



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Paper de les adipoquines en la calcificació vascular

Margalida Mateu Borrás

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2012-13

DNI de l'alumne: 43199786J

Treball tutelat per Ana María Proenza Arenas
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 línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball: Teixit adipós, adipoquines, calcificació fisiològica, calcificació vascular, leptina, adiponectina, citoquines, TNF α , IL-6, omentina, resistina

ÍNDEX

<i>Resum</i>	4
1. Introducció	4
2. Calcificació vascular	5
2.1 Estructura dels vasos sanguinis	6
2.2 Tipus de calcificació vascular	7
2.2.1 Calcificació de la túnica íntima	7
2.2.2 Calcificació de la túnica media	8
2.3 Mecanismes de calcificació vascular	9
2.3.1 Calci i fòsfor	9
2.3.2 Vesícules de matriu i apoptosi	10
2.3.3 Activadors i inhibidors de la calcificació vascular	10
2.3.4 Altres factors implicats en la calcificació	14
3. Paper de les adipoquines en els mecanismes de la calcificació vascular	15
3.1 Leptina	16
3.1.1 Leptina i calcificació vascular	17
3.2 Adiponectina	20
3.2.1 Adiponectina i calcificació vascular	21
3.3 Resistina	22
3.3.1 Resistina i calcificació vascular	23
3.4 Citoquines	24
3.4.1 TNF- α i IL-6	25
3.4.2 Omentina	27
4. Conclusions	29
5. Bibliografia	31



PAPER DE LES ADIPOQUINES EN LA CALCIFICACIÓ VASCULAR

Resum

Tot i que clàssicament la calcificació vascular ha estat considerada un procés passiu conseqüència de l'envelliment, alteracions metabòliques o aterosclerosis, ha quedat ben establert que consisteix en un procés actiu i altament regulat, amb moltes similituds amb la formació i mineralització de l'os. Estudis experimentals molt recents han suggerit que existeix una relació entre les adipoquines alliberades pel teixit adipós i la calcificació dels vasos sanguinis. Moltes d'aquestes adipoquines, com són la leptina, resistina i algunes citoquines, promouen la calcificació a través de l'expressió de proteïnes típicament òssies, com la fosfatasa alcalina o RANKL. En canvi, d'altres com l'adiponectina i l'omentina tindrien un efecte protector, prevenint la formació de nòduls de fosfat de calci a l'interior dels vasos sanguinis.

L'objectiu d'aquesta recerca bibliogràfica és entendre els mecanismes complexos que acompanyen la calcificació vascular i la relació amb les adipocitoquines, intentant establir un nexa d'unió entre les alteracions metabòliques i malalties vasculars a través de les adipoquines.

1. INTRODUCCIÓ

La mineralització o cristal·lització consisteix en una seqüència d'esdeveniments a través dels quals els éssers vius produeixen minerals sòlids que cristal·litzen i contribueixen a la formació d'estructures dures com són els ossos, dents, etc. Aquest tipus de mineralització produïda sota condicions fisiològiques controlades durant el desenvolupament de l'esquelet rep el nom de **calcificació fisiològica**¹.

A vegades, a causa d'alguna alteració metabòlica, aquests mateixos mecanismes de cristal·lització es poden produir en altres teixits com els ronyons, pell, vasos sanguinis i vàlvules cardíques; és quan es parla de **calcificació patològica o cristal·lització ectòpica**, que pot tenir greus conseqüències².

Els darrers anys s'ha establert un important nexa entre la calcificació ectòpica i el teixit adipós. Aquest teixit, fins fa relativament poc, es considerava un òrgan exclusivament implicat en l'homeòstasi energètica³; no obstant, s'ha vist que és realment un òrgan endocrí a través de l'alliberació d'uns mediadors químics, les **adipocitoquines o adipoquines**⁴.

Les adipoquines són substàncies biològicament actives, secretades pel teixit adipós, que poden actuar tan a nivell local (paracrí/autocrí) com a nivell sistèmic (endocrí)^{5,6}. Aquestes molècules han captat l'atenció dels investigadors des que es va descobrir la primera adipoquina, la leptina, l'any 1994. Inicialment se les va associar amb trastorns com la diabetis i desordres alimentaris però amb els anys s'ha vist que juguen un paper clau en la regulació de la resposta immune i els processos inflamatoris⁷. Entre les adipoquines es troben hormones (leptina, adiponectina), citoquines inflamatòries (TNF α , IL-6, omentina) i altres proteïnes (resistina)³.

Els vasos sanguinis es troben envoltats per teixit adipós, de forma que les adipoquines i altres factors secretats pel mateix teixit poden modular la funció de la vasculatura. La major part de les adipoquines, com el TNF α , IL-6, leptina i resistina, exerceixen efectes adversos sobre els vasos sanguinis, encara que també n'hi ha com l'adiponectina o l'omentina que tenen un funció protectora³. En aquesta revisió es descriuran les adipoquines més representatives en la patologia de la **calcificació vascular**.

2. CALCIFICACIÓ VASCULAR

La calcificació vascular es defineix com una deposició ectòpica de calci en les parets dels vasos sanguinis. Encara que es pugui pensar que aquesta patologia és producte de la societat moderna, fou descrita per primera vegada fa uns 150 anys aproximadament i ha afectat als humans durant mil·lenis⁸. Les primeres referències que es tenen daten l'any 1852, obtingudes a partir de l'autòpsia d'una mòmia egípcia que revelava la presència de calcificacions a l'aorta⁹.

Durant dècades aquesta malaltia s'ha considerat un procés passiu i degeneratiu conseqüència de l'edat, sense cap opció de tractament⁹. No obstant, l'evidència de la darrera dècada suggereix que la calcificació vascular és un procés actiu altament regulat que mostra semblances enormes amb la mineralització fisiològica dels ossos, incloent l'expressió de factors de creixement, proteïnes de matriu i altres factors implicats en el metabolisme ossi^{8,9,10}. S'ha vist que un increment dels nivells plasmàtics de fòsfat i calci comporten tot una sèrie d'alteracions que afecten a la supervivència i al fenotip de les cèl·lules del múscul llis vascular (VSMCs), clau en l'inici i promoció d'aquesta patologia¹¹.

La calcificació vascular s'observa amb freqüència en pacients amb aterosclerosi, hipertensió, malaltia renal crònica i diabetis^{9,10}. Es troba altament relacionada amb la morbiditat i mortalitat per malaltia cardiovascular ja que és responsable d'un augment de la rigidesa dels vasos, disminució de l'eficiència cardíaca i un deteriorament en la perfusió coronària; es considera un risc independent d'infart de miocardi^{10,11}.

2.1 Estructura dels vasos sanguinis

Els vasos sanguinis estan formats per 3 capes concèntriques de teixit, anomenades túniques: la túnica íntima, la túnica mitjana i la túnica adventícia (Figura 1).

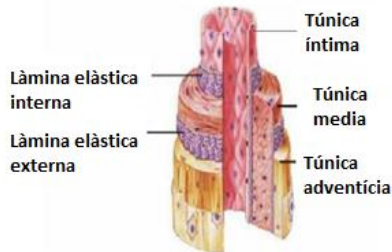


Figura 1. Estructura de la paret vascular¹²

La túnica íntima és la capa més interna i està composta per una monocapa de cèl·lules endotelials sobre una capa subendotelial formada per teixit conjuntiu laxa¹³.

La túnica mitjana es troba localitzada entre la capa íntima i l'adventícia, separada d'aquestes per la membrana elàstica interna i externa respectivament. Està composta bàsicament per cèl·lules musculars llises (SMCs)¹³, directament implicades en la patologia de la calcificació vascular. En condicions normals, s'encarreguen de regular el to vascular mitjançant l'expressió de gens estructurals, incloent α -smooth muscle – actin (SMA) i SM22 α (Figura 2)⁹; no obstant, en situació d'estrès mecànic, concentracions elevades de calci i fòsfat o per acció de factors com certs tipus d'adipoquines o factors de creixement, s'ha vist que poden patir una transdiferenciació cap a cèl·lules osteogèniques, exhibint un fenotip secretor. Això posa de manifest la gran plasticitat que presenten aquestes cèl·lules, amb capacitat de presentar diferents fenotips en resposta a diferents estímuls fisiològics i/o patològics^{9,14}.

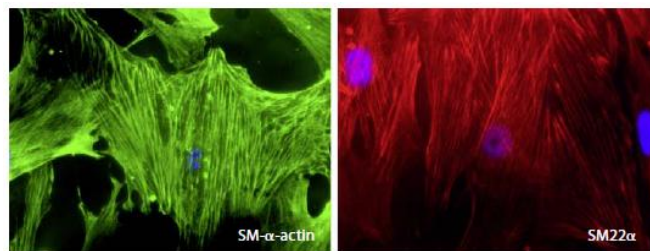


Figura 2. Caracterització dels marcadors de VSMCs en condicions normals. La tinció per immunofluorescència indica que el fenotip contràctil normal és caracteritzat per l'expressió de SMA i SM22 α . Adaptat de Deuell et al, 2011¹⁵.

Finalment, la túnica adventícia és la capa més externa i està composta principalment per teixit conjuntiu fibrós. Normalment és prima en les artèries mentre que és bastant gruixuda en les venes i vènules¹³.

2.2 Tipus de calcificació vascular

S'han establert dos tipus principals de calcificació, diferents en localització, morfologia i fisiopatologia: la **calcificació de la íntima** i la calcificació **de la media o esclerosi de Mönckeberg**, que inclou també un subtipus de calcificació conegut com **arteriopatologia urèmica calcificant**⁹. Tot i que els distints tipus representen processos fisiològics diferents, en tots els casos es produeix una disfunció de les VSMCs, responsables de dirigir els mecanismes patològics⁸.

2.2.1 Calcificació de la túnica íntima

La calcificació de la capa íntima (Figura 3) consisteix, morfològicament, en una deposició desorganitzada de minerals a la túnica íntima dels vasos sanguinis⁸. Es relaciona amb l'aterosclerosi, és a dir, el desenvolupament de plaques d'ateroma dins la capa íntima dels grans vasos, base de molts trastorns cardiovasculars com infart de miocardi o malaltia cerebrovascular⁹. En l'aterosclerosi es produeix una inflamació crònica del vas sanguini i una deposició de lípids, macròfags, teixit connectiu i restes necròtiques, tot això associat moltes vegades a una deposició de calci. Es poden detectar petits agregats de calci en les lesions ateroscleròtiques en desenvolupament, de manera que la calcificació de la íntima es pot usar com un marcador d'aterosclerosi i de futurs esdeveniments cardiovasculars^{8,9}. La calcificació ateroscleròtica pot començar de forma prematura en la segona dècada de vida, després de la formació de l'estria grassa, i anar desenvolupant-se amb el temps. El grau de calcificació depèn de l'extensió de l'aterosclerosi i altres factors importants com l'edat i la hipertensió⁹.

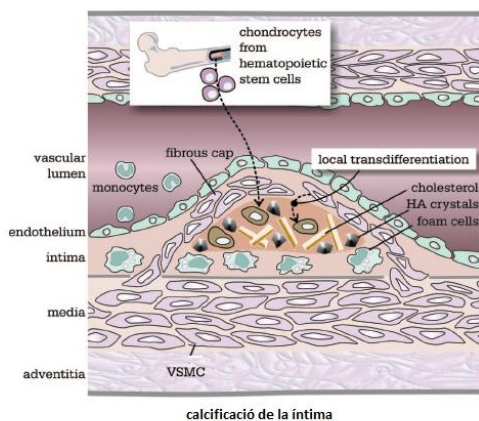


Figura 3. Inici de la calcificació en la capa íntima. Diferenciació osteogènica de les VSMCs associada a una placa d'ateroma. Adaptat de Neven et al, 2011¹⁶

2.2.2 Calcificació de la túnica media

La calcificació de la media (Figura 4), també coneguda com esclerosi de Mönckeberg, fou descrita per primera vegada el 1903 per J.G. Mönckeberg, que la va definir com un extens cùmul de mineral en la túnica media que podia estendre's fins a la làmina interna¹⁷. És un tipus d'arteriosclerosi que es produeix a la capa media dels vasos sanguinis, principalment a les artèries. Aquest tipus de mineralització es produeix de forma independent a l'aterosclerosi, mitjançant un procés molt similar a l'ossificació intramembranosa⁹. Es van depositant sals de fosfat calci en la capa media dels vasos sanguinis, concretament a la matriu extracel·lular d'elastina i col·lagen. A mesura que va avançant la lesió, la túnica media és pavimentada amb uns anells de cristalls de fosfat de calci (Figura 5), la qual cosa condueix a una disminució de l'elasticitat de la capa,¹⁸.

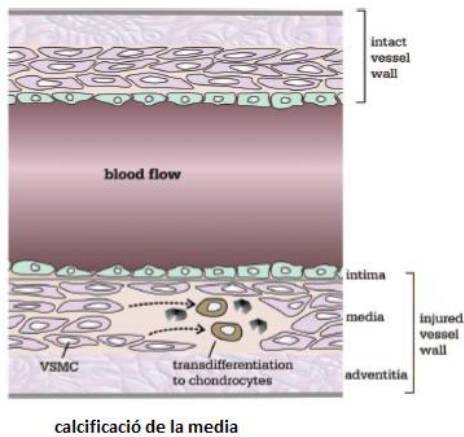


Figura 4. Inici de la calcificació en la capa media. Adaptat de Neven et al, 2011¹⁶

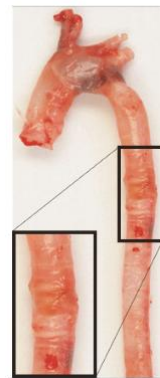


Figura 5. Aorta de rató on es poden veure els anells circulars de fosfat càlcic típics de la calcificació de la túnica media.¹⁹

Aquest procés ha estat descrit principalment en els vasos de pacients diabètics i persones amb malaltia renal crònica i s'ha vinculat amb un increment de la mortalitat cardiovascular, ictus i risc d'amputacions de les extremitats inferiors⁹.

Dins aquest tipus de calcificació també s'inclou l'ateriopatia urèmica calcificant, que consisteix en un tipus molt greu de calcificació vascular de la túnica media que té lloc a pacients que es troben en un estadi terminal de malaltia renal. Principalment afecta a les artèries i arterioles i desencadena una fibrosi i trombosi greus⁹.

2.3 Mecanismes de calcificació vascular

Les calcificacions vasculares constitueixen un procés actiu i altament regulat dut a terme per mecanismes diferents no excloents entre sí¹⁷. En condicions normals, la mineralització es troba restringida a aquells teixits que expressen alhora col·lagen tipus I i fosfatasa alcalina (ALP), com els ossos i les dents¹³. Nombrosos estudis evidencien doncs que la calcificació vascular és un procés que implica canvis en les VSMCs, que passen d'un fenotip contràctil a un fenotip secretor que les fa alliberar proteïnes implicades en el metabolisme ossi, com la ALP i osteocalcina entre altres. Tot això comporta la formació de nòduls i cossos apoptòtics, que constituïran els focus d'iniciació de la cristal·lització²⁰.

2.3.1 Calci i fòsfor

És evident que la calcificació vascular es troba relacionada amb elevats nivells de Ca, P i el producte Ca₂P, els quals són responsables de la formació i creixement d'hidroxiapatita, principal component mineral d'ossos, espines i closques¹⁷.

Quan la concentració de fosfat en el medi és elevada, les VSMCs experimenten una transició cap al fenotip osteogènic, conduint a la formació i creixement d'agrupacions d'hidroxiapatita^{17,21}. Estudis *in vitro* han mostrat que quan s'incuben VSMCs a concentracions de fòsfor 1.4mM (condicions fisiològiques humanes) la transició fenotípica no es produeix, però a una concentració de 1.6-3mM es desenvolupa una mineralització dosi-depenent. Aquests nivells són comparables amb els que s'han trobat a malalts renals amb hemodiàlisi en els que s'ha diagnosticat hiperfosfatèmia. El que ocorre és que es desencadena la pèrdua del fenotip contràctil paral·lelament a la inducció de l'expressió de marcadors d'osteogènesi com Runx2/Cbfa1 i ALP. De fet, s'ha vist que en aorta de rates incubades a una concentració de fosfat 3.8mM, l'expressió de la ALP incrementava 3 vegades el normal²¹.

Els efectes de la hiperfosfatèmia són mediat per un transportador anomenat Pit-1, el qual es troba expressat en VSMCs. Aquest transportador permet l'acumulació de fosfat dins la cèl·lula, que actuarà com a senyal per a la promoció de tots aquests canvis en l'expressió gènica (Figura 6)¹⁷.

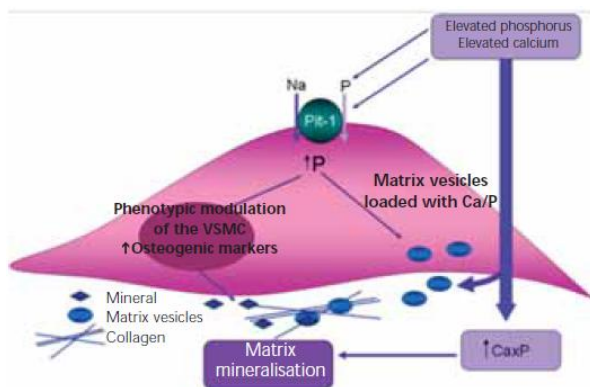


Figura 6. Efectes del calci i fòsfor en la mineralització de les VSMCs. Valdivielso, 2011.¹⁷

2.3.2 Vesícules de matriu i apoptosi

La calcificació vascular s'ha associat amb l'aparició d'unes vesícules de matriu (MVs), que són petits cossos esfèrics que contenen membrana plasmàtica intacta i contingut citoplasmàtic⁹. Es troben enriquides sobretot amb ALP i fosfatidilserina, i també contenen annexines i Pit-1 entre altres²².

Les MVs es formen a partir de cèl·lules responsables de la mineralització o a partir de cossos apoptòtics. Aquestes vesícules poden concentrar calci en el seu interior, constituint l'origen dels cristalls d'hidroxiapatita⁹.

En condicions normals, les MVs contenen inhibidors de la calcificació però en condicions patològiques, sota estímuls calcificants, induiran la mineralització ectòpica²³.

Estudis *in vitro* han demostrat que nivells elevats de calci i fosfat indueixen l'alliberació de MVs i l'apoptosi de les VSMCs. La fagocitosi de les MVs podria evitar la seva deposició en els vasos, eliminant el "niu" de formació de cristalls d'hidroxiapatita. El problema és que si les VSMCs es troben danyades, la fagocitosi es veu limitada, essent més probable que es produeixi la calcificació (Figura 7)²⁴.

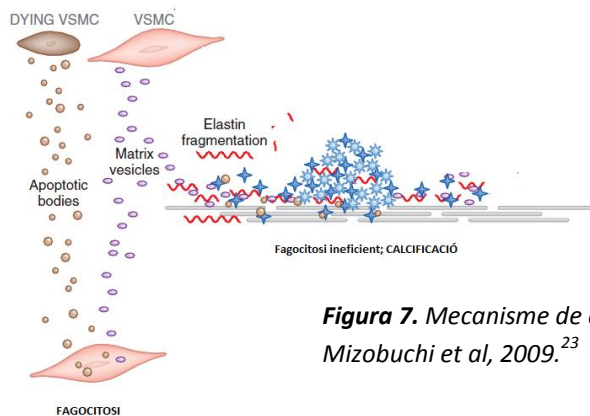


Figura 7. Mecanisme de calcificació a VSMCs induït per MVs. Adaptat de Mizobuchi et al, 2009.²³

2.3.3 Activadors i inhibidors de la calcificació vascular

Existeix un gran nombre de factors promotors i inhibidors de la calcificació vascular. En condicions normals, els promotors es veuen superats pels inhibidors però quan el balanç s'inverteix es posa en marxa el procés de calcificació ectòpica²⁵.

Promotors de la calcificació

Fosfatasa alcalina

La ALP és una proteïna clau en el procés de mineralització òssia. És expressada a la superfície cel·lular i actua alliberant i incrementant la concentració de fosfat. La seva expressió és induïda per citoquines proinflamàtores i vitamina D. Es relaciona amb els mecanismes de calcificació vascular perquè ha estat detectada en zones de calcificació vascular i cardíaca¹⁷.

Factor d'unió al nucli alfa-1 (Cbfa1)

El Cbfa1, també anomenat Runx2, és una proteïna considerada la principal reguladora de la diferenciació òssia; de fet, ratolins *knockout* per Cbfa1 mostren problemes en la formació de cartílag i en la mineralització òssia. Com a factor de transcripció el que fa és estimular l'expressió de gens implicats en la diferenciació osteoblàstica, com l'osteocalcina (proteïna implicada en la captació de calci), el col·lagen tipus I o la ALP. La seva expressió s'activa per fosfat¹⁷.

Proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs): BMP-2 i BMP-4

Les BMPs són un grup de proteïnes bastant abundant que pertanyen a la superfamília de factors β transformant del creixement (TGF- β). Estan implicades en el creixement de l'os, proliferació cel·lular, apoptosi, migració cel·lular, diferenciació i morfogènesi. Actuen unint-se a un sistema heterodimèric de receptors transmembrana. La BMP s'uneix al receptor tipus II, la qual cosa permet la unió i activació del receptor tipus I. Això indueix la fosforilació i translocació nuclear dels factors de transcripció Smad, que modificaran l'expressió dels seus gens diana. El resultat serà la formació, manteniment i reparació òssia, principalment (Figura 8)¹⁷.

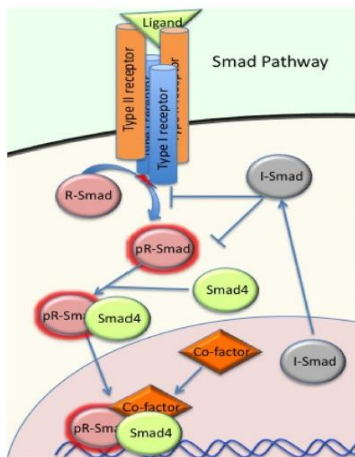


Figura 8. Via de senyalització BMP/TFG β . Adaptat de Song et al, 2009²⁶.

Tot i que inicialment foren identificades a l'os, aquestes proteïnes i les vies de senyalització en que estan implicades juguen papers importants en altres teixits. Pel que fa a la

promoció de la calcificació vascular, el paper que desenvolupen és bastant complex. Entre les més estudiades destaca la BMP-2, que ha estat identificada en lesions ateroscleròtiques, miofibroblasts periadventicis i cèl·lules de la túnica media. La seva expressió als vasos és regulada per estrès oxidatiu, inflamació, lípids, lipoproteïnes oxidades i hiperglucèmia²⁷. En aquestes condicions el que fa és induir l'expressió de Msx2 que estimula Cbfa1 i osterix, dos factors de transcripció que afavoreixen la diferenciació de les cèl·lules mesenquimàtiques cap a llinatge osteoblàstic^{17,27}. L'acció de la BMP-2 en la calcificació està inhibida per MGP (*Matrix Gla Protein*)¹⁷.

La BMP-4 també s'ha identificat com un potent factor de diferenciació òssia, induïda per RANKL (*Receptor Activator of NK-κB ligand*)¹⁴.

Receptor Activator of NK-κB ligand

També conegut com OPGL, RANKL és una proteïna transmembrana constituïda per 316 aminoàcids¹⁷, altament expressada a cèl·lules T i osteoblasts²⁷. Està implicat en la regulació de la diferenciació, funció i supervivència dels osteoclasts¹⁷.

RANKL s'uneix a RANK, un receptor transmembrana format per 616 aminoàcids expressat a osteoclasts i els seus precursors²⁷. Aquesta unió posa en marxa múltiples senyals intracel·lulars que condueixen a la translocació nuclear de NF-κB, modulant l'expressió de gens com BMP-4, activador de la mineralització a les VSMCs¹⁷.

L'acció de RANKL en la calcificació vascular és inhibida per l'osteoprotegerina (OPG), la qual pertany, juntament amb RANK i RANKL a la família TNFα. Per altra banda, aquesta mateixa acció és activada per vitamina D, calci, PTH, glucocorticoides, prostaglandina E2, IL-1, IL-6, IL-11 i immunosupressors²⁷.

Els nivells de RANKL van augmentant amb l'edat i són uns predictors molt fiables de risc de malalties cardiovasculars¹⁴.

Inhibidors de la calcificació

Proteïna Gla de la matriu

La MGP fou el primer inhibidor de la calcificació identificat, descobert per primera vegada per Price i els seus col·laboradors²⁷. És una proteïna de 10kDa depenent de vitamina K expressada en condicions normals a les VSMCs i cèl·lules endotelials vasculars¹⁷. Es troba en dues formes, una carboxilada per la vitamina K, activa, i la no carboxilada, inactiva. Entre les seves funcions es troba la de regular la BMP-2 però també té la capacitat d'unir directament cristalls de fosfat calci, prevenint la seva deposició a la paret vascular²⁷. Ratolins *knockout* per a la MGP s'ha vist que desenvolupen ràpides calcificacions de la capa media i acaben morint per ruptura aòrtica¹⁷; el mateix ocorre si l'activitat d'aquesta proteïna es veu alterada, per

exemple, per un bloqueig en l'acció de la vitamina K. A humans s'ha vist que les persones que pateixen síndrome Keutel, una patologia autosòmica recessiva produïda per l'absència de MGP madura, presenten greus calcificacions en les grans artèries²⁷.

Fetuïna A

La Fetuïna – A és una glicoproteïna de 56kDa produïda pel fetge i present en elevades concentracions en el sèrum (0.4-1.0g/l a humans)²⁷. Actua com un potent inhibidor de la calcificació capaç d'unir complexos de fosfat càlcic, prevenint la seva deposició sobre les parets vasculars¹⁴.

S'ha vist que ratolins deficients amb fetuïna-A (fetuïna A ^{-/-}) desenvolupen extenses calcificacions en teixits blans (miocardi, ronyons, pell, llengua) i en les artèries^{17,27}. Nivells baixos d'aquesta proteïna es relacionen amb risc de mortalitat cardiovascular²⁷.

BMP-7

La BMP-7, al contrari que la BMP-2, promou el fenotip muscular de les cèl·lules VSMCs, essent un protector front la calcificació^{14,27}. El mecanisme que explica l'efecte contrari d'aquestes dues proteïnes tan similars no es coneix del tot; el que sí es sap és que la BMP-7 estimula la deposició de fosfat en l'os, evitant un increment dels nivells sèrics i la conseqüent calcificació vascular²⁷.

Osteopontina (OPN)

L' OPN és una fosfoproteïna extracel·lular normalment ubicada en teixits mineralitzats com els ossos i les dents^{17,27}. Té la capacitat d'unir cristalls d'hidroapatita prevenint el seu creixement i deposició a les parets vasculars²⁷.

En condicions normals no es troba ubicada a les artèries però en condicions patològiques sí que es localitza en plaques ateroscleròtiques i artèries i vàlvules aòrtiques calcificades en un intent de reduir la lesió. Experiments fets amb ratolins mostren que els *knockout* per OPN i MGP (OPN ^{-/-}, MGP^{-/-}) presenten una calcificació molt més ràpida i estesa que no aquells *knockout* només per MGP (OPN ^{+/+}, MGP^{-/-}), de forma que OPN és un inhibidor de la calcificació induïble *in vivo*¹⁷. De fet, l'evidència suggereix que OPN regula la calcificació quan ja s'ha produït una lesió a l'artèria²⁷.

Osteoprotegerina

L'OPG és un potent inhibidor de la calcificació vascular, membre de la família dels receptors de TNF. És produïda per varis teixits, incloent els ronyons, pulmons, sistema immune i sistema cardiovascular¹⁷. En VSMCs i cèl·lules endotelials d'aorta i artèries renals la seva

expressió es troba espacialment elevada. Entre les seves funcions es troba la d'evitar la unió de RANKL a RANK, inhibint l'acció del primer. Els seus nivells augmenten davant estímuls que també promouen l'increment de RANKL, com BMP-2 i TGF- β . D'aquesta manera, elevats nivells d'OPG constitueixen un factor de risc per a l'aterosclerosi ja que indicaria que aquest augment s'ha produït per compensar un procés d'aterosclerosi i/o calcificació vascular²⁷.

2.3.4 Altres factors implicats en la calcificació

Estrés oxidatiu

L'increment de l'estrés oxidatiu i espècies reactives d'oxigen s'han vist implicats en la patogènesi de la calcificació vascular. En particular, el H₂O₂ el que fa és activar l'expressió de Runx2 i la de ALP, promovent així la diferenciació osteocondrocítica de les VSMCs^{14,28}. De fet, l'efecte promotor de la calcificació de les BMP-2 es dona a través de l'augment de l'estrés oxidatiu²⁸.

Vitamina D

Com és sabut, un dèficit de vitamina D és un factor de risc en el desenvolupament de malalties com la hipertensió arterial, diabetis mellitus, infart de miocardi i malaltia isquèmica entre altres²⁹. No obstant, elevades dosis de vitamina D també són perjudicials ja que s'ha vist que indueixen la calcificació en la túnica mitjana. De fet, l'administració de nivells elevats d'aquesta vitamina s'usa per a obtenir animals d'experimentació models de calcificació¹⁴.

3. PAPER DE LES ADIPOQUINES EN ELS MECANISMES DE LA CALCIFICACIÓ VASCULAR

Com ja s'ha descrit abans, el teixit adipós és més que un simple magatzem d'energia; és un òrgan endocrí secretor d'una gran quantitat de molècules biològicament actives, les adipoquines. Està format per diferents tipus de cèl·lules, que inclouen adipòcits madurs (30-50%) i una gran varietat d'altres tipus cel·lulars que en conjunt reben el nom de fracció vascular estromal, que englobarien els preadipòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials i macròfags^{3,4}.

A mamífers existeixen dos tipus de teixit adipós: el teixit adipós blanc (TAB) i el teixit adipós marró (TAM), amb diferents funcions, composició i localització⁵.

El TAM és important en mamífers petits i nadons però a adults durant molt temps s'ha considerat absent, tot i que investigacions recents mostren adults amb TAM metabòlicament actiu³⁰.

El TAB constitueix el principal teixit adipós de l'organisme. Aporta la major part del greix corporal i constitueix la font principal d'àcids grassos, que són usats com a substrat energètic per a la generació d'ATP a través de la fosforilació oxidativa. Els seus dipòsits es troben dispersos per diferents localitzacions anatòmiques del cos, trobant TAB visceral, muscular, epicardi, perivascular i renal. Tots ells estan involucrats en dues funcions clau⁵: control del metabolisme i paper inflamatori i immune mediat per adipoquines i altres molècules inflammatòries, antiinflammatòries i immunes.

Una acumulació excessiva de TAB determina el desenvolupament de malalties com l'obesitat i altres relacionades⁵. Durant molt temps l'obesitat s'havia definit com una patologia provocada per la deposició de greix, però ara s'ha vist que és una malaltia inflamatòria sistèmica on el teixit adipós, amb la seva funció endocrina, hi juga un paper central mitjançant la producció de les adipoquines³¹. S'ha pogut veure que l'obesitat es caracteritza per una remodelació de la composició cel·lular del TAB. Es produeixen processos com la hiperplàsia i hipertròfia dels adipòcits, infiltració de macròfags i fibrosi del TAB, la qual cosa provoca un desequilibri en l'alliberació de les adipoquines^{4, 31}, que juguen un paper molt important en el desenvolupament de l'aterosclerosi acompanyada d'una disfunció de les cèl·lules de l'endoteli vascular, a més d'incrementar el risc de calcificació vascular, ja que la inflamació és un dels mecanismes moleculars subjacents a la calcificació vascular³¹.

A continuació es tractaran aquelles adipoquines que s'ha vist fins a la data que tenen més repercussions en els mecanismes adjacents a la calcificació.

3.1 Leptina

La leptina és una hormona polipeptídica de 16kDa secretada principalment pels adipòcits. Etimològicament el nom prové del grec *leptos*, que significa prim, referint-se a l'efecte protector de la leptina front l'obesitat. Fou descoberta el 1994 en ratolins per Zhang i col·laboradors mitjançant clonació posicional i seqüenciació de l'homòleg mutat del gen *ob* (*ob/ob*), el gen de l'obesitat. A humans l'hormona és codificada pel gen *Lep*, homòleg del gen *ob* a ratolins^{6,7}.

Quan fou descoberta es va veure que aquells humans i rosegadors que tenien un dèficit en leptina manifestaven obesitat, de manera que la primera impressió que va donar fou que era una hormona encarregada d'inhibir la ingesta i disminuir el pes corporal. No obstant, això no és del tot cert ja que l'obesitat es sol associar a nivells elevats de leptina però una resistència a la seva acció⁶.

Juga un paper fonamental en la regulació de l'homeòstasi energètica. Un cop secretada pel TA, travessa la barrera hematoencefàlica i arriba al nucli hipotalàmic, on disminueix la sensació de gana i incrementa el consum energètic a través de l'alliberació de factors anorexigènics, com el CART, i la supressió de pèptids orexigènics, com el NPY^{6,7,32}. A part d'això, s'ha vist que participa en altres funcions biològiques com és l'hematopoesi i angiogènesi^{7,31}.

Els nivells circulants de leptina es correlacionen positivament amb l'índex de massa corporal (BMI) i amb la massa del TAB o contingut en massa grassa^{7,32}, tot i que també reflecteixen canvis en l'estat nutricional, de forma que es produeix un increment de leptina després de la ingesta^{6, 31}. La seva producció també depèn dels nivells d'insulina, d'hormones sexuals i mediadors de la inflamació^{7, 32}. En el cas de les hormones sexuals, s'ha vist que les dones tenen, per norma general, nivells de leptina més elevats que els homes. Per altra banda, hi ha que destacar el possible paper de la leptina en la resposta immune, ja que s'ha trobat en nombrosos estudis nivells de leptina superiors durant una infecció i inflamació, probablement secundari a l'augment de producció d'interleuquines i TNF- α ⁷.

Tots aquests efectes de la leptina són exercits a través dels seus receptors, codificats pel gen *db* (*diabetes gene*). Existeixen 6 isoformes diferents d'aquest, però només una és la funcional, la Ob-Rb. Hi ha varis teixits que expressen aquests receptors: vasos sanguinis i cardiomiocits en el sistema cardiovascular³² i monòcits i limfòcits T implicats en la patogènesi de l'aterosclerosi⁴.

La senyalització de la leptina és duta a terme fonamentalment a través de la via JAKs i STATs. Una vegada s'ha unit al seu receptor funcional, Ob-Rb, recluta JAKs i activa el receptor, que atreu STATs, que seran translocades al nucli on induiran l'expressió de gens diana de la leptina³¹.

Resistència als efectes de la leptina per alteracions en els seus receptors s'associen amb obesitat severa i malalties relacionades com la diabetis mellitus³².

3.1.1 Leptina i calcificació vascular

La leptina constitueix un factor de risc independent de malaltia cardiovascular conseqüència del seu paper proaterogènic i promotor de la calcificació vascular, efectes descoberts recentment.

Com ja s'ha dit, la calcificació és conseqüència d'una transició fenotípica experimentada per les VSMCs. Tot i que els mecanismes encara no es troben del tot dilucidats, es tenen coneixements de la participació d'algunes vies de senyalització com la via de transducció Wnt³³. Les Wnt són una família de glicoproteïnes riques en Cys implicades en esdeveniments com l'especificació de les cèl·lules del cervell medi, la polaritat en les extremitats de vertebrats i la formació del tub neural³⁴.

Els membres de la família Wnt interaccionen amb receptors de la família Frizzled (FZD), ubicats a la superfície cel·lular units als coreceptors LRP5/6 (*LDL receptor related protein*). En condicions fisiològiques, la unió de Wnt al seu receptor i la conseqüent activació de FZD/LRP5/6 promou la inactivació de la *Glycogen synthase kinase-3 beta* (GSK-3 β). En el cas de que GSK-3 β fos activa, podria fosforilar β -catenines i marcar-les per la ubiquitinació i degradació proteosòmica; en canvi, quan és inactiva, la β -catenina pot acumular-se en el citoplasma i translocar-se al nucli, on es pot associar amb la proteïna LEF o TCF, transformant-se en un factor de transcripció actiu que pot induir la transcripció de determinats gens (Figura 9)^{33, 34}.

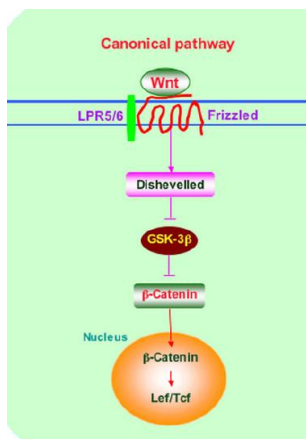


Figura 9. Via de senyalització Wnt en condicions normals. Adaptat de Maiese et al, 2008³⁵

La capacitat de la leptina de modular aquesta via de senyalització s'ha vist en varis tipus cel·lulars, però no s'havia evidenciat en cap model de diferenciació osteogènica fins el 2012 gràcies Melec i col·laboradors³³.

La leptina incrementa l'activitat de la ALP (figura 10A) al mateix temps que inhibeix l'expressió de MGP, la qual cosa posa de manifest el seu paper en la promoció de la calcificació vascular (Figura 10B). Al mateix temps, per tal de fer front a la mineralització, es produeixen increments de l'OPN (Figura 10B)³³.

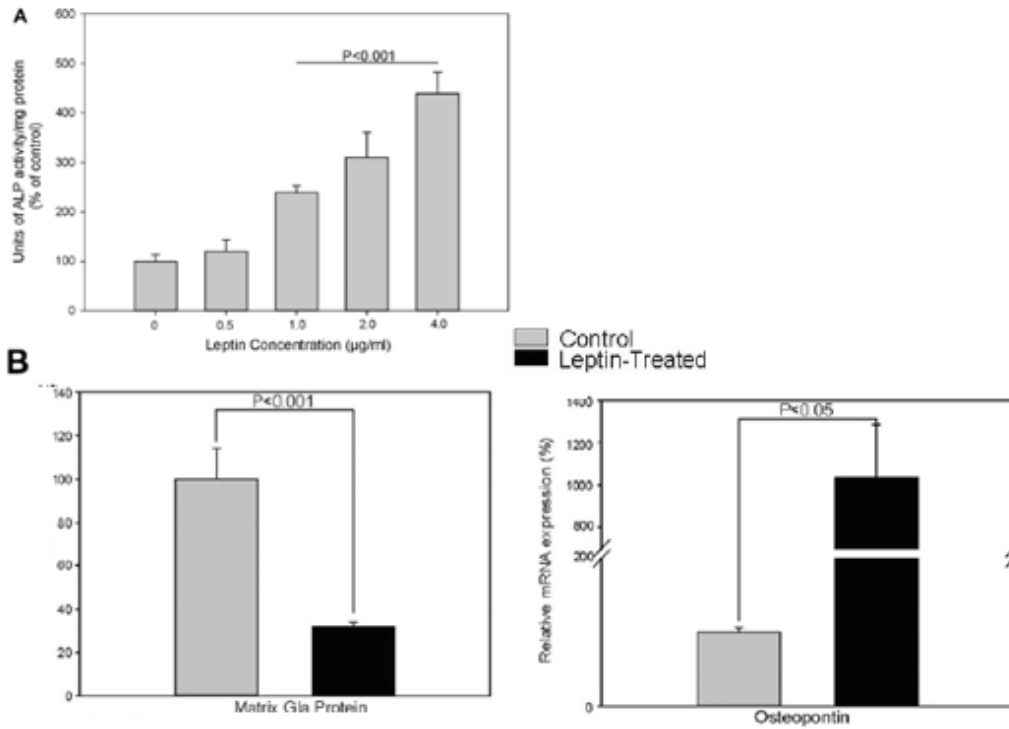


Figura 10. Canvis en l'expressió de marcadors osteoblàstics en VSMCs incubades amb leptina. **A.** Nivells de mRNA d'ALP expressats per SMCs d'aorta bovina (BASMCS) incubades a concentracions creixents de leptina durant 8 dies. S'observa un increment de l'activitat de la ALP dosi-depenent; a una concentració de 4µg/mL l'activitat era 4.4±0.2 vegades superior comparada amb el control. **B.** Nivells de mRNA MGP i OPN en BASMCs incubades a una concentració de 2µg/mL de leptina. Comparat amb el control, s'observa una disminució de MGP i un increment d'OPN. Zeadin et al, 2012³³

Els canvis en l'activitat de tots aquests marcadors osteoblàstics en presència de leptina posa de manifest que la mineralització també incrementa en presència de l'adipoquina, tal i com pot veure's en la Figura 11³³.

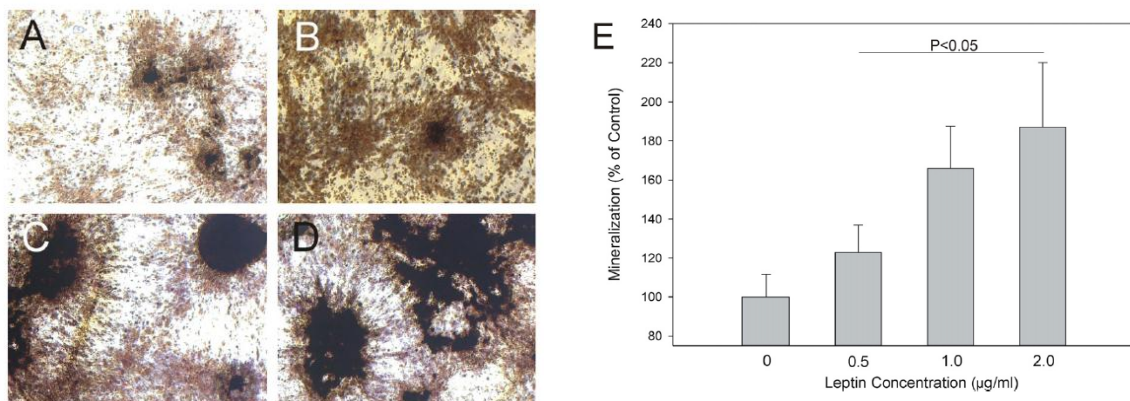


Figura 11. Efecte de la leptina en la mineralització de cultius de BASMCs. **A-D.** BASMCs cultivades a concentracions creixents de leptina (0, 0.5, 1.0 i 2.0µg/ml respectivament) durant 12 dies. **E.** passats els 12 dies les cèl·lules foren tenyides amb tinció von kossa, i es va quantificar el nivell de tinció corresponent amb el grau de mineralització. Zeadin et al, 2012³³

La forma en que du a terme aquesta acció inductora de la diferenciació osteoblàstica de les VSMCs i conseqüent mineralització és a través de la via de senyalització Wnt. Concretament, la leptina indueix la fosforilació de la serina 9 de la GSK-3 β a BASMCs incubades amb l'hormona, que es major a mesura que incrementa el temps d'exposició (Figura 12A) i la concentració de leptina (Figura 12B). Aquesta fosforilació inhibeix la GSK-3 β , promovent la translocació nuclear de les β -catenines³³.

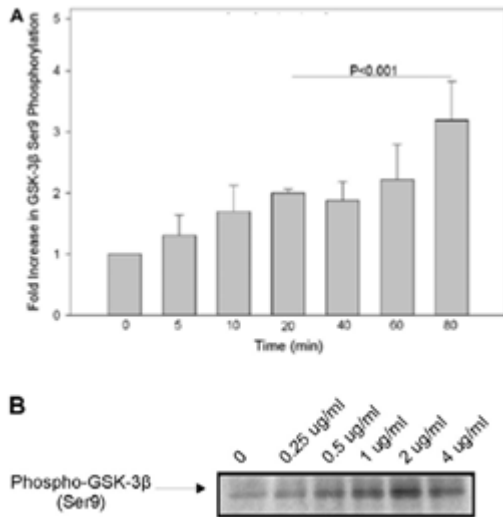


Figura 12. Efecte de la leptina en la fosforilació de la GSK-3 β i conseqüent acumulació de β -catenines en cultius primaris de BASMCs. **A.** BASMCs cultivades a una concentració de 2 μ g/ml de leptina. Nivell de fosforilació majors a mesura que incrementa el temps d'exposició. **B.** Grau de fosforilació de la GSK-3 β en funció de la concentració de leptina. Nivells de fosforilació majors a més concentració. Zeadin et al, 2012³³

La leptina modula l'activitat de la GSK-3 β , que és la que juga un paper directe sobre la diferenciació osteoblàstica. En la seva forma activa, desfosforilada, impedeix la calcificació incrementant l'expressió d'inhibidors de la calcificació i inhibint la de promotors com l'ALP. En canvi, quan és fosforilada, per exemple per la leptina, i, per tant, desactivada, es promou la calcificació. En la figura 13 s'observen els nivells de MGP i ALP en BASMCs on s'ha aconseguit expressar i mantenir l'activitat de GSK-3 β mitjançant la infecció de les cèl·lules amb un adenovirus que expressava GSK-3 β activa, a la que s'havia substituït un residu de Ser per un d'Ala en la posició 9, susceptible de fosforilació (Ad- S9A)³³.

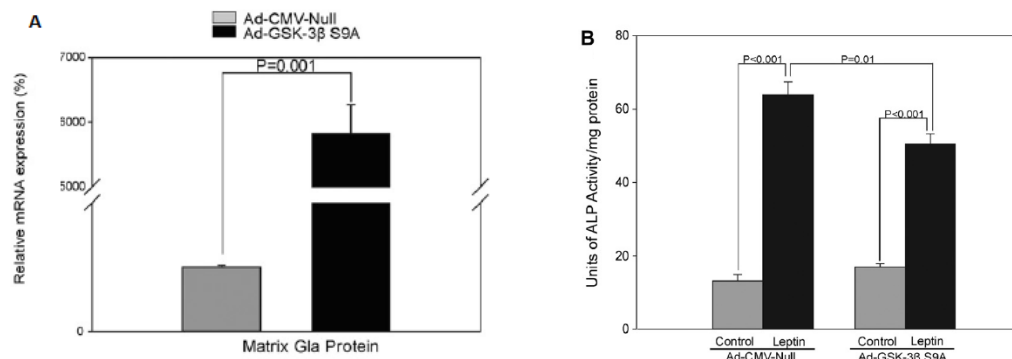


Figura 13. Transfecció d'un adenovirus que expressa constitutivament GSK-3 β activa a BASMCs en cultiu. **A.** Expressió de MGP en BASMCs transfectades amb un adenovirus control (Ad-CMV-Null) o Ad-GSK-3 β S9A. Expressió incrementada gràcies a la GSK-3 β activa **B.** Activitat de ALP mesurada en BASMCs transfectades amb Ad-CMV-Null o Ad-GSK-3 β S9A i en absència o presència de 2 μ g/ml de leptina. Disminució de l'activitat en presència de GSK-3 β activa, en menor grau quan la leptina hi és present Zeadin et al, 2012³³

Hi ha que dir que l'acció de la leptina no es limita a un sol mecanisme. A banda d'incrementar la calcificació a través de la via de senyalització Wnt, també ha estat demostrat que la leptina incrementa l'estrès oxidatiu en les VSMCs, la qual cosa incrementa l'expressió de la BMP-2 amb el conseqüent augment de la calcificació vascular³⁶.

3.2 Adiponectina

L'adiponectina és l'adipoquina més abundant de la circulació a humans³, constituint aproximadament el 0.01% de les proteïnes totals circulants³². Es tracta d'una hormona peptídica de 244aa^{6,7,32}, el gen de la qual es troba localitzat al cromosoma 3q27, un locus relacionat amb la susceptibilitat a la diabetis mellitus i malalties cardiovasculars³². És sintetitzada principalment per adipòcits blancs madurs⁶.

Es troba present en el torrent sanguini de tres formes moleculars diferents: trímers de baix pes molecular (LMW), hexàmers (MMW) i polímers d'elevat pes molecular (HMW)⁶. També s'ha trobat una forma globular, producte actiu de la proteòlisi de l'adiponectina, el *C1q-like globular domain*, que circula pel plasma a baixa concentració^{7,31}.

La major part dels estudis duts a terme fins ara mostren que l'adipoquina té efectes antiinflamatoris i antiaterogènics^{7,31}. En ratolins ApoE deficients, model d'aterosclerosi, es redueix la formació de plaques d'ateroma en l'aorta després de la injecció d'adiponectina via adenovirus. L'adiponectina atenua l'agrupació de monòcits a l'endoteli reduint l'expressió de TNF α ³¹. Així, s'ha suggerit l'existència d'un *feedback* negatiu entre l'adipoquina i les citoquines proinflamatòries ja que la primera inhibeix la producció de TNF α i IL-6, mentre que aquests dos reprimeixen la producció d'adiponectina⁷.

Actua a través de dos receptors: adipoR1, que predomina al múscul, i adipoR2, predominant al fetge. La transducció de la senyal mitjançant aquests receptors implica l'activació de molècules senyal, entre les que destaquen AMPK, MAPK, PPAR α i PPAR γ . Una alteració en aquests receptors o en la senyalització per adipoR1 i adipo R2 fa que l'adipoquina no es pugui unir i sigui degradada, amb totes les conseqüències metabòliques que comporta, com resistència a la insulina i intolerància a la glucosa^{31,32}.

Els nivells d'adiponectina circulants es relacionen negativament amb el BMI de manera que es troben disminuïts en l'obesitat i incrementats en pacients amb anorèxia nerviosa i durant el dejuni en persones sanes^{6,7}. També s'han observat nivells disminuïts en persones amb diabetis mellitus tipus II i malaltia cardiovascular. Entre els mecanismes que disminueixen la secreció de l'adipoquina es troben un ambient hormonal anormal, un increment de l'estrès oxidatiu i un estat proinflamatori, factors que prevalen en l'obesitat i síndrome metabòlic⁶. S'ha proposat que els nivells baixos d'adiponectina podrien constituir un marcador per a la detecció prematura d'aterosclerosi en pacients obesos³. A més, la detecció de les diferents formes en que es troba l'adiponectina en plasma (LMW, MMW, HMW) pot contribuir-hi ja que s'ha vist que la isoforma HMW actua com un marcador de malaltia cardiovascular⁷.

3.2.1 Adiponectina i calcificació vascular

L'adiponectina, a banda de les funcions ja esmentades, també juga un paper molt important en la calcificació vascular ja que s'ha vist que ratolins deficientes en l'adipoquina (adiponectina^{-/-}) presenten nivells aòrtics de calci i activitat ALP més elevats del normal, desenvolupant una lleugera calcificació arterial amb el temps³⁷.

La injecció d'adenovirus que sobreexpressen adiponectina a ratolins *knockout* per a l'hormona evidencia que el seu dèficit és el responsable del desenvolupament de la calcificació en aquests animals. En la figura 14 s'observa una disminució dels nivells de calci i activitat ALP després de la injecció de l'adiponectina³⁷.

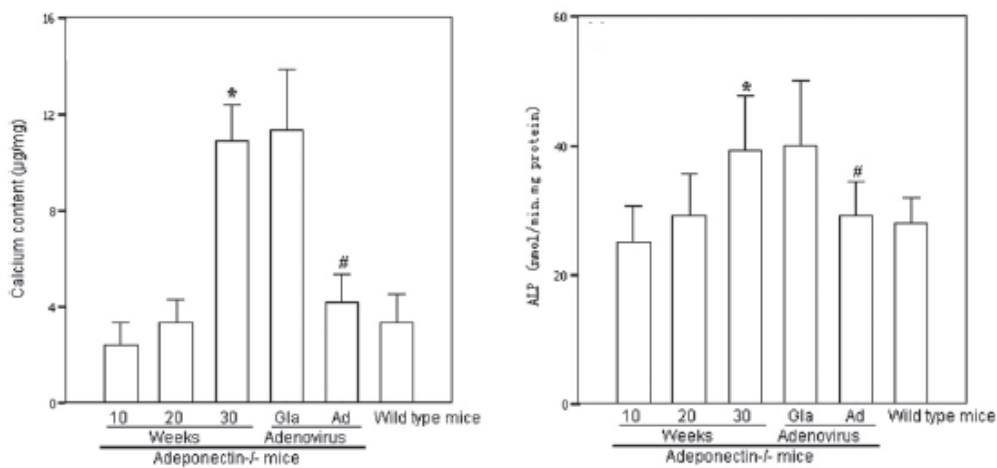


Figura 14. Concentració de calci (A) i activitat d'ALP (B) en ratolins *knockout* per a l'adiponectina alimentats amb una dieta a base de pinso durant 10,20 i 30 setmanes, i després de la injecció amb un adenovirus que expressa adiponectina (Ad) o β -Galactosidasa (Gla). Luo et al. 2009.³⁷

La funció de l'adiponectina en la calcificació és exercida a través del receptor AdipoR1, que és el que s'expressa principalment en les VSMCs. El que fa aquesta hormona és disminuir l'activitat de l'ALP, Runx2 i osteocalcina en aquestes cèl·lules de forma dependent de la concentració (Figura 15)³⁷.

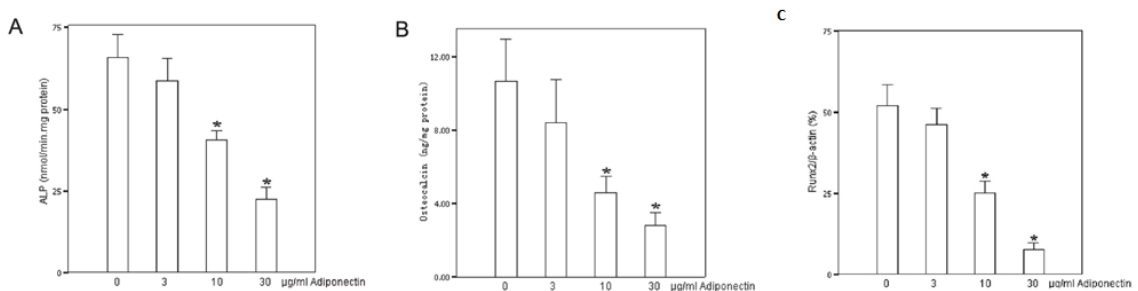


Figura 15. Efectes de l'adiponectina en l'activitat d'ALP (A), osteocalcina (B) i Runx2 (C) a VSMCs. Les cèl·lules foren cultivades amb un vehicle o a concentracions de 3, 10 o 30 µg/ml d'adiponectina. Luo et al. 2009.³⁷

D'aquesta manera, l'adiponectina disminueix la formació de nòduls de mineral càlcic a través de la disminució dels nivells d'expressió i activitat de marcadors osteoblàstics, tal i com pot veure's en la Figura 16³⁷.

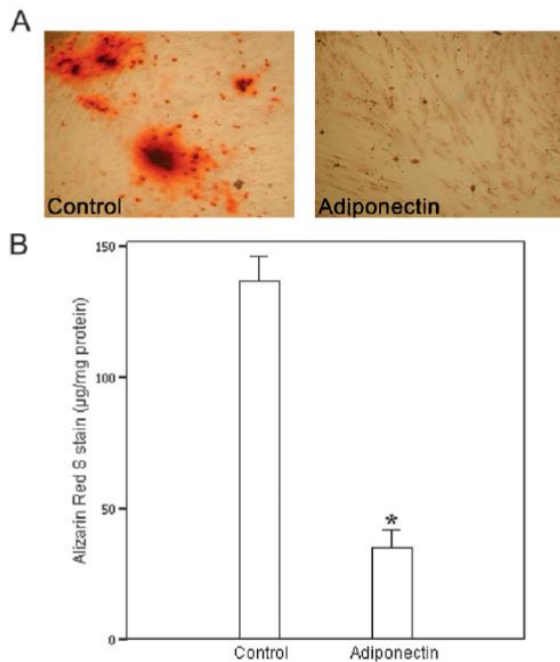


Figura 16. Inhibició de la mineralització per part de l'adiponectina. Cultiu de VSMCs calcificades en absència o presència de 30µg/ml d'adiponectina. La mineralització fou determinada per tinció amb vermell alizarina, específica per a la detecció de dipòsits de calci. **A.** Imatge representativa de la calcificació obtinguda per microscopía x200. **B.** Quantificació del grau de tinció per espectrofotometria. Luo et al, 2009³⁷

A través d'aquesta mateixa via de senyalització que regula tots aquests esdeveniments, AdipoR1/p38MAPK, l'adiponectina participa en la formació òssia, la qual cosa suggereix que depenent del tipus cel·lular participen fonamentalment uns o altres membres p38MAPK, els quals tenen accions molt diferents en el creixement cel·lular, diferenciació, apoptosi o hipertrofia³⁷.

3.3 Resistina

La resistina és una adipoquina de 12.5kDa descoberta el 2001, també coneguda com FIZZ (*found in inflammatory zone*)^{7,32}. Forma part de la família de proteïnes rica en Cys anomenada *resistina-like molecules*⁷. Principalment és secretada per adipòcits, tot i que també pot ser alliberada per macròfags, neutròfils i altres tipus cel·lulars³². S'han trobat dues formes diferents de resistina, una en forma d'hexàmer, molt abundant, i una en forma de trímer, menys abundant però més bioactiva⁶.

Tan a ratolins com a humans hi ha una relació positiva entre els nivells sèrics de resistina i l'obesitat degut a que la seva expressió és estimulada per factors inflamatoris, incrementats en aquesta patologia^{3,32}.

Pel que fa a la similitud entre espècies, entre ratolins i humans només s'ha trobat un 64% d'homologia en la seqüència de mRNA i un 59% en l'estructura aminoacídica, de tal manera que la funció fisiològica de la resistina podria ser diferent⁷. És per això que els models animals han mostrat que aquesta hormona promou resistència a insulina però a humans no està del tot clar⁶. S'ha postulat que a humans la resistina està implicada en la regulació de determinats processos metabòlics i en l'activació de processos inflamatoris^{6,7}. A més, nivells elevats s'han associat amb una disfunció endotelial i malaltia coronària, ja que per una banda, allibera endotelina -1 i, per altra, augmenta l'expressió de molècules d'adhesió com VCAM-1 i MCP-1, implicats en la formació i desenvolupament de plaques d'ateroma³.

3.3.1 Resistina i calcificació vascular

L'estenosi aòrtica (AS) és un procés patològic que es troba íntimament relacionat amb l'aterosclerosi ja que implica una deposició lipídica, inflamació crònica, reclutament de macròfags al teixit vascular i una calcificació de les valves aòrtiques³⁸. Monty i els seus col·laboradors van demostrar que elevats nivells de resistina es troben associats a aquesta malaltia, concretament amb el grau de calcificació vascular i inflamació, sobretot en pacients d'edat més avançada^{39,40}.

La resistina, *in vitro*, incrementa la inflamació via NF- κ B, directament implicat amb l'AS. A més a més, la resistina té altres funcions a l'endoteli vascular, com: incrementar la formació de cèl·lules espumoses a través d'un augment en l'expressió dels receptors *scavenger* dels macròfags, procés clau en el desenvolupament de l'aterosclerosi⁴¹; potenciar l'expressió de molècules d'adhesió i participar de forma activa en el reclutament de macròfags que, a través de la producció de citoquines proinflamatòries, tenen la capacitat de promoure la calcificació. Així, és evident que la resistina juga un paper molt important en la patogènia de l'estenosi aòrtica³⁹.

Elements com l'edat, la creatinina, la leptina o el BMI promouen l'expressió i activitat de la resistina³⁹. En canvi, factors com les sirtuïnes, concretament la sirtuïna-1 (sirt-1), s'han associat a una disminució de l'expressió de l'adipoquina³⁸.

La sirt-1 és una desacetilasa que s'uneix a una gran varietat de factors de transcripció i cofactors nuclears. Entre les seves funcions es troben la de disminuir la formació de cèl·lules espumoses, promoure la vasorelaxació induïda per NOS (òxid nítric sintasa), reduir l'expressió de TNF α i de metaloproteasa 9, l'activitat de la qual incrementa la degeneració de la vàlvula aòrtica i activa components que s'ha vist que disminueixen el perfil inflamatori³⁸. D'aquesta manera es suggereix un paper de la sirt-1 antagonista al de l'adipoquina.

Carter i col·laboradors³⁸ van demostrar que l'expressió de Sirt-1, disminuïda en pacients amb AS, regula negativament els nivells de resistina expressats pels macròfags de l'endoteli. Així, nivells baixos de sirt-1 en calcificacions aòrtiques potencien l'increment dels nivells de resistina i, per tant, de l'estat inflamatori i la calcificació (Figura 17).

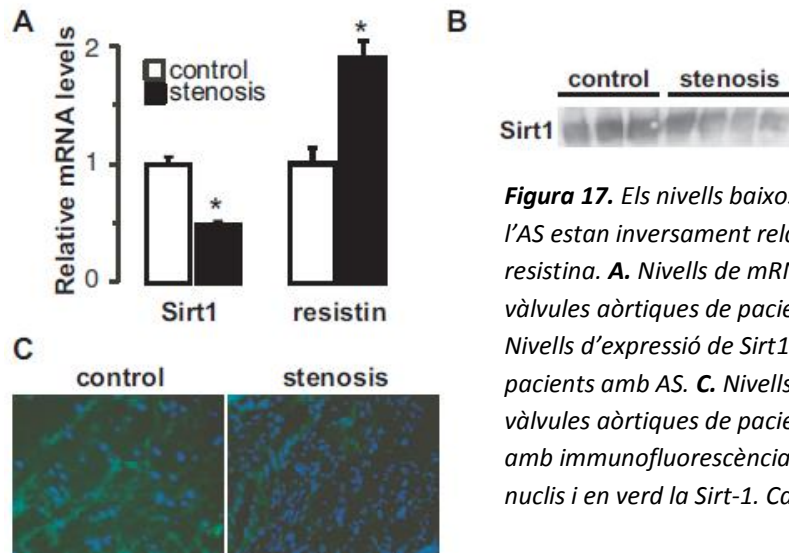


Figura 17. Els nivells baixos de Sirt1 que es troben en l'AS estan inversament relacionats amb l'expressió de resistina. **A.** Nivells de mRNA de Sirt1 i resistina en vàlvules aòrtiques de pacients amb estenosi. **B.** Nivells d'expressió de Sirt1 en pacients control i pacients amb AS. **C.** Nivells de proteïna Sirt1 en vàlvules aòrtiques de pacients amb AS visualitzades amb immunofluorescència. En blau s'observen els nuclis i en verd la Sirt-1. Carter et al, 2012³⁸

S'ha vist també que el resveratrol, inductor de la sirt-1, pot inhibir els efectes de LPS (lipopolisacàrid inductor de l'acció de la resistina), de forma que aquest és un dels motius pels quals s'està investigant últimament el paper antiinflamatori del resveratrol i la seva importància en la salut cardiovascular³⁸.

3.4 Citoquines

Les citoquines són un tipus de molècules amb funció autocrina i/o endocrina. Tot i que han estat conegudes tradicionalment per la seva funció immune, els darrers anys s'ha vist que poden estar implicades en altres processos.

El teixit adipós, com a òrgan endocrí, té la capacitat de secretar certes citoquines, algunes de les quals s'engloben dins del grup d'adipoquines. A diferència de les altres esmentades fins al moment, l'adiponectina, leptina i resistina, les citoquines no són secretades principalment pels adipòcits, sinó per la fracció estromal del teixit adipós, fonamentalment macròfags.

En aquesta revisió es tractaran les principals citoquines implicades el control de la calcificació vascular, ja sigui mitjançant la seva promoció, com és el cas del TNF α i la IL-6, o a través de la seva inhibició, com l'omentina.

3.4.1 TNF α i IL-6

El TNF α i la IL-6 són citoquines proinflamatòries expressades principalment per macròfags. Entre les seves accions s'ha vist que juguen un paper aterogènic important a través de l'expressió de molècules d'adhesió a les parets dels vasos⁶ i la disminució de l'expressió de NOS. A més a més, s'ha vist que promouen la calcificació en les plaques ateroescleròtiques. El que ocorre és que la lesió ateroescleròtica induïx una infiltració ràpida de macròfags i limfòcits T a la zona afectada, els quals alliberen citoquines proinflamatòries responsables, en part, de l'apoptosi i transdiferenciació de les VSMCs¹⁵.

Com s'ha explicat, el RANKL és un promotor de la calcificació i hi ha evidències de que la seva acció és duta a terme a través de la inducció dels macròfags per a que alliberin citoquines inflamatòries, que seran les responsables directes de la diferenciació osteoblàstica¹⁵.

Per una banda, les citoquines proinflamatòries induïxen l'expressió de RANKL, fet que Deuell i col·laboradors van demostrar mitjançant la incubació de SMCs amb TNF α (Figura 18)¹⁵.

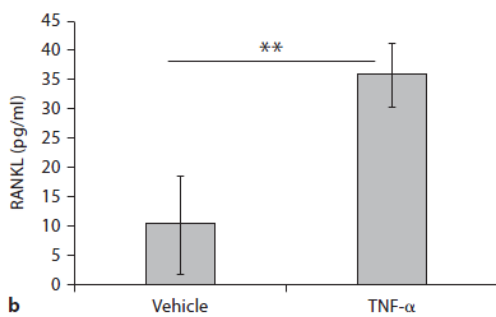


Figura 18. Nivells de RANKL en SMCs incubades amb un vehicle o amb TNF α durant 48h. Deuell et al, 2011¹⁵

Al mateix temps, RANKL promou l'alliberació d' IL-6 i TNF α , els quals promouen la calcificació i l'alliberació de més quantitat de RANKL, incrementant encara més la calcificació (Figura 19). Aquests efectes es veuen potenciats si el medi és ric en fòsfat¹⁵.

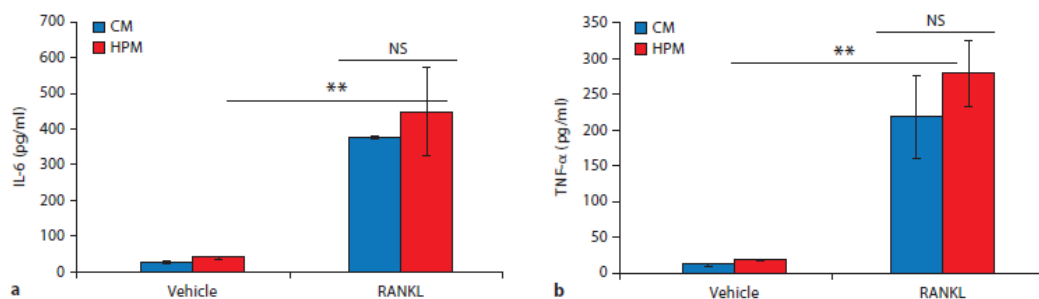


Figura 19. El RANKL incrementa la calcificació en VSMCs mitjançant l'augment d'expressió d'IL-6 i TNF α . Les cèl·lules foren tractades amb RANKL o un vehicle durant 48hores, en medi de cultiu normal (CM) o ric en fòsfat (HPM). Deuell et al, 2011¹²

TNF α i IL-6 són els responsables principals de la mineralització d'aquestes cèl·lules, induïts per RANKL, essent més potent el TNF α que la IL-6, tot i que quan hi són presents els dos alhora mostren un clar efecte sinèrgic (Figura 20)¹⁵.

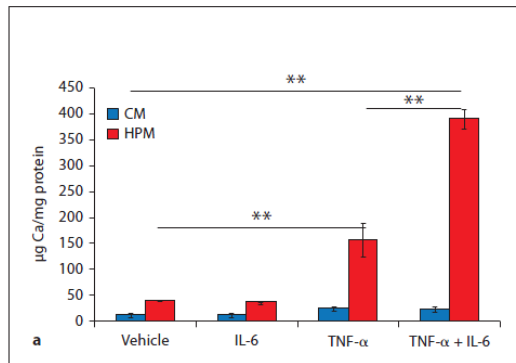


Figura 20. Efecte sinèrgic del TNF α i IL-6 en la promoció de la calcificació. Les cèl·lules foren cultivades en CM o HPM amb 50ng/ml d'IL-6, 10ng/ml de TNF α o una combinació dels dos factors. S'indiquen els nivells de calci en les cèl·lules. Deuell et al, 2011¹⁵

El que fan aquestes citoquines és induir l'expressió dels gens que codifiquen per a Pit-1, ALP i Runx2 mentre que inhibeixen el de MGP, tal com pot veure's en la figura 21¹⁵. A més a més, Lencel i col·laboradors van aportar que l'increment de l'expressió concretament de la ALP és dut a terme a través del PPAR γ . El PPAR γ , el qual és inhibit per TNF α , en condicions normals, manté inhibida la ALP a VSMCs. D'aquesta forma, si el TNF α es troba en concentració incrementada, inhibirà el PPAR γ , produint-se augments de ALP i, en conseqüència, promoció de la calcificació vascular⁴².

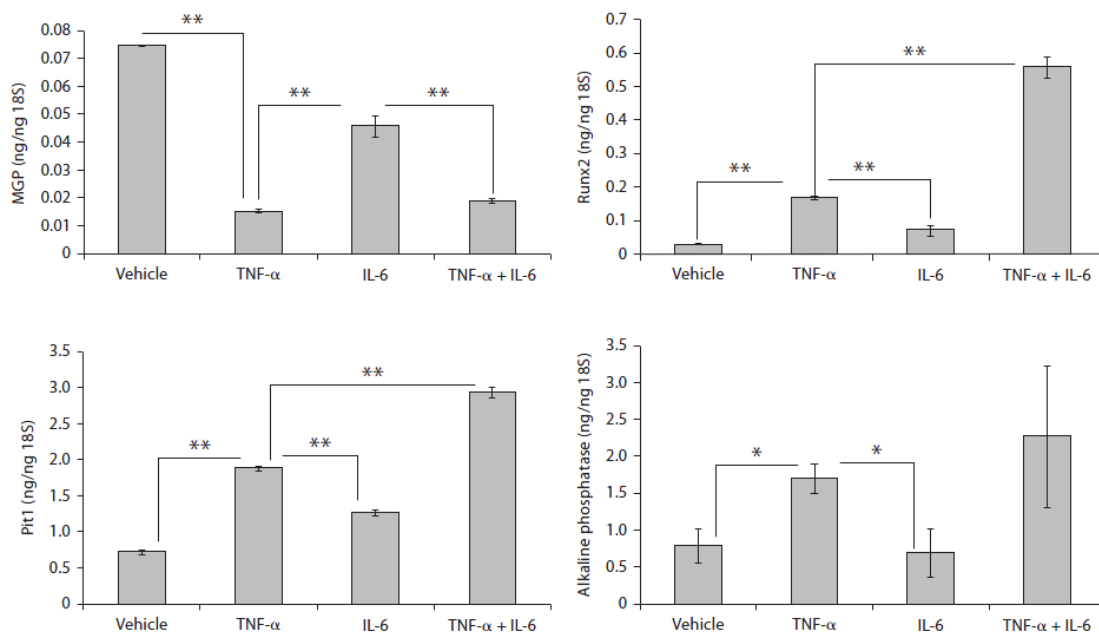


Figura 21. Expressió de diferents marcadors de la calcificació induïda per IL-6, TNF α o ambdós. Les cèl·lules foren cultivades en CM o HPM amb un vehicle, 50ng/ml d'IL-6, 10ng/ml de TNF α o una combinació dels dos factors durant 48h. Deuell et al, 2011¹⁵

3.5 Omentina

L'omentina és un pèptid de 313 aminoàcids expressat principalment pel teixit adipós visceral³. S'han trobat varies isoformes de la proteïna, tot i que l'omentina-1 és la principal del plasma humà, en una concentració aproximada de 100ng-1µg/ml³.

És una adipoquina que ha estat descoberta recentment, de forma que es coneix poc sobre ella. En estudis fets amb aortes de rata aïllada s'ha vist que l'omentina induiria una vasodilatació a l'endoteli mediada per l'enzim NOS³. Per altra banda, estudis recents mostren que l'omentina-1 es troba implicada en la inhibició de la diferenciació osteoblàstica de les VSMCs *in vitro*^{43,44}. L'omentina inhibeix la transcripció d'ALP i osteocalcina a VSMCs. En la figura 22 es pot veure com la incubació de cèl·lules amb nivells creixents d'omentina disminueix l'expressió i activitat de la ALP (Figura 22A) i producció d'osteocalcina (figura 22B), reduint per tant la mineralització (Figura 22C)⁴⁴.

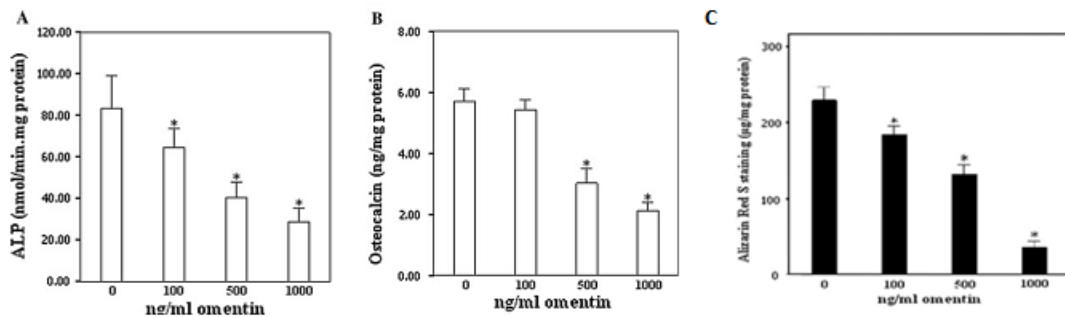


Figura 22. A. Efectes de l'omentina sobre l'activitat de la ALP en VSMCs exposades a una concentració de 100-1000ng/ml d'omentina durant 48h. B. Efectes de l'omentina sobre l'expressió d'osteocalcina en VSMCs exposades a una concentració de 100-1000ng/ml d'omentina durant 48h. C. Inhibició de la mineralització a VSMCs calcificades per part de l'omentina. Les cèl·lules foren incubades amb un vehicle o amb omentina (100,500,1000ng/ml) durant 18 dies i després foren tenyides amb tinció vermell d'Alizarin. La gràfica representa el grau de tinció. Duan et al, 2011⁴⁴

Per altra banda, l'omentina estimula la producció d'OPG en cultius de VSMCs alhora que inhibeix la producció de RANKL en VSMCs ja calcificades (Figura 23). Inclús en ratolins *knockout* per a OPG (OPG^{-/-}), l'omentina-1 té la capacitat d'inhibir la calcificació aòrtica massiva que presenten mitjançant la disminució del contingut de calci (Figura 24)⁴⁴.

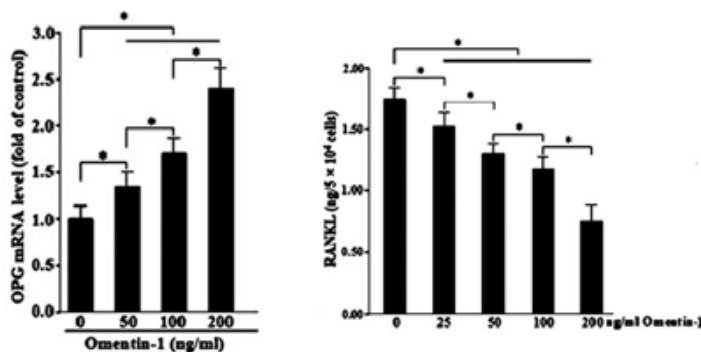


Figura 23. VSMCs incubades en presència d'omentina. S'observa un increment dels nivells de mRNA d'OPG i una disminució de RANKL. Xie et al, 2011⁴³.

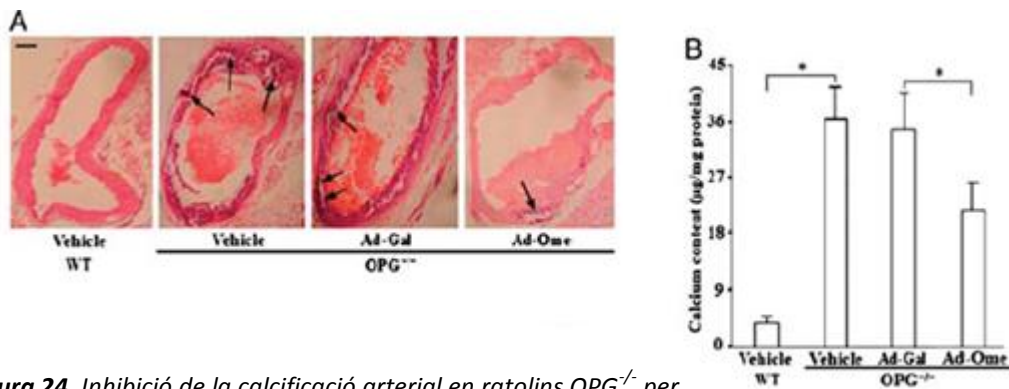


Figura 24. Inhibició de la calcificació arterial en ratolins $OPG^{-/-}$ per omentina-1. **A.** seccions d'aorta tenyida amb hematoxilina i eosina, que detecten la calcificació. **B.** Contingut de calci en l'aorta. Es veu una disminució quan s'injecta un adenovirus que conté omentina expressada. Xie et al, 2011⁴³.

Totes aquestes accions exercides per l'omentina-1 depenen de la via de senyalització PI3K/Akt. L'omentina el que fa és estimular l'activitat d'Akt a les VSMCs calcificades a través d'un increment en el seu estat de fosforilació. Aquesta activació de l'Akt per omentina pot ser inhibida per inhibidors de PI3K, com LY294002, o inhibidors de la pròpia Akt, com HIMO^{43,44}.

Així doncs, es pot veure que efectivament l'omentina, igual que l'adiponectina, inhibeix la calcificació vascular. S'ha comprovat que el fet de combinar els dos tractaments, adiponectina i omentina potencia aquesta disminució dels nivells de calcificació, mostrant un clar efecte sinèrgic⁴³.

4. Conclusions

1. La calcificació vascular és un procés actiu, altament regulat, amb moltes similituds amb el metabolisme ossi.
2. Les darreres evidències suggereixen un paper important de les adipoquines secretades pel teixit adipós i els mecanismes implicats en la mineralització vascular.
 - 2.1 *Leptina*. La leptina indueix la diferenciació osteoblàstica de les VSMCs incrementant els nivells de ALP i disminuint els de MGP.
 - 2.2 *Adiponectina*. L'adiponectina disminueix els nivells d'expressió i activitat de marcadors osteoblàstics, disminuint així la formació de nòduls de fosfat càlcic.
 - 2.3 *TNF α i IL-6*. La calcificació a les plaques d'ateroma sol anar acompanyada d'inflamació a través de citoquines proinflamàtores secretades pels macròfags infiltrats en la lesió. Entre aquestes citoquines es troben el TNF α i la IL-6, els quals indueixen l'expressió de marcadors osteoblàstics, contribuint al manteniment de la calcificació a la capa íntima.
 - 2.4 *Omentina*. La omentina augmenta els nivells d'OPG i disminueix els de RANKL, inhibint la calcificació vascular.
 - 2.5 *Resistina*. La resistina augmenta la formació de cèl·lules espumoses i el reclutament de macròfags a les lesions ateroscleròtiques, implicats en la calcificació, contribuint de forma indirecta en el procés patològic.
3. Entre els factors associats al desenvolupament de calcificacions vasculares es troba:
 - 3.1 *Malalties renals*. La diàlisi i, conseqüentment, les nivells de fosfat als quals es troben sotmesos els malalts renals constitueixen un factor de risc per a la formació de nòduls de fosfat càlcic i deposició d'aquests en la capa mitjana dels vasos sanguinis.
 - 3.2 *Aterosclerosi*. La formació de plaques d'ateroma i el desenvolupament d'estenosi aòrtica es troba altament relacionat amb la calcificació de les plaques a causa dels baixos nivells de sirt-1 en aquests pacients, que és inversament proporcional a l'activitat de la resistina.
 - 3.3 *Edat*. L'edat es relaciona amb la calcificació a través del risc de patir aterosclerosi però també amb el fet que les persones majors presenten majors nivells de resistina.

3.4 *Obesitat.* Amb l'obesitat, el perfil de secreció del teixit adipós canvia, amb un balanç favorable cap a la inflamació. Es produeix un increment dels nivells de leptina, citoquines proinflamatòries i resistina paral·lels a una disminució de la concentració d'adiponectina i omentina.

3.5 *Diabetis Mellitus.* Els pacients amb DM II presenten menors nivells d'adiponectina.

4. Els estudis fets fins ara són molt recents, de forma que es tracta d'un camp obert àmpliament a la investigació. Cal potenciar-ne la recerca ja que és un factor de risc clau per al desenvolupament de malalties cardiovasculars, primera causa de mort en els països desenvolupats. És necessari doncs seguir treballant per tal de poder trobar mètodes diagnòstics prematurs del procés patològic i teràpies efectives per evitar les patologies cardiovasculars i cerebrovasculars associades.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Grases, F., Costa, A. & Söhnel, O in *Cristalización en disolución. Conceptos básicos* (Reverté, Barcelona, 2000)
2. Mebarek S, Abousalham A, Magne D, et al. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: Roles in physiological and pathological mineralizations. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5036-5129.
3. Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med*. 2011;9:25-7015-9-25.
4. Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol*. 2013;216(1):T17-36.
5. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:802078.
6. Raucci R, Rusolo F, Sharma A, Colonna G, Castello G, Costantini S. Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine*. 2013;61(1):1-14.
7. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B. The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr*. 2012;51(5):513-528.
8. Kalra SS, Shanahan CM. Vascular calcification and hypertension: Cause and effect. *Ann Med*. 2012;44 Suppl 1:S85-92.
9. Zhu D, Mackenzie NC, Farquharson C, Macrae VE. Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:95.
10. Nakagami H, Osako MK, Morishita R. New concept of vascular calcification and metabolism. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9(1):124-127.
11. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: Key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*. 2011;109(6):697-711.
12. Guerrero, F. *Calcificación vascular asociada a inflamación: Influencia de la vitamina D* (Departamento de Medicina y Cirugía animal, Universidad de Córdoba, 2012)
13. Ross, M. & Pawlina, W. in *Histología. Texto y atlas color con Biología celular y molecular* (Médica Panamericana, Buenos Aires, 2007)
14. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(9):528-536.
15. Deuell KA, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: Dependence on IL-6 and TNF-alpha. *J Vasc Res*. 2012;49(6):510-521.
16. Neven E, D'Haese PC. Vascular calcification in chronic renal failure: What have we learned from animal studies? *Circ Res*. 2011;108(2):249-264.
17. Valdivielso JM. Vascular calcification: Types and mechanisms. *Nefrología*. 2011;31(2):142-147.
18. Speer MY. Smooth muscle cells in pathogenesis of vascular medial cartilaginous metaplasia. *Cardiovasc Res*. 2011;90(1):1-2.
19. Sanchís, P. Estudio de los procesos patológicos de cristalización: litiasis renal, calcificaciones cardiovasculares y osteoporosis (Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, 2008)
20. London GM. Arterial calcification: Cardiovascular function and clinical outcome. *Nefrología*. 2011;31(6):644-647.
21. Lau WL, Pai A, Moe SM, Giachelli CM. Direct effects of phosphate on vascular cell function. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2011;18(2):105-112.
22. Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol*. 2011;33(5):409-417.
23. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: The killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1453-1464.
24. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: A potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2857-2867.
25. Mejia N, Roman-Garcia P, Miar AB, Tavira B, Cannata-Andia JB. Chronic kidney disease--mineral and bone disorder: A complex scenario. *Nefrología*. 2011;31(5):514-519.

26. Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):379-388.
27. Rennenberg RJ, Schurgers LJ, Kroon AA, Stehouwer CD. Arterial calcifications. *J Cell Mol Med.* 2010;14(9):2203-2210.
28. Liberman M, Johnson RC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413(3):436-441.
29. Reyes-Garcia R, Rozas-Moreno P, Munoz-Torres M. Cardiovascular disease and bone metabolism. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(7):353-359.
30. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology.* 2012;58(1):15-23.
31. Rocha VZ, Folco EJ. Inflammatory concepts of obesity. *Int J Inflam.* 2011;2011:529061.
32. Scotece M, Conde J, Gomez R, et al. Role of adipokines in atherosclerosis: Interferences with cardiovascular complications in rheumatic diseases. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:125458.
33. Zeadin MG, Butcher MK, Shaughnessy SG, Werstuck GH. Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(4):924-930.
34. Gilbert, S. in *Biología Molecular del Desarrollo* (Médica Panamericana, Buenos Aires, 2005)
35. Maiese K, Li F, Chong ZZ, Shang YC. The wnt signaling pathway: Aging gracefully as a protectionist? *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):58-81.
36. Serrano CV, Jr, Oranges M, Brunaldi V, et al. Skeletonized coronary arteries: Pathophysiological and clinical aspects of vascular calcification. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7:143-151.
37. Luo XH, Zhao LL, Yuan LQ, Wang M, Xie H, Liao EY. Development of arterial calcification in adiponectin-deficient mice: Adiponectin regulates arterial calcification. *J Bone Miner Res.* 2009;24(8):1461-1468.
38. Carter S, Miard S, Roy-Bellavance C, et al. Sirt1 inhibits resistin expression in aortic stenosis. *PLoS One.* 2012;7(4):e35110.
39. Mohty D, Pibarot P, Despres JP, et al. Age-related differences in the pathogenesis of calcific aortic stenosis: The potential role of resistin. *Int J Cardiol.* 2010;142(2):126-132.
40. Kolasa-Trela R, Miszalski-Jamka T, Grudzien G, Wypasek E, Kostkiewicz M. Adiponectin, leptin, and resistin in patients with aortic stenosis without concomitant atherosclerotic vascular disease. *Pol Arch Med Wewn.* 2011;121(10):352-359.
41. Shyu KG, Lien LM, Wang BW, Kuan P, Chang H. Resistin contributes to neointimal formation via oxidative stress after vascular injury. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(3):121-129.
42. Lencel P, Delplace S, Pilet P, et al. Cell-specific effects of TNF-alpha and IL-1beta on alkaline phosphatase: Implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab Invest.* 2011;91(10):1434-1442.
43. Xie H, Xie PL, Wu XP, et al. Omentin-1 attenuates arterial calcification and bone loss in osteoprotegerin-deficient mice by inhibition of RANKL expression. *Cardiovasc Res.* 2011;92(2):296-306.
44. Duan XY, Xie PL, Ma YL, Tang SY. Omentin inhibits osteoblastic differentiation of calcifying vascular smooth muscle cells through the PI3K/Akt pathway. *Amino Acids.* 2011;41(5):1223-1231