



ORIGINAL

Nanopartículas calcificantes como factor etiológico del desarrollo de hiperplasia y calcificación vascular



N. Cenizo Revuelta^{a,*}, J.A. González-Fajardo^a, M.A. Bratos Pérez^b, T. Álvarez Gago^c, B. Aguirre Gervás^d y C. Vaquero Puerta^a

^a Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

^c Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

^d Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

Recibido el 10 de agosto de 2015; aceptado el 29 de septiembre de 2015

Disponible en Internet el 11 de noviembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Calcificación arterial;
Atorvastatina;
Nanopartículas calcificantes;
Hiperplasia

Resumen

Objetivo: Nanopartículas calcificantes (NP) se han detectado recientemente en muestras arteriales humanas y parecen estar involucradas en el proceso de calcificación. Este estudio fue diseñado para probar la hipótesis de que las NP de origen humano podrían agravar la respuesta a la lesión arterial endotelial e inducir la calcificación vascular.

Métodos: La arteria carótida derecha de 24 conejos neozelandeses fue lesionada con un balón de angioplastia. Los animales fueron perfundidos por vía intravenosa con solución salina (100 ml) durante el experimento y se dividieron en 3 grupos: grupo A, control; grupo B, expuesto a NP (2 ml) obtenidas a partir de válvulas aórticas calcificadas y el grupo C, expuesto a NP (2 ml) y tratado después de la operación con atorvastatina (2,5 mg/kg/24 h). A los 30 días, los animales fueron sacrificados y se extirparon las 2 arterias carótidas, que fueron examinadas histológicamente. Análisis bioquímicos de sangre fueron realizados durante el estudio.

Resultados: El área de hiperplasia intimal fue significativamente mayor en la arteria carótida derecha lesionada en comparación con la arteria carótida izquierda no operada, en todos los grupos. No hubo variación significativa en la zona medial entre los animales. Morfométricamente, la relación de íntima/media (IMR) fue significativamente mayor en las carótidas dañadas en comparación con los controles. Un aumento significativo de IMR se encontró en el grupo B ($1,81 \pm 0,41$) en comparación con el grupo A ($0,38 \pm 0,59$; $p=0,004$) o el grupo C ($0,89 \pm 0,79$; $p=0,035$). Las diferencias entre los grupos C y A no fueron significativas ($p=0,064$). Se observaron calcificaciones en 6 animales, todos los cuales habían sido expuestos a NP (4 en el grupo B, 2 en el grupo C, $p=0,027$). Los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos se mantuvieron estables.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: noecen@yahoo.es (N. Cenizo Revuelta).

Conclusiones: Este estudio confirma la capacidad de las NP de origen humano de acelerar la hiperplasia y estimular la calcificación de zonas arteriales endoteliales previamente dañadas. Su administración sistémica resultó inofensiva en las arterias sanas. La atorvastatina demostró la capacidad de ralentizar este proceso.

© 2015 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Arterial calcification;
Atorvastatin;
Calcifying
nanoparticles;
Hyperplasia

Calcifying nanoparticles in the aetiology of hyperplasia and calcification

Abstract

Objective: Calcifying nanoparticles (NP) have been detected recently in calcified human arterial specimens, and are involved in the process of calcification. This study was designed to test the hypothesis that human-derived NP could worsen the response to arterial endothelial injury and induce vascular calcification.

Methods: The right carotid artery of 24 New Zealand rabbits was injured with an angioplasty balloon. Animals were perfused intravenously with saline (100 mL) during the experiment and divided into 3 groups: group A, control; group B, exposed to NP (2 mL) obtained from calcified aortic valves; and group C, exposed to NP (2 mL) and treated post-operatively with atorvastatin (2.5 mg/kg/24h). At 30 days, both carotid arteries were removed and examined histologically. Blood measurements were monitored during the study.

Results: The intimal hyperplasia area was significantly larger in the injured right carotid artery compared with the left un-operated carotid artery in all groups. There was no significant variation in medial area between groups. Morphometrically, the intima/media ratio (IMR) was significantly higher in damaged carotids compared with controls. A significant increase in the IMR was found in group B (1.81 ± 0.41) compared with group A (0.38 ± 0.59 ; $P=.004$) or group C (0.89 ± 0.79 ; $P=.035$). Differences between groups C and A were not significant ($P=.064$). Calcifications were observed in 6 animals, all of which had been exposed to NP (4 in group B, and 2 in group C, $P=.027$). Plasma levels of cholesterol and triglycerides remained stable.

Conclusions: This study confirms the ability of systemic inoculation of human-derived NP to accelerate hyperplasia and stimulate calcification in localised areas of arteries previously submitted to endothelial damage, while it was harmless in healthy arteries. Atorvastatin was demonstrated to slow down this process.

© 2015 SEACV. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La calcificación arterial es una entidad frecuentemente asociada a la enfermedad cardiovascular, que hoy día es reconocida como un factor predictivo de peor pronóstico de la enfermedad¹⁻³. Se están dedicando numerosos esfuerzos al estudio de sus causas con objeto de diseñar terapias que prevengan o frenen su progresión⁴⁻⁷. Algunos aspectos etiológicos de la calcificación arterial han sido aclarados y explicarían la mayor incidencia en pacientes diabéticos y, sobre todo, con insuficiencia renal crónica terminal en hemodiálisis (disregulación del metabolismo mineral⁵⁻⁷, tensión parietal hemodinámica⁸, calcificación paradójica, etc.)⁹⁻¹¹. Otras veces, se desconoce por qué unos pacientes presentan esta enfermedad y otros no, por lo que la etiología molecular específica no está completamente aclarada.

Las nanopartículas calcificantes (NP) o *nanobacterias* son agentes de muy pequeño tamaño (0,08-0,5 μm), autorreplicantes, que fueron descubiertos por Kajander et al.^{12,13} como contaminantes de un cultivo celular; posteriormente se relacionaron con calcificación ectópica a diferentes niveles¹⁴⁻¹⁷, incluidas arterias o válvulas cardíacas^{3,18,19}.

Dada su capacidad de formar fosfato cálcico en las condiciones fisiológicas del torrente sanguíneo, se han señalado como un potencial factor infeccioso de calcificación patológica²⁰⁻²².

Este estudio se diseñó para testar la hipótesis de que las NP podrían empeorar el daño arterial e inducir calcificación en un modelo animal. Como objetivo secundario, basado en las propiedades pleiotrópicas de las estatinas, se valoró el efecto terapéutico protector de la atorvastatina en la prevención de tales lesiones.

Métodos

Cultivo y preparación de nanopartículas calcificantes

Se obtuvieron NP de origen humano a partir de válvulas aórticas calcificadas de pacientes que fueron intervenidos por presentar una estenosis aórtica sintomática. Dichas válvulas se sometieron a un proceso de desmineralización y fueron filtradas y cultivadas según el método descrito por



Figura 1 A la izquierda, tubo de Roux negativo para el crecimiento de nanopartículas. En el tubo de la derecha se observa un precipitado en el fondo y, por tanto, el cultivo de nanopartículas es positivo.

Bratos-Pérez et al.¹⁹. Después de 6-8 semanas de incubación, la solución fue resuspendida con la ayuda de esferas estériles de vidrio y se realizó una reinoculación en un tubo de Roux con medio DMEN suplementado con suero fetal bovino sometido a irradiación gamma a 37°C, bajo una atmósfera de 5-10% de CO₂. En aquellos tubos positivos para el crecimiento de nanopartículas se observó un precipitado en el fondo (fig. 1). Se realizaron subcultivos sucesivos cada 8 semanas, en los que se observó un incremento de la velocidad de aparición del precipitado, así como de su cantidad. Posteriormente, el sedimento se preparó para la observación, mediante microscopio de transmisión electrónica se observaron partículas pleomórficas de tamaño muy pequeño (0,2-0,5 μm), mientras que mediante microscopio electrónico de barrido se observaron partículas esféricas agrupadas formando acúmulos en forma de racimo.

Probada la presencia de nanopartículas en aquellos subcultivos positivos, se preparó una dilución en 2 ml de suero fisiológico NaCl 0,9% (esta fue la dosis utilizada para la inoculación animal).

Animales

Un total de 24 conejos neozelandeses blancos (2,5-3,5 kg) siguieron dieta LabDiet enriquecida con colesterol 0,25%, y fueron mantenidos en jaulas individuales en un ciclo luz/oscuridad de 12 h. Se cumplieron las directrices formuladas por el Consejo Europeo para el tratamiento de animales de experimentación (directiva 2010/63/EU).

Se dividieron en 3 grupos: grupo A o control, al que se perfundió 100 ml de solución salina isotónica; el grupo B o tratado, al que al suero salino se añadió la dosis de 2 ml que contenía las NP para un total de 100 ml y el grupo C o terapéutico, en el que se procedió exactamente igual que en el grupo B, pero que recibió tratamiento postoperatorio con atorvastatina (2,5 mg/kg/24 h).

Procedimiento

Los animales fueron sedados mediante inyección intramuscular de una mezcla de quetamina (35 mg/kg), xilacina

(5 mg/kg) y acepromacina (1 mg/kg). No se administró antibiótico profiláctico para impedir las interferencias con la solución de NP. Con el animal en posición supina, después de su rasurado y preparación quirúrgica, se infiltró el cuello con anestésico local (mepivacaína, 10 mg/kg), realizando una incisión laterocervical derecha para la localización de los vasos cervicales. Se canuló la vena yugular con un Abocath de 20 G (BD Insyte, Becton Dickinson, Temse, Bélgica), se obtuvo una muestra de sangre (2 ml), y posteriormente se utilizó para perfundir la solución de suero isotónico correspondiente a cada grupo. Por otra parte, se disecó y se realizó un pinzamiento proximal y distal de la arteria carótida derecha del animal, bajo la administración de heparina sódica sistémica intravenosa (1,5 mg/kg). Posteriormente, se indujo un daño intimal mediante un balón de angioplastia coronario de 3,5 (NC Stormer OTW 3,5 × 14 mm; Medtronic, Minneápolis, EE. UU.) que se introdujo a través de una pequeña incisión en la parte anterior de la carótida común. El balón fue inflado 3 veces hasta su presión nominal, durante 30 s. Finalmente, la incisión arterial se suturó con un monofilamento de 8-0 (Prolene, Ethilon) con la ayuda de gafas de aumento, comprobando la permeabilidad final del vaso antes de cerrar la herida. El área de vaso dañada fue marcada mediante una pequeña sutura en la pared externa del vaso. Se retiró la cánula yugular y la vena fue ligada para realizar hemostasia. La carótida contralateral del animal no fue intervenida, y sirvió de esta manera de control no operado en cada animal.

Durante el procedimiento quirúrgico se perfundió una solución de suero salino (un total de 100 ml) a un ritmo de 2 ml/min aproximadamente. El suero fue limpio en los animales del grupo A (control), mientras que en los animales de los grupos B (tratado) y C (terapéutico) se añadieron los 2 ml de NaCl 0,9% que contenían la resuspensión de nanopartículas obtenida previamente.

Estudio histológico y bioquímico

Pasados 30 días, los animales volvieron a ser anestesiados. Se les extrajeron ambas carótidas, que fueron fijadas en formol y embebidas en parafina, preparándose para su análisis microscópico. Se obtuvo una nueva muestra sanguínea (2 ml) a partir de la vena yugular izquierda, y los animales fueron sacrificados mediante una dosis letal de pentobarbital (40-60 mg/kg). Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina, tinción de elastina de van Gieson y tinción de von Kossa, para detectar calcificaciones.

Las preparaciones histológicas fueron analizadas de manera ciega (sin conocer el grupo experimental al que pertenecían) mediante un sistema informático morfométrico (Nikon DS Camera Contol Unit DS-L2), que permite la medición de áreas mediante un lápiz óptico. Basándose en estas observaciones, se calculó el área de neoíntima, el área de la capa media, la ratio íntima/media (IMR) y la ratio de estrechamiento de la luz (ELR). Se examinaron 3 secciones de cada carótida y se tomó la media de las 3 mediciones para el análisis final (fig. 2).

En la muestra sanguínea se determinaron los niveles basales y finales de colesterol total, triglicéridos, glucosa e interleucina 6.

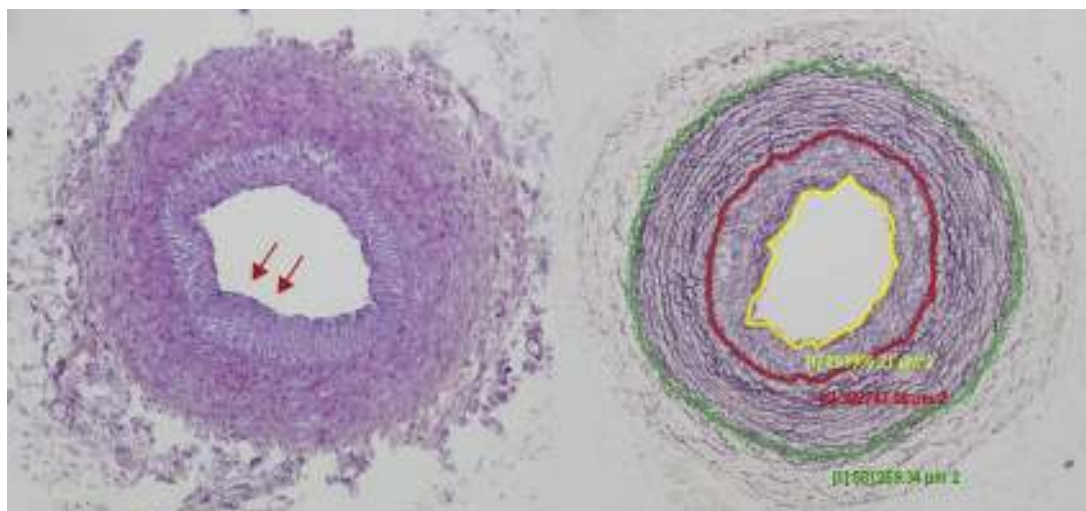


Figura 2 A la izquierda, ejemplo de hiperplasia intimal severa en un animal del grupo B con tinción H/E. A la derecha, medición de áreas mediante lápiz óptico (sistema informático morfométrico Nikon) sobre muestra de tinción van Giesen.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la versión 17.0 del programa SPSS (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados se expresaron mediante la media \pm la desviación estándar (DE). Para la comparación de variables categóricas se utilizó la prueba de Likelihood ratio o el test de Fisher. Para las variables continuas se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney, de Kruskal-Wallis o de Tukey y Dunnet. Una probabilidad menor de 5% ($p < 0,05$) fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

Durante el postoperatorio fallecieron 3 animales, uno de cada grupo de experimentación, por lo que la muestra final estuvo formada por 21 animales (7 de cada grupo).

No se observaron diferencias significativas entre los valores basales y finales de la muestra sanguínea, excepto en los niveles de interleucina 6, que sufrieron un incremento significativo (tabla 1).

La arteria no intervenida (control contralateral) de cada animal presentó una anatomía indemne, independientemente del grupo examinado. Sin embargo, la carótida

dañada de los conejos mostró diferentes grados de hiperplasia intimal, dependiendo del grupo animal al que perteneciese: desde una mínima pérdida de la histología normal observada en 4 de los animales del grupo A, hasta niveles de hiperplasia leves exhibidos por 5 de las muestras (2 procedentes del grupo A y 3 del grupo C), pasando por niveles de hiperplasia severa detectada en otros 5 animales (3 del grupo B y 2 del grupo C) (fig. 2). Un total de 7 carótidas se encontraron ocluidas (una del grupo A, 4 del grupo B y 2 del grupo C). De acuerdo con estos resultados, la hiperplasia se incrementó en los animales expuestos a NP y la respuesta intimal a dicha exposición se inhibió por el tratamiento postoperatorio con atorvastatina. Solo se hallaron calcificaciones en muestras procedentes del grupo B o C (expuestos a NP).

En cuanto al análisis morfométrico, se detectó un nivel significativamente mayor de hiperplasia intimal en las carótidas dañadas derechas en comparación con los controles contralaterales (tabla 2). La comparación entre los diferentes grupos de tratamiento confirmó un nivel significativamente mayor de formación neo-intimal en las carótidas pertenecientes al grupo B ($485.235,94 \pm 124.327,0 \mu\text{m}^2$) con respecto al grupo A ($87.341,08 \pm 124.271,0 \mu\text{m}^2$) ($p = 0,004$), y también con

Tabla 1 Estudio bioquímico

Parámetro	A	B	C	Total
Glucemia basal (mg/dl)*	196,71 \pm 29,3	196,00 \pm 19,8	196,29 \pm 17,7	169,33 \pm 21,7**
Glucemia final (mg/dl)*	195,43 \pm 7,8	197,86 \pm 25,2	203,86 \pm 13,8	201,06 \pm 15,9**
Triglicéridos basales (mg/dl)*	54,14 \pm 26,3	47,29 \pm 20,8	60,29 \pm 20,1	53,90 \pm 22,1***
Triglicéridos finales (mg/dl)*	55,83 \pm 16,2	42,83 \pm 12,9	60,67 \pm 11,1	54,86 \pm 17,7**
Colesterol basal (mg/dl)*	39,57 \pm 6,2	43,14 \pm 9,8	38,14 \pm 9,3	40,29 \pm 8,4**
Colesterol final (mg/dl)*	42,00 \pm 5,5	38,00 \pm 17,3	35,71 \pm 4,2	38,57 \pm 10,6**
IL-6 basal	<2	<2	<2	<2***
IL-6 final*	2,77 \pm 0,7	2,66 \pm 0,6	3,07 \pm 1,3	2,89 \pm 0,9***

* p (A, B, C) > 0,05; p (B vs. C) > 0,05; p (vs. A) > 0,05.

*** $p = 0,001$.

Tabla 2 Análisis morfométrico: comparación de parámetros entre las carótidas dañadas y no dañadas dentro cada grupo, y de los diferentes grupos entre sí

Grupo/parámetro	Hiperplasia intimal μm^2 (media \pm DE)	Área de capa media μm^2 (media \pm DE)	Íntima/media ratio (media \pm DE)	Ratio estrechamiento luz (media \pm DE)
Carótida dañada grupo A	87.341,08 \pm 124.271,0	233.556,16 \pm 92.854,3	0,382 \pm 0,59	0,281 \pm 0,33
Carótida no dañada grupo A	11.977,83 \pm 2972,7 ^a	229.120,34 \pm 80.778,5 ^d	0,058 \pm 0,02 ^g	0,035 \pm 0,01 ^j
Carótida dañada grupo B	485.235,94 \pm 124.327,0	269.322,08 \pm 44.324,5	1,814 \pm 0,41	0,926 \pm 0,10
Carótida no dañada grupo B	14.256,11 \pm 5763,0 ^b	241.418,38 \pm 74.706,7 ^e	0,060 \pm 0,02 ^h	0,039 \pm 0,02 ^k
Carótida dañada grupo C	241.536,60 \pm 18.228,0	307.000,33 \pm 82.760,0	0,895 \pm 0,79	0,605 \pm 0,36
Carótida no dañada grupo C	14.507,18 \pm 3016,1 ^c	271.389,00 \pm 38.853,9 ^f	0,055 \pm 0,02 ⁱ	0,045 \pm 0,02 ^l
Grupo A (placebo)	87.341,08 \pm 124271,0 ^{j,m}	233.556,16 \pm 92854,3 ⁿ	0,38 \pm 0,6 ^o	0,282 \pm 0,33 ^p
Grupo B (tratado)	485.235,94 \pm 124.327,0 ^m	269.322,08 \pm 44314,5 ⁿ	1,81 \pm 0,4 ^o	0,926 \pm 0,10 ^p
Grupo C (terapéutico)	241.536,60 \pm 181.185,0 ^m	307.000,33 \pm 82760,0 ⁿ	0,89 \pm 0,8 ^o	0,605 \pm 0,36 ^p

^a p=0,006^b p=0,002^c p=0,002^d p=0,729^e p=0,082^f p=0,565^g p=0,006^h p=0,002ⁱ p=0,002^j p=0,002^k p=0,002^l p=0,002.^m B vs. A; p=0,004; B vs. C; p=0,035; C vs. A; p=0,025.ⁿ B vs. A; B vs. C y C vs. A; p>0,05.^o B vs. A; p=0,004; B vs. C; p=0,035; C vs. A p>0,05.^p B vs. A; p=0,011; B vs. C y C vs. A; p>0,05.

respecto al grupo C (241.536.60 \pm 181.185.0 μm^2) (p=0,035). Además, el grupo C mostró una hiperplasia significativamente mayor que la del grupo A (p=0,025).

No existieron diferencias significativas con respecto a la capa media entre las carótidas dañadas y su control no quirúrgico, ni tampoco existió diferencia en esta capa comparando los diferentes grupos de carótidas dañadas (A, B, C). Por tanto, la IMR fue significativamente mayor en las carótidas dañadas con respecto a los controles, y se detectó un incremento de IMR en el grupo B (1,814 \pm 0,41) con respecto al grupo A (0,382 \pm 0,59; p=0,004) y también al grupo C (0,895 \pm 0,79; p=0,035). Las diferencias entre los grupos C y A no fueron significativas (p=0,064). En cuanto al ELR, se detectaron diferencias significativas entre las carótidas dañadas y las carótidas control de todos los grupos (p=0,002). Y, dado que la mayor respuesta hiperplásica intimal se mostró en el grupo B, el ELR fue significativamente mayor en el grupo B (0,926; IC 95% 0,837-1,014), que en el grupo A (0,282 \pm 0,327; p=0,011). No se observaron diferencias significativas entre los grupos B/C ni los grupos C/A (tabla 2).

Las tinciones von Kossa positivas para fosfato cálcico se identificaron en 6 animales, todos ellos tratados previamente con NP: 4 en el grupo B (57%) y 2 en el grupo C (28,5%) (fig. 3). Las diferencias entre grupos (A, B, C) fueron significativas (likelihood ratio, p=0,027).

Discusión

Los resultados del presente estudio señalan una relación entre las NP calcificantes administradas en forma de perfusión intravenosa y la aparición de calcificaciones arteriales, así como a un efecto potenciador por parte de las NP de la hiperplasia intimal iniciada por la denudación mecánica del endotelio. De hecho, aquellas arterias no tratadas mediante daño intimal permanecieron con su anatomía intacta.

Las NP se han relacionado con numerosas enfermedades humanas, en especial aquellas que derivan en la aparición de depósitos cálcicos ectópicos. Los primeros estudios experimentales publicados las relacionaron con el desarrollo de cálculos renales, pero la administración se realizaba

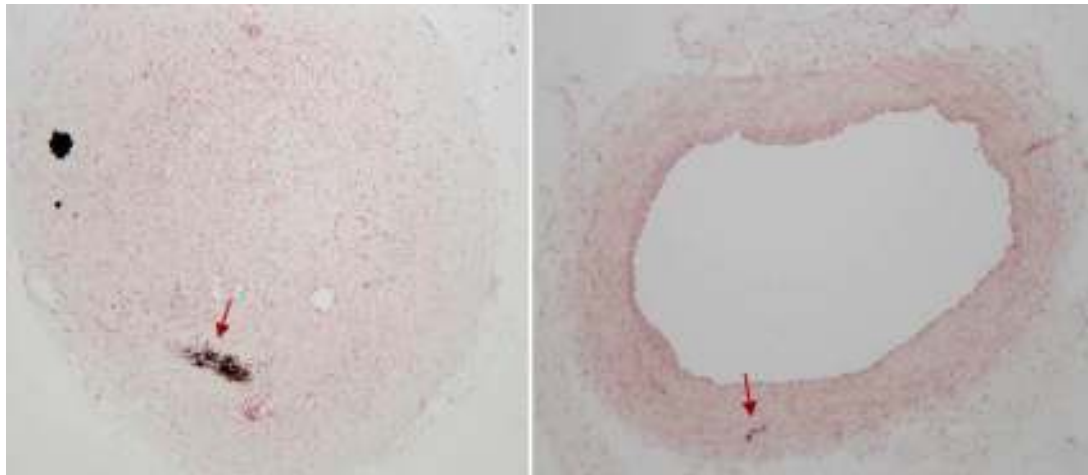


Figura 3 Dos ejemplos de tinciones von Kossa positivas para fosfato cálcico. A la izquierda un animal del grupo B; a la derecha, uno del grupo C.

intraórgano^{15,23}. La administración sistémica se asemeja más a las condiciones reales del organismo, en las que las NP navegan por el torrente sanguíneo y tienen la oportunidad de desencadenar una respuesta inmune en el individuo. Esto puede explicar en parte la variabilidad en cuanto a la presentación de calcificaciones en los distintos animales expuestos²². También puede ser debida a la técnica de preparación de la solución inoculada, ya que nuestro método no tiene en cuenta el número de NP presentes en cada tubo, únicamente su positividad.

Un estudio preliminar realizado por Schwartz et al.²² en conejos obtuvo una exacerbación de la neoplasia intimal y la aparición de calcificaciones arteriales, pero sus preparaciones no estuvieron valoradas de forma ciega y la interpretación de las muestras histológicas fue únicamente subjetiva. El presente estudio aporta un mayor tamaño muestral, la interpretación ciega de las muestras histológicas y el análisis morfométrico de los resultados. Además, añade un estudio bioquímico que demuestra la homogeneidad en cuanto a los niveles de colesterol sanguíneo, ya que su elevación es causa por sí misma de hiperplasia. Por otra parte, la inclusión del grupo placebo (grupo A) evita la presencia de resultados falsamente positivos, e incrementa la objetividad del presente trabajo.

Como resultado del diseño cuidadoso del estudio, el único factor determinante que puede explicar las diferencias en el desarrollo de una mayor tendencia a la hiperplasia intimal fue la inoculación de NP, dado que los niveles de colesterol fueron similares en todos los grupos. Asimismo, la atorvastatina parece proteger de dicho efecto, pero no por su actividad hipolipidemiante sino por el efecto pleotrópico antiinflamatorio²⁴.

La presencia de calcificaciones arteriales se detectó en 6 animales, todos ellos previamente expuestos a NP. El tratamiento postoperatorio con atorvastatina redujo su aparición. Existe controversia sobre el efecto de las estatinas sobre la calcificación vascular: algunos estudios señalan que las previenen; otras investigaciones dicen lo contrario²⁵⁻²⁸. Nuestros hallazgos abogan por un efecto protector. El mecanismo de acción podría estar mediado por la inhibición

de la HMG-CoA reductasa, el incremento de la producción de óxido nítrico, la prevención de la adhesión leucocitaria o la disminución de los niveles de osteopontina y osteoprotegerina^{25,26}. No obstante, son necesarias investigaciones complementarias para aclarar este tema.

Debido al metabolismo lento que presentan las NP, la realización de inoculaciones múltiples o el establecimiento de un mayor periodo de latencia desde la administración intravenosa y el sacrificio de los animales podría haber aumentado el número de casos que presentaron calcificaciones arteriales²⁴. Aunque la calcificación puede considerarse un proceso multifactorial, relacionado íntimamente con la inflamación en el contexto de la aterosclerosis, la inflamación *per se* no justifica su aparición. Nuestro estudio señala la contribución de un factor biológico determinante, las NP¹⁹. Gracias a la capacidad para precipitar cristales de apatita en condiciones fisiológicas, pueden ser el detonador del proceso de calcificación, e indirectamente potenciar los mecanismos proinflamatorios^{6,11,29}. Dada su capacidad para infectar células fagocitarias y de ejercer efecto citotóxico en fibroblastos^{30,31}, las NP son las candidatas idóneas, ya que son ubicuas en el humano, tanto en sangre como en otros tejidos (paredes aneurismáticas, placas carotídeas, cálculos renales...)¹⁴. Sin embargo, la relación definitiva causa-efecto debe ser totalmente confirmada en el terreno experimental.

Este estudio experimental tiene varias limitaciones. No se controlaron las diferencias en la calidad de los cultivos ni el número de colonias viables NP en cada matraz: esto puede haber contribuido a la variabilidad en las respuestas entre animales. El método de cultivo de las NP, incluyendo varios lavados y cultivos sucesivos con el objetivo de tratar de asegurar la completa eliminación de cualquier suero bovino contaminante, así como la ausencia de cualquier antígeno extraño, no excluye la absoluta eliminación de estos potenciales componentes. La acción de NP en ausencia de colesterol en la dieta sigue siendo desconocido y la dosis óptima y la duración del tratamiento con atorvastatina deben ser aclarados. Finalmente, debe tenerse en cuenta que las conclusiones derivadas de un modelo animal de

aterosclerosis pueden no ser idénticas a lo que ocurre en los seres humanos; por lo tanto, cualquier extrapolación debe ser confirmada por estudios clínicos.

En conclusión, esta investigación confirma y cuantifica la capacidad de las NP para acelerar la hiperplasia y estimular la calcificación en zonas intimales de arterias lesionadas³². Esta administración sistémica de NP es inofensiva en las arterias sanas. Como la capa media, independientemente del tratamiento aplicado, no cambió entre los diferentes grupos, estos datos indican que el modelo de lesión arterial no alteró esta estructura histológica. La atorvastatina demostró la capacidad de ralentizar el proceso de progresión de la aterosclerosis, probablemente basada en su actividad pleiotrópica para disminuir la inflamación, dado que los niveles plasmáticos de colesterol se mantuvieron estables durante todo el estudio.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1161–70.
2. Demer L, Tintut Y. Vascular calcification pathology of a multifaceted disease. *Circulation.* 2008;117:2938–48.
3. Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, et al. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H1115–24.
4. Kutikhin AG, Brusina EB, Yuzhalin AE. The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:339–50.
5. Wallin R, Wajih N, Greenwood T, Sane D. Arterial calcification: A review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev.* 2001;21:274–301.
6. New S, Aikawa E. Cardiovascular calcification an inflammatory disease. *Circ J.* 2011;75:1305–13.
7. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification. *Circ Res.* 2006;99:1044–59.
8. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification. *Circulation.* 2008;117:2938–48.
9. Valdivielso J. Calcificación vascular: tipos y mecanismos. *Nefrología.* 2011;31:142–7.
10. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Prat R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Intl.* 2008;74:148–57.
11. Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: The calcification paradox. *Trends Mol Med.* 2009;15:405–16.
12. Kajander EO, Kuronen I, Akerman KK, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood: The smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc. SPIE* 3111. 1997:420.
13. Kajander E. Culture and detection method for sterile-filterable autonomously replicating biological particles. US patent. 1992;5135(851):1-16.
14. Ciftcioglu N, Björklund B, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int.* 1999;56:1893–8.
15. Shiekh F, Khullar M, Singh S. Lithogenesis: Induction of renal calcifications by nanobacteria. *Urol Res.* 2006;34:53–7.
16. Tsurumoto T, Matsumoto T, Yonekura A, Shindo H. Nanobacteria-like particles in human arthritic synovial fluids. *J Proteome Res.* 2006;5:1276–8.
17. Turgut D. Is there any relation of nanobacteria with periodontal diseases? *Medical Hypotheses.* 2008;70:36–9.
18. Puskás LG, Tiszlavicz L, Rázga Z, Torday LL, Krenács T, Papp JG. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. *Acta Biol Hung.* 2005;56:233–45.
19. Bratos-Perez MA, Sanchez PL, Garcia de Cruz S, Villacorta E, Palacios IF, Fernández-Fernández JM, et al. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. *Eur Heart J.* 2008;29:371–6.
20. Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *PNAS.* 1998;95:8274–9.
21. Kajander EO. Nanobacteria-propagating calcifying nanoparticles. *Lett Appl Microbiol.* 2006;42:549–52.
22. Schwartz MA, Lieske JC, Kumar V, Farrell-Baril G, Miller V. Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries: Proof of principle. *Int J Nanomedicine.* 2008;3:243–8.
23. Wang L, Shen W, Wen J, An X, Cao L, Wang B. An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria. *Dig Dis Sci.* 2006;51:1126–32.
24. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, et al. Infection with chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation.* 1998;97:633–6.
25. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Moumtzougou A, Kapelouzou A, Sailer N, Fotiadis G, et al. Intensive lipid-lowering therapy ameliorates novel calcification markers and GSM score in patients with carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;35:661–8.
26. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Kapelouzou A, Moumtzougou A, Avgerinos ED, Kakisis JD, et al. Beneficial changes of serum calcification markers and contralateral carotid plaques echogenicity after combined carotid artery stenting plus intensive lipid-lowering therapy in patients with bilateral carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39:258–65.
27. Liebe V, Brueckmann M, Borggrete M, Kaden JJ. Statin therapy of calcific aortic stenosis: Hype or hope? *Eur Heart J.* 2006;27:773–8.
28. Gilmanov D, Bevilacqua S, Mazzone A, Glauber M. Do statins slow the process of calcification of aortic tissue valves? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010;11:297–301.
29. Cisar JO, Xu D-Q, Thompson J, Swaim W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *PNAS.* 2000;97:11511–5.
30. Ciftcioglu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology.* 1998;4:259–70.

31. Ciftcioglu N, McKay DS, Mathew G, Kajander O. Nanobacteria: Fact or fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Invesig Med.* 2006;54:385-94.
32. Cenizo N, González-Fajardo JA, Bratos MA, Álvarez-Gago T, Aguirre B, Vaquero C. Role of calcifying nanoparticle in the development of hyperplasia and vascular calcification in an animal model. *Eur J Vasc Endovarc Surg.* 2014;47:640-6.