Vet Pharmacol Therap* 38, 278-289 (2015).
- ⁴⁵ Kawata T, Nagano N, Obi M, Miyata S, Koyama C, Kobayashi N, Wakita S, Wada M. Cinacalcet suppresses calcification of the aorta and heart in uremic rats. *Kidney Int* 74, 1270-1277 (2008).

⁴⁶ Guerrero F, Montes de Oca A, Aguilera-Tejero E, Zafra R, Rodríguez M, López I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated with inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 27, 2206-2212 (2012).

⁴⁷ O'Neill W, Lomashvili K, Malluche H, Faugere M-C, Riser B. Treatment with pyrophosphate inhibits urèmic vascular calcification. *Kidney Int* 79, 512-517 (2011).

⁴⁸ Skoog D, Holler F, Nieman T. "Principios de análisis instrumental". 5ª edición. Madrid: Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España S.A.U., 2001. ISBN: 84-481-2775-7.