



**RELEVANCIA CLÍNICA Y BÁSICA DE LA SOBRECARGA DE FÓSFORO SOBRE LOS  
RECEPTORES RENALES DE FGF23 Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL  
CRÓNICA.**

CLINICAL AND BASIC RELEVANCE OF THE PHOSPHATE OVERLOAD ON FGF23 RENAL  
RECEPTORS AND CHRONIC KIDNEY DISEASE PROGRESSION.

Autor: María de la Victoria Pendón Ruiz de Mier

Director y Tutor: J. Mariano Rodríguez Portillo

Co-director: Juan Rafael Muñoz Castañeda

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA

Fecha de depósito: 13 Noviembre 2019, Córdoba

TITULO: *Relevancia clínica y básica de la sobrecarga de fósforo sobre los receptores renales de FGF23 y la progresión de la enfermedad renal crónica*

AUTOR: *María de la Victoria Pendón Ruiz de Mier*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---





Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología  
Universidad de Córdoba

**RELEVANCIA CLÍNICA Y BÁSICA DE LA SOBRECARGA DE FÓSFORO SOBRE LOS  
RECEPTORES RENALES DE FGF23 Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL  
CRÓNICA.**

Tesis Doctoral propuesta por María de la Victoria Pendón Ruiz de Mier, licenciada en Medicina y especialista en Nefrología, para optar al grado de Doctor.

**Directores**

**Dr. J. Mariano Rodríguez Portillo**

Catedrático de Medicina

Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología

Universidad de Córdoba

**Dr. Juan Rafael Muñoz Castañeda**

Unidad de Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba

Universidad de Córdoba





**TÍTULO DE LA TESIS:** RELEVANCIA CLÍNICA Y BÁSICA DE LA SOBRECARGA DE FÓSFORO SOBRE LOS RECEPTORES RENALES DE FGF23 Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

**DOCTORANDA:** MARÍA DE LA VICTORIA PENDÓN RUIZ DE MIER

#### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda María de la Victoria Pendón Ruiz de Mier, se incorporó al grupo de investigación de Nefrología en 2015 (Metabolismo del Calcio y Calcificación Vascular en IMIBIC). Aunque es una investigadora con formación eminentemente clínica, desde su incorporación al grupo ha venido participando activamente en un gran número de actividades del grupo, mostrando gran resolución tanto en las tareas de laboratorio, el desarrollo de los ensayos clínicos y la consecución de los proyectos en los que ha participado. Ha sido subinvestigadora en ensayos clínicos independientes con fondos públicos gubernamentales relacionados tanto con el desarrollo de esta tesis como con la temática del grupo de investigación. Ha colaborado en otros ensayos clínicos patrocinados por empresas farmacéuticas relacionados con enfermedades cardiovasculares, calcificación vascular y anemia durante la enfermedad renal crónica. Además de su actividad clínica asistencial, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. Fruto de su vinculación al grupo y de su trabajo ha publicado 13 artículos, tanto en investigación clínica como básica. En 6 de ellos, la doctoranda figura como primer autor y/o autor de correspondencia y, en concreto, 3 artículos están relacionados directamente con la temática de su tesis doctoral.

El desarrollo de este trabajo de investigación ha permitido avanzar en el conocimiento de la influencia de la sobrecarga de fósforo sobre la regulación de los receptores renales de FGF23 así como a proponer al ratio P/Cr como biomarcador de progresión del daño renal y al ratio P/U como

indicador de la ingesta de fósforo. Ambos biomarcadores nos permitirán por un lado ponderar la progresión de la enfermedad renal crónica y por otro establecer guías de asesoramiento dietético para los pacientes con enfermedad renal crónica. De esta manera podremos empezar a controlar la carga de fósforo en el paciente urémico así como conocer con antelación si la enfermedad renal del paciente va a progresar o no más rápido. Los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados o están sometidos en revistas internacionales de relevancia científica (FASEB J 2017, Sci Rep 2018). La tesis doctoral presentada se enmarca dentro de diversos proyectos de investigación financiados por un Proyecto de Excelencia Europeo (FP7-241544 - SysKID) y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI14/00638). La doctoranda está actualmente adscrita a la Unidad de Gestión Clínica de Nefrología del Hospital Universitario Reina Sofía con un contrato RÍO Hortega fomentando con ello la traslación clínico-básica de la investigación realizada. Además, ha colaborado en el desarrollo de actividades docentes tales como trabajos de fin de grado en la facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba, impartiendo clases en el módulo de bases celulares y moleculares de las enfermedades renales del Máster de Investigación Biomédica Traslacional en la facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba así como elaborando material para cursos de formación continuada organizados por la Sociedad Española de Nefrología y revistas de formación especializadas. Es miembro de las Sociedades Andaluza y Española de Nefrología en las que ha participado como asistente y ponente de comunicaciones en repetidas ocasiones.

La presente Tesis Doctoral, llevada a cabo bajo nuestra dirección, se ha desarrollado durante el período comprendido entre el 2015 y 2019 y está encuadrada en el programa de Doctorado en Biomedicina de la Universidad de Córdoba.

A continuación, se detalla la producción científica derivada del programa de doctorado de la doctoranda:

#### **Publicaciones científicas indexadas:**

1. Rodelo-Haad C, Aguera ML, Martínez Vaquera S, Pendón-Ruiz de Mier MV, Salmerón-Rodríguez MD, Esquivias E, Navarro MD, Rodríguez-Benot A, Aljama P. Tyrosine-phosphatase and glutamate-decarboxylase antibodies after simultaneous pancreas kidney transplantation: Do they have an impact on pancreas graft survival? *Transplant Proc.* 2015; 47 (1): 107-111.
2. Pendón-Ruiz de Mier MV, Navarro-Cabello MD, Martínez-Vaquera S, Lopez-Andreu M, Aguera Morales ML, Rodríguez-Benot A, Ruiz Rabelo J, Campos Hernández JP, Requena Tapia MJ, Aljama García P. Index high insulin resistance in pancreas-kidney transplantation contributes to poor long-term survival of the pancreas graft. *Transplant Proc.* 2015; 47 (1): 117-119.

3. García-Rubio JH, Carrasco Valiente J, Campos Hernández JP, Ruiz García J, Márquez López J, Regueiro López JC, Cano Castiñeira R, Pendón-Ruiz de Mier MV, Requena Tapia MJ. Graft survival in patients with polycystic kidney disease with nephrectomy of native kidney pretransplant. *Transplant Proc.* 2015; 47: 2615-2617.
4. Pendón-Ruiz de Mier MV, Navarro-Cabello MD, Martínez-Vaquera S, Lopez-Andreu M, Aguera Morales ML, Rodríguez-Benot A, Aljama García P. Incidence and long-term prognosis of cancer after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2015; 47: 2618-2621.
5. Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Pendón-Ruiz de Mier MV, Rodríguez-Ortiz ME, Díaz-Tocados JM, Vergara N, Martínez-Moreno JM, Salmerón MD, Richards WG, Felsenfeld A, Kuro-O M, Almadén Y, Rodríguez M. Differential Regulation of Renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. *FASEB J.* 2017; 31 (9): 3858-3867.
6. Díaz-Tocados JM, Peralta-Ramirez A, Rodríguez-Ortiz ME, Raya AI, Lopez I, Pineda C, Herencia C, Montes de Oca A, Vergara N, Stepan S, Pendón-Ruiz de Mier MV, Buendía P, Carmona A, Carracedo J, Alcalá-Díaz JF, Frazao J, Martínez-Moreno JM, Canalejo A, Felsenfeld A, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, Almadén Y, Muñoz-Castañeda JR. Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* 2017; 92 (5): 1084-1099.
7. Muñoz-Castañeda JR, Pendón-Ruiz de Mier MV, Rodríguez M, Rodríguez-Ortiz ME. Magnesium replacement to protect cardiovascular and kidney damage? Lack of prospective clinical trials. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 664-683.
8. Pendón-Ruiz de Mier MV, Aguera ML, Navarro MD, Rodríguez-Benot A, Aljama P. Prevalence and survival of cancer after pancreas-kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2018; 50: 669-672.
9. Rodelo-Haad C, Rodríguez-Ortiz ME, Martín-Malo A, Pendón-Ruiz de Mier MV, Aguera ML, Muñoz-Castañeda JR, Soriano S, Caravaca F, Alvarez-Lara MA, Felsenfeld A, Aljama P, Rodríguez M. Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients. *PLoS One* 2018; 13 (8): e0201537.
10. Santamaría R, Díaz-Tocados JM, Pendón-Ruiz de Mier MV, Robles A, Salmerón-Rodríguez MD, Ruiz E, Vergara N, Aguilera-Tejero E, Raya A, Ortega R, Felsenfeld A, Muñoz-Castañeda JR, Martín-Malo A, Aljama P, Rodríguez M. Increased phosphaturia accelerates the decline in renal function: a search for mechanisms. *Sci Rep.* 2018; 8: 13701-13714.
11. Rodríguez-Ortiz ME, Pendón-Ruiz de Mier MV, Rodríguez M. Parathyroidectomy in dialysis patients: indications, methods, and consequences. *Semin Dial.* 2019; 32:444-451.
12. Díaz-Tocados JM, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Pineda C, Martínez-Moreno JM, Herencia C, Vergara N, Pendón-Ruiz de Mier MV, Santamaría R, Rodelo-Haad C, Casado-Díaz A, Lorenzo V, Carvalho C, Frazao JM, Felsenfeld AJ, Richards WG, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M, López I, Muñoz-Castañeda JR. Calcimimetics maintain bone turnover in uremic rats despite the concomitant decrease in parathyroid hormone concentration. *Kidney Int.* 2019; 95 (5): 1064-1078.
13. Rodelo-Haad C, Santamaría R, Muñoz-Castañeda JR, Pendón-Ruiz de Mier MV, Martín-Malo A, Rodríguez M. FGF23, biomarker or target? *Toxins* 2019; 11 (3): 175-195.

### **Capítulos de Libros:**



1. Salmerón Rodríguez MD, Pendón-Ruiz de Mier MV, Esquivias de Motta E, González Burdiel L. Caso clínico 12. Hipotrigliceridemia en paciente en diálisis peritoneal relacionada con consumo de melatonina. En: Casos clínicos. Jornadas Andaluzas de Diálisis Peritoneal. 1ª Edición. Antequera (Málaga), Poveda García MI, 2016. Pag 74-80. ISBN: 978-84-608-5746-4.
2. Pendón-Ruiz de Mier MV. Caso clínico 7. Oxihidróxido sucroférico: una alternativa eficaz en el tratamiento de la hiperfosfatemia en paciente joven con elevado riesgo cardiovascular. En: Monografía de casos clínicos con oxihidróxido sucroférico. Madrid. Bajo Rubio MA, García Erauzkin G, Martín Malo A. Saned, 2018. Pag 19-20. ISBN:978-84-16831-95-1.
3. Santamaría R, Pendón-Ruiz de Mier MV, Rodelo-Haad C. Capítulo 5. Patologías por déficit de FGF23 Calcinosis tumoral familiar hiperfosfatémica. En: Patologías asociadas a alteraciones de la regulación de FGF23. Rodríguez Portillo M, Torregrosa V. Kyowa kirin, 2019. Pag 71-89.

### **Colaboración en revistas de formación continuada especializada:**

1. García-Montemayor V, Pendón-Ruiz de Mier MV, Moyano Peregrín C, Ojeda López R, Martín Malo A. Enfermedades renales. Concepto, clasificación, etiopatogenia, síndromes renales y estrategia diagnóstica. *Medicine* 2019;12(79):4651-61
2. Moyano Peregrín C, Ojeda López R, García-Montemayor V, Pendón-Ruiz de Mier MV, Soriano Cabrera S. Insuficiencia renal aguda. *Medicine* 2019;12(79):4662-71
3. Ojeda López R, Moyano Peregrín C, Pendón-Ruiz de Mier MV, García-Montemayor V, Martín Malo A. Insuficiencia renal aguda (II). Tratamiento. Terapia renal sustitutiva. Situaciones especiales. Ancianos. Insuficiencia cardiaca. Cirrosis. *Medicine* 2019;12(79):4672-82
4. Pendón-Ruiz de Mier MV, García-Montemayor V, Ojeda López R, Moyano Peregrín C, Soriano Cabrera S. Insuficiencia renal crónica. *Medicine*. 2019;12(79):4683-92.
5. Ojeda López R, Pendón-Ruiz de Mier MV, García-Montemayor V, Martín Malo A. Protocolo diagnóstico de la insuficiencia renal aguda en el paciente hospitalizado. Factores predisponentes y precipitantes. *Medicine* 2019;12(79):4693-6
6. Pendón-Ruiz de Mier MV, García-Montemayor V, Moyano Peregrín C, Soriano Cabrera S. Protocolo diagnóstico de la insuficiencia renal crónica. *Medicine* 2019;12(79):4702-4
7. Moyano Peregrín C, Ojeda López R, Pendón-Ruiz de Mier MV, Soriano Cabrera S. Protocolo de tratamiento nutricional del paciente con insuficiencia renal. *Medicine* 2019;12(79):4705-9
8. Ojeda López R, Moyano Peregrín C, Pendón-Ruiz de Mier MV, García-Montemayor V. Insuficiencia renal aguda en un paciente con disfunción cardiaca severa. Opciones terapéuticas del nefrólogo en un paciente con síndrome cardiorrenal tipo 1. *Medicine* 2019;12(79):4710

### **Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:**

XLVI Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Octubre 2016. Comunicación póster (3).

18th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Septiembre 2017.

Comunicación oral (1).

XLVII Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Octubre 2017. Comunicación poster (2).

28th European meeting on hypertension and cardiovascular protection. Junio 2018. Comunicación oral (1) y Comunicación póster (1).

XLVIII Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Noviembre 2018. Comunicación oral (1), Comunicación e-póster (1) y Comunicación póster (3).

56th ERA-EDTA Congress. European Renal Association-European Dialysis and Transplantation Association Congress. Junio 2019. Comunicación póster (1).

XLIX Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Octubre 2019. Comunicación póster (1).

ASN Kidney Week 2019. American Society of Nephrology (ASN). Noviembre 2019. Aceptadas Comunicación póster (2).

### **Comunicaciones a Congresos Regionales:**

7th IMIBIC Young Investigators Meeting. Mayo 2016. Comunicación Oral (1).

XLIV Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología. Junio 2016. Comunicación oral (2) y Comunicación póster (1).

XLV Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología. Abril 2017. Comunicación oral (2).

8th IMIBIC Young Investigators Meeting. Mayo 2017. Comunicación Oral (1).

X Congreso De La Sociedad Andaluza De Trasplante de Órganos y Tejidos. Junio 2017. Comunicación póster (1).

XLVI Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología. Abril 2018. Comunicación oral (5).

### **Premios:**

XLIV Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología (Málaga, Junio 2016). Premio a la mejor comunicación póster.

VIII Lección Conmemorativa Maimónides y premios IMIBIC 2018 (Córdoba, Diciembre 2018). Premio ENRIQUE AGUILAR BENÍTEZ DE LUGO a la publicación científica más relevante: Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* 2017; S0085-2538 (17): 30298- 30303.

### **Apoyo en Actividades Docentes:**

Docente Curso Online Controversias en la Enfermedad Renal Crónica organizado por la Sociedad Española de Nefrología. 2017-2018.

Docente Curso Online Onconeurología organizado por la Sociedad Española de Nefrología. 2019-2020.

Colaborador docente en Trabajo de Fin de Grado Estudiante de Medicina (2019).

Docente en la asignatura “Bases Celulares y Moleculares de las Enfermedades Renales” dentro del máster “Investigación Biomédica Traslacional”, 2019.

Tutor clínico para la formación de alumnos de Grado de Medicina, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, 2019.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 22 de Octubre de 2019

Firma del/de los director/es



Fdo.: M. Rodríguez Portillo



Fdo.: JR. Muñoz Castañeda



**D. JUAN MARIANO RODRIGUEZ PORTILLO**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y OTORRINO-LARINGOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA E INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN “METABOLISMO DEL CALCIO Y CALCIFICACIÓN VASCULAR” DEL INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA.

INFORMA:

Que Dña. **María de la Victoria Pendón Ruiz de Mier** ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología de la Universidad de Córdoba, el Hospital Universitario Reina Sofía y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado:

**“RELEVANCIA CLÍNICA Y BÁSICA DE LA SOBRECARGA DE FÓSFORO SOBRE LOS RECEPTORES RENALES DE FGF23 Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito nacional e internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a veintidós de Octubre de dos mil diecinueve.

Fdo: Prof. J. Mariano Rodríguez Portillo.



**D. JUAN RAFAEL MUÑOZ CASTAÑEDA**, DOCTOR EN BIOQUÍMICA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, INVESTIGADOR SENIOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN “METABOLISMO DEL CALCIO Y CALCIFICACIÓN VASCULAR” DEL INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA, ADSCRITO A LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA DE CÓRDOBA DENTRO DEL PROGRAMA NICOLÁS MONARDES DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA.

INFORMA:

Que **Dña. María de la Victoria Pendón Ruiz de Mier** ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología de la Universidad de Córdoba, el Hospital Universitario Reina Sofía y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado:

**“RELEVANCIA CLÍNICA Y BÁSICA DE LA SOBRECARGA DE FÓSFORO SOBRE LOS RECEPTORES RENALES DE FGF23 Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito nacional e internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral

Córdoba, a veintidós de Octubre de dos mil diecinueve.

Fdo: Dr. Juan R. Muñoz Castañeda





## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible el desarrollo de esta tesis doctoral. Durante estos años, muchas personas han sido partícipes de este proyecto, tanto en el ámbito profesional como personal. Gracias a todos.

En concreto, me gustaría agradecer enormemente el apoyo de mis directores, el Dr. J. Mariano Rodríguez Portillo y el Dr. Juan R. Muñoz Castañeda, sin los cuales no habría sido posible realizar este trabajo de investigación. Gracias por la orientación y el asesoramiento recibidos.

Quisiera agradecer a todo el grupo de Investigación del IMIBIC su ayuda incondicional; en especial, a la Dra. Carmen Herencia Bellido y al Dr. Juan Miguel Díaz Tocados, quienes me han guiado muy de cerca en este proyecto.

Toda mi gratitud al servicio de Nefrología del Hospital Universitario Reina Sofía, dirigido por la Dra. Sagrario Soriano, donde realicé mi formación como especialista y comencé mi camino en el ámbito de la investigación. Os estaré eternamente agradecida.

Y por último, mi agradecimiento más especial a mi familia ya que es un pilar fundamental en mi vida.





*A mis padres J. Gabriel y M<sup>a</sup> Victoria,  
A mi hermano J. Gabriel,  
Y a ti, Ramón.*



Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

- **Systems Biology towards Novel Chronic Kidney Disease Diagnosis and Treatment.**

Proyecto de Excelencia Europeo (FP7-241544 - SysKID).

- **Influencia de la excreción urinaria de fósforo sobre la progresión del daño renal.**

**Mecanismos y estudios clínicos.** Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI14/00638).



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia

**Alb:** Albúmina

**ANOVA:** Análisis de varianza

**APC:** *Adenomatous Polyposis Coli*

**ARA II:** Antagonistas de los receptores de angiotensina II

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**BSA:** *Bovine Serum Albumin* (Albúmina sérica bovina)

**Ca/Ca<sup>2+</sup>:** Calcio sérico/calcio iónico

**cFGF23:** *c-terminal Fibroblast Growth Factor-23* (Factor de crecimiento fibroblástico 23 c-terminal)

**CK-Iα:** Caseína quinasa-Iα

**CMFDA:** 5-clorometilfluoresceína diacetato

**Cr:** Creatinina

**CTR:** Calcitriol

**DAPI:** 4'6' diamidino 2 fenilindol

**DHRH:** Dihidrorodamina

**Dkk1:** *Dickkopf*

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**dNTP:** Desoxirribonucleósidos-trifosfato

**Dsh:** *Dishevelled*

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EFSA:** *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

**EGTA:** Etilen glicol-bis

**ELISA:** *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**Enf:** Enfermedad

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**ERK1/2:** Quinasas 1 y 2

**ES:** Error estándar

**FBS:** *Fetal Bovine Serum* (Suero fetal bovino)

**FeP:** Fracción de excreción de fósforo

**FG:** Filtrado glomerular

**FGe:** Filtrado glomerular estimado

**FGF23:** *Fibroblast Growth Factor-23* (Factor de crecimiento fibroblástico 23)

**FGFR:** Receptores de Factor de crecimiento fibroblástico

**Fzd:** *Frizzled*

**GADPH:** Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GPx:** Glutathion peroxidasa

**GSK-3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$

**H2DCFDA:** 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

**HbA1c:** Hemoglobina glicosilada

**HDL:** *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidad)

**HEK-293:** Células embrionarias de riñón humano 293

**HEPES:** Hidroxietil piperizina-etano-sulfonato

**HP:** *High Phosphate* (Alto en fósforo)

**HRP:** Peroxidasa de rábano picante

**ICC:** Insuficiencia cardíaca congestiva

**IECA:** Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

**iFGF23:** *intact Fibroblast Growth Factor-23* (Factor de crecimiento fibroblástico 23 intacto)

**IGF-1:** *Insulin-like Growth Factor-1*

**IMC:** Índice de masa corporal

**IMIBIC:** Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba

**KDIGO:** *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

**LDL:** *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baja densidad)

**LP:** *Low Phosphate* (Bajo en fósforo)

**Lrp:** *Lipoprotein Related Protein* (Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína)

**Na:** Sodio

**NaCl:** Cloruro sódico

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**Na-Pi:** Co-transportadores de sodio-fósforo

**NF- $\kappa\beta$ :** Factor nuclear  $\kappa\beta$

**NHERF-1:** *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulatory coFactor-1*

**Nx:** Nefrectomía

**OR:** Odds ratio

**P:** Fósforo

**PA:** Presión arterial

**PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida

**PAS:** *Periodic Acid Staining* (Tinción de ácido periódico)

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline* (Solución salina tamponada de fosfato)

**PCNA:** Antígeno nuclear de células en proliferación

**PCR:** Proteína C reactiva

**PIC:** *Proteasas Inhibitor Cocktail* (Cóctel de inhibidor de proteasas)

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**Prog:** Progresores

**PTH:** Hormona paratiroidea

**Ratio Alb/Cr:** Ratio albúmina/creatinina

**Ratio P/Cr:** Ratio fósforo/creatinina

**Ratio P/U:** Ratio fósforo/urea

**Ratio Prot/Cr:** Ratio proteína/creatinina

**rFGF23:** *recombinant Fibroblast Growth Factor-23* (Factor de crecimiento fibroblástico 23 recombinante)

**ROS:** *Reactive Oxygen Species* (Especies reactivas de oxígeno)

**RT-PCR:** *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (Retrotranscripción- Reacción en cadena de la polimerasa)

**SAOS:** Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**sFRP:** *Secreted Frizzled Related Protein*

**SGK1:** *Serum/Glucocorticoid-regulated Kinase-1*

**sKlotho:** Klotho soluble

**TAE:** Tris base, Ácido acético y EDTA

**TCF/LEF:** *T Cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor-1*

**TG:** Triglicéridos

**Tm:** Temperatura de fusión o de melting

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**Tris:** Tris hidroximetil amino metano

**TTBS:** *Tween Tris Buffered Saline* (Tris tampón salino con Tween-20)

**U:** Urea

**VDR:** Receptor de vitamina D

**VSMC:** *Vascular Smooth Muscle Cells* (Células de músculo liso vascular)

**WB:** Western blot





## **ÍNDICE**

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 Enfermedad renal crónica: .....	11
2.2 Fósforo:.....	14
2.2.1 Regulación de fósforo: .....	15
2.2.2 Fosfaturia y balance de fósforo en la dieta: .....	16
2.2.3 Quelantes de fósforo .....	18
2.3 Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23):.....	19
2.3.1 Funciones fisiológicas de FGF23: .....	19
2.3.2 Fisiopatología de FGF23:.....	20
2.3.3 Receptores de FGF23 (FGFR):.....	21
2.4 Klotho: .....	23
2.4.1 Funciones fisiológicas de Klotho: .....	25
2.4.2 Regulación FGF23-Klotho:.....	27
2.4.3 Fisiopatología de Klotho:.....	27
2.4.4 Ruta WNT/ $\beta$ -catenina:.....	28
2.4.4.1 Ruta WNT/ $\beta$ -catenina canónica.....	28
HIPÓTESIS:.....	33
OBJETIVOS:.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
BLOQUE 1: Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23. ....	41
3.1 Experimentos en Animales (Experimentos 1-3).....	41
3.1.1 Recogida de muestras y determinaciones bioquímicas .....	43
3.1.2 Procesamiento de tejido renal .....	43
3.1.2.1 Preparación del Homogenado renal .....	43
3.1.2.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford .....	44
3.1.3 Técnica del Western blot.....	44
3.1.3.1 Preparación de muestras .....	45
3.1.3.2 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE (SDS: Dodecil sulfato sódico, PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida) .....	45
3.1.3.3 Transferencia semiseca de proteínas a una membrana de nitrocelulosa.....	45
3.1.3.4 Bloqueo de la membrana .....	46
3.1.3.5 Inmunodetección con anticuerpo primario y secundario .....	46
3.1.3.6 Revelado .....	46
3.1.4 RT-PCR: .....	47
3.1.4.1 Recogida de muestras.....	47
3.1.4.2 Extracción de ARN .....	47

3.1.4.3 Cuantificación de ARN .....	48
3.1.4.4 Tratamiento con DNAsa .....	48
3.1.4.5 Técnica RT-PCR a tiempo real.....	48
3.1.5 Nefrectomía 5/6.....	50
3.1.6 Cuantificación de FGF23 intacto .....	51
3.2 Experimentos “ <i>in vitro</i> ” (Experimentos 4-5) .....	52
3.2.1 Recuento y determinación de la viabilidad celular .....	53
3.2.2 Extracción de proteína citoplasmática .....	55
3.2.3 Estudio del papel de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina sobre el descenso de Klotho inducido por fósforo.....	55
3.2.3.1 Microscopía Confocal .....	55
3.2.3.2 Extracción de proteína nuclear .....	56
BLOQUE 2: Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal. ....	58
3.3 Diseño del estudio clínico 1.....	58
3.3.1 Criterios de inclusión: .....	58
3.3.2 Criterios de exclusión: .....	59
3.3.3 Determinaciones bioquímicas .....	59
3.4 Modelos experimentales “ <i>in vivo</i> ” (Experimento 6).....	60
3.4.1 Animales .....	60
3.4.2 Procedimientos experimentales: Heminefrectomía.....	61
3.4.3 Recogida de muestras y determinaciones bioquímicas .....	61
3.4.4 Western blot.....	61
3.4.5 Análisis histológico.....	62
3.4.5.1 Tinción Hematoxilina-Eosina .....	62
3.4.5.2 Tinción tricrómico de Masson .....	63
3.4.5.3 Tinción de ácido periódico o PAS.....	63
3.4.5.4 Tinción de von kossa.....	63
3.4.6 Análisis inmunohistoquímico .....	64
3.4.7 Cuantificación de la actividad Glutation Peroxidasa en tejido renal. ....	64
3.4.8 Expresión renal del ARNm de $\alpha$ -klotho.....	65
3.5 Modelos experimentales “ <i>in vitro</i> ” (Experimento 7) .....	65
3.5.1 Evaluación del estrés oxidativo .....	66
BLOQUE 3: Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo.....	67
3.6 Diseño del Estudio clínico 2 .....	67
3.6.1 Recogida de muestras y determinaciones bioquímicas .....	67
3.6.1.1 Cuantificación de PTH.....	68
3.6.1.2 Cuantificación de FGF23 c-terminal .....	68
3.6.1.3 Cuantificación de FGF23 intacto.....	68
3.6.2 Variables de excreción urinaria de fósforo.....	68

3.6.3 Estimación de ingesta .....	69
3.7 Estadística .....	70
4. RESULTADOS .....	74
BLOQUE 1: Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23. ....	74
BLOQUE 2: Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal. ....	93
BLOQUE 3: Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo.....	110
5. DISCUSIÓN.....	124
BLOQUE 1: Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23. ....	124
BLOQUE 2: Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal. ....	128
BLOQUE 3: Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo.....	131
6. CONCLUSIONES .....	138
7. BIBLIOGRAFÍA.....	142
8. ANEXOS.....	156
8.1 Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. FASEB J. 2017; 31 (9): 3858-3867. (Bloque 1) .....	156
8.2 Increased phosphaturia accelerates the decline in renal function: a search for mechanisms. Sci Rep. 2018; 8: 13701-13714. (Bloque 2) .....	156
8.3 Phosphaturia and the source of dietary phosphate in patients with chronic kidney disease (En revision). (Bloque 3) .....	156



# RESUMEN



## 1. RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología prevalente que se asocia a alteraciones en el metabolismo óseo mineral, alto riesgo cardiovascular y mortalidad. Por ello, es necesaria la realización de investigaciones dirigidas tanto a prevenir como a identificar los mecanismos de progresión de la ERC.

El fósforo sérico incrementa con el deterioro de la función renal y a su vez es un factor de riesgo de progresión de ERC. Por otro lado, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) es una hormona fosfatúrica clave en este contexto ya que se encarga fundamentalmente de la excreción urinaria de fósforo. Por esta razón, el objetivo general de esta tesis es estudiar los mecanismos que subyacen a la resistencia a FGF23 e identificar un biomarcador capaz de predecir la progresión de la ERC.

Inicialmente planteamos modelos experimentales animales e *in vitro* para determinar los mecanismos responsables de la resistencia de FGF23. Para ello, se evaluó el efecto de la administración de FGF23 recombinante en ratas con función renal normal, observándose una reducción significativa de la expresión renal de Klotho. A continuación, se exploró el efecto de FGF23 en ratas con insuficiencia renal que recibían dietas con diferente contenido en fósforo, de forma que la dieta rica en fósforo incrementó los niveles de FGF23 produciendo aumento de su receptor FGFR1 pero disminución del co-receptor Klotho. Tras administrar un anticuerpo anti-FGF23 (que disminuye los niveles de FGF23), la elevación de la fracción de excreción de fósforo en orina se asoció con una reducción de Klotho, responsabilizando al exceso de fósforo como un elemento clave para promover el descenso de Klotho y el aumento de FGF23. Con estos hallazgos, se planteó posteriormente valorar el efecto del calcitriol como estrategia terapéutica para incrementar los niveles de Klotho. Sin embargo, a pesar de aumentar el fósforo sérico, la expresión de Klotho no descendió. Es decir, el calcitriol evitó la reducción de Klotho inducida por fósforo aunque no consiguió incrementar sus niveles. *In vitro*, se evaluó el papel de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina sobre los niveles de Klotho y ante un exceso de fósforo. Comprobamos que la inhibición de la ruta con Dkk1 (*Dickkopf*) consiguió aumentar los niveles de Klotho descendidos por el elevado fósforo. Por último, se valoró el efecto de calcitriol en la expresión de Klotho en células HEK-293, observando que calcitriol restablece también aquí la expresión de Klotho *in vitro*. Por tanto, la existencia de una resistencia a FGF23 promovida por la sobrecarga de fósforo, posibilita que el FGF23 aumente excesivamente mientras que la expresión de Klotho disminuye, causando un descenso en la fosfatúria y promoviendo por tanto la hiperfosfatemia y las posteriores calcificaciones vasculares.

Por otro lado, a la vista de estos resultados se realizaron estudios clínicos y experimentales para evaluar en qué medida la elevada ingesta de fósforo y el exceso de fósforo en orina pueden servir



como marcadores de progresión renal. A través de los siguientes estudios experimentales realizados pudimos observar que, en estadios tempranos de la ERC, la excesiva carga tubular de fósforo es responsable de estrés oxidativo, inflamación y daño renal que contribuye a la progresión de la ERC. De la realización de los estudios clínicos se puede concluir que el ratio fósforo/creatinina podría ser un biomarcador útil para estimar la progresión de la ERC en pacientes con estadios iniciales de la enfermedad. Además encontramos que el ratio fósforo/urea en orina de 24h podría ser un marcador de ingesta de fósforo, por lo que podría ser útil evaluando la progresión de la ERC y como guía para el asesoramiento dietético con el que poder controlar la carga de fósforo en los pacientes con ERC en estadios tempranos de la enfermedad

**RESUMEN  
EN INGLÉS**



## ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a prevalent pathology that is associated with mineral bone disease (CKD-MBD), high cardiovascular risk and mortality. Therefore, it is necessary to conduct research aimed at both identifying and preventing the mechanisms of progression of CKD.

Serum phosphate increases during impaired renal function and in turn is a risk factor for CKD progression. In contrast, fibroblast growth factor 23 (FGF23) is a phosphaturic hormone that is vital in this context since it is primarily responsible for urinary phosphate excretion. For this reason, the general aim of this thesis is to study the mechanisms that be the cause of resistance to FGF23 and identify a talented biomarker of predicting the progression of CKD.

In the beginning we propose animal and in vitro experimental models to determine the mechanisms responsible for the resistance of FGF23. For this, the effect of the administration of recombinant FGF23 in rats with normal renal function was evaluated, and a significant reduction in renal expression of Klotho was observed. Next, the effect of FGF23 in rats with renal insufficiency that received diets with different phosphate content was explored; so that the phosphate-rich diet increased FGF23 levels producing an increase in its receptor FGFR1 but a decrease in the co-receptor Klotho. After anti-FGF23 antibody administration (which lowers FGF23 levels), the elevation of the phosphate excretion fraction in urine was associated with a reduction in Klotho, holding excess phosphate responsible as a key element in promoting drop in Klotho and the increase in FGF23. With these findings, it was subsequently proposed to assess the effect of calcitriol as a therapeutic strategy to increase Klotho levels. However, despite increasing serum phosphate, Klotho's expression did not decrease. That is, calcitriol avoided the reduction phosphate-induced of Klotho although it failed to increase its levels. In vitro, the role of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway on Klotho levels and with an excess phosphate was evaluated. We verify that the inhibition of the pathway with Dkk1 (Dickkopf) achieved to increase the levels of descended Klotho by the high phosphate. Finally, the effect of calcitriol on the expression of Klotho in HEK-293 cells was assessed, observing that calcitriol also restores here the expression of Klotho in vitro. Therefore, the existence of a resistance to FGF23, promoted by phosphate overload, makes it possible for FGF23 to increase excessively while Klotho's expression decreases, causing a decrease in phosphaturia and thereby promoting hyperphosphatemia and the subsequent vascular calcifications.

Then again, in view of these results, clinical and experimental studies were conducted to assess the extent to which high phosphate intake and excess phosphate in urine can serve as markers of renal progression. Through the following experimental studies we were able to observe that, in the early stages of CKD, the excessive phosphate tubular load is responsible for oxidative stress, inflammation and renal damage that contribute to the progression of CKD. From the results of

clinical studies, it can be concluded that the phosphate/creatinine ratio could be a useful biomarker to estimate the progression of CKD in patients with initial stages of the disease. Moreover we found that the 24h urine phosphate/urea ratio could be a marker of phosphate intake, so it could be useful in assessing the progression of CKD and as a guide for dietary advice to control the load phosphate in patients with early stages of CKD.





# INTRODUCCIÓN





## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Enfermedad renal crónica:

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología de elevada prevalencia en España. Según el registro de la Sociedad Española de Nefrología ésta alcanza un 10%, destacando un significativo crecimiento del 20% en la última década. El estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España) reveló en 2010 que la prevalencia de la ERC en estadios moderados (hasta estadio 3) es de un 6.5% (1). Según datos más recientes, publicados en el estudio ENRICA (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España), la prevalencia de la ERC en España se sitúa en un 15.1% (2).

La ERC se define como la disminución de la función renal, establecida por un filtrado glomerular estimado (FGe) inferior a 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, y/o la existencia de daño renal, durante al menos tres meses de duración, independientemente de la causa subyacente. La lesión renal engloba alteración histológica en la biopsia renal, la presencia de albuminuria (ratio albúmina/creatinina (Alb/Cr) ≥30 mg/g), sedimento urinario anormal (hematuria y/o leucocituria), alteraciones electrolíticas u otras alteraciones de origen tubular, anomalía estructural detectada en una prueba de imagen o historia de trasplante renal.

Las guías *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) en 2012 (3) establecieron la actual clasificación pronóstica de ERC en base al FGe y a la albuminuria (Ilustración 1). De esta manera, se describen hasta 6 estadios en función del valor del FGe (Las categorías de FG se denominan con la inicial G):

- G1: Daño renal con FGe normal o alto: > 90 ml/min/1.73m<sup>2</sup>
- G2: Daño renal con FGe levemente disminuido: 60-89 ml/min/1.73m<sup>2</sup>
- G3a: Descenso leve-moderado: 45-59 ml/min/1.73m<sup>2</sup>
- G3b: Descenso moderado-grave: 30-44 ml/min/1.73m<sup>2</sup>
- G4: Descenso grave: 15-29 ml/min/1.73m<sup>2</sup>
- G5: Fallo renal: <15 ml/min/1.73m<sup>2</sup>

A su vez, de acuerdo a la albuminuria se describen tres posibles categorías (Las categorías de albuminuria se denominan con la inicial A):

- A1: Daño renal con albuminuria normal o aumento leve: <30mg/g ó <3 mg/mmol
- A2: Aumento moderado: 30-299 mg/g ó 3-29 mg/mmol
- A3: Aumento grave: ≥300 mg/g ó ≥30 mg/mmol (3).

De esta forma, la ERC se clasifica en los siguientes estadios:

- ERC G1 o estadio 1 (FGe G1 con albuminuria A2 ó A3)
- ERC G2 o estadio 2 (FGe G2 con albuminuria A2 ó A3)
- ERC G3a o estadio 3a (FGe G3a con cualquier categoría de albuminuria A1-A3)
- ERC G3b o estadio 3b (FGe G3b con cualquier categoría de albuminuria A1-A3)
- ERC G4 o estadio 4 (FGe G4 con cualquier categoría de albuminuria A1-A3)
- ERC G5 o estadio 5 (FGe G5 con cualquier categoría de albuminuria A1-A3).

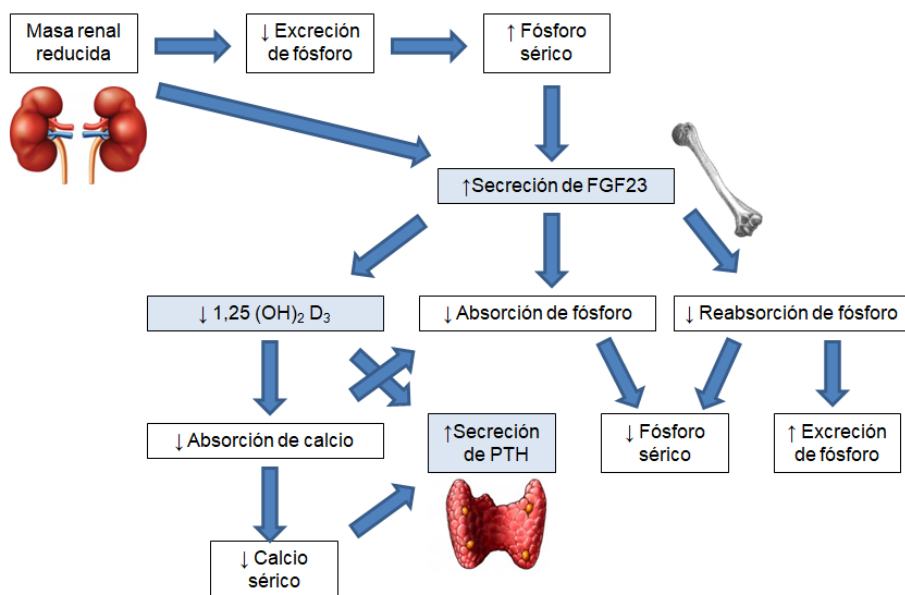
Los pacientes con ERC presentan alto riesgo cardiovascular y, por consiguiente, elevada mortalidad con respecto a la población general (4). Esta clasificación permite estimar riesgo cardiovascular y pronóstico renal en función de la combinación de FGe y albuminuria. De esta manera, se ha propuesto un código de colores (Ilustración 1) que identifica el riesgo cardiovascular relativo ajustado para cinco tipos de eventos: mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal.

El riesgo menor corresponde al color verde “riesgo bajo” (Si no hay otros datos de lesión renal, no hay enfermedad renal), el color amarillo describe “riesgo moderadamente aumentado”, el naranja “riesgo alto” y el rojo “riesgo muy alto”, por lo que expresan signos crecientes para los eventos mencionados (3).

Filtrado Glomerular (Categorías, descripción y rangos)			Albuminuria (Categorías, descripción y rangos)		
			A1	A2	A3
			N / ↑ leve <30	↑ moderado 30-299	↑ grave >300
G1	FGe normal o alto	≥ 90			
G2	Levemente disminuido	60-89			
G3a	↓ leve-moderado	45-59			
G3b	↓ moderado-grave	30-44			
G4	↓ grave	15-29			
G5	Fallo renal	<15			

**Ilustración 1. Clasificación pronóstica de la ERC adaptada de las guías KDIGO 2012 (3).** Las categorías de FG se denominan con la inicial G y las categorías de albuminuria con la inicial A. Los rangos de FG están medidos en “ml/min/1.73m<sup>2</sup>” y los rangos de albuminuria están medidos como ratio albúmina/creatinina en “mg/g”. FG: Filtrado glomerular, N: normal, ↑: aumento, ↓: descenso.

Es importante señalar que la ERC se asocia a una mayor morbilidad cardiovascular acompañada también de importantes alteraciones en el metabolismo óseo mineral. En este sentido, se ha identificado a la hiperfosfatemia crónica como un factor de riesgo de calcificación vascular y enfermedad cardiovascular (5–8). Hay que destacar que la retención de fósforo ocurre desde estadios tempranos de la ERC (estadio 2) apareciendo en forma de hiperfosfaturia y posteriormente hiperfosfatemia en estadios 4-5 (9). Otro elemento clave en estas alteraciones cardiovasculares y del metabolismo mineral asociado a la ERC es el desmesurado incremento del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23, del inglés, *Fibroblast Growth Factor 23*). Esta hormona, producida en el hueso, se encarga de mantener la homeostasis del fósforo promoviendo la fosfaturia (10). Sin embargo, durante la ERC hay un incremento progresivo y paralelo al descenso del filtrado glomerular (11). El FGF23 protege de las consecuencias de la hiperfosfatemia incrementando la excreción urinaria de fósforo y descendiendo la producción de vitamina D, la cual indirectamente reduce la absorción intestinal de fósforo como se indica en la Ilustración 2. Hoy día es sobradamente conocido por tanto, que en pacientes con ERC, elementos como FGF23 y hormona paratiroidea (PTH) están elevados crónicamente debido a la retención de fósforo y al descenso de la producción de calcitriol.



## **Ilustración 2. Alteraciones en el metabolismo óseo-mineral en la enfermedad renal crónica.**

La reducción de la masa renal se traduce en la aparición de hiperfosfatemia e incremento de FGF23. Dicha hormona mantiene la homeostasis del fósforo disminuyendo la producción de calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) y la absorción y reabsorción de fósforo. FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23; PTH: hormona paratiroidea.

En esta situación, los incrementos de FGF23, PTH y fósforo contribuyen inexorablemente al desarrollo de calcificaciones vasculares (5).

El metabolismo mineral se ve alterado al comienzo y durante la progresión de la ERC. Estas alteraciones son complejas ya que las modificaciones en uno de sus componentes repercuten sobre la concentración de los demás conduciendo a un desequilibrio general de todo el metabolismo mineral. Hoy día sabemos que órganos como la glándula paratiroidea, el riñón, el intestino o el hueso están implicados en el mantenimiento de este metabolismo mineral. Sin embargo, aún hoy se desconocen muchos aspectos relacionados con su control y regulación.

A continuación, se exponen con más detalle las características de los principales protagonistas del desequilibrio del metabolismo mineral, su relación con otros elementos implicados en su regulación y su papel en la fisiopatología de la ERC.

### **2.2 Fósforo:**

El fósforo es esencial para diversas funciones biológicas como la señalización celular, la obtención de energía o el metabolismo mineral (8). En individuos sanos con función renal normal el balance de fósforo es normal y se mantiene equilibrado (12). La concentración de fósforo sérico incrementa con el deterioro de la función renal, siendo manifiestamente elevada a partir del estadio 4 de ERC (fósforo > 5 mg/dl) (9,13). A su vez, el elevado fósforo sérico es un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad renal (14). Niveles elevados de fósforo sérico se asocian con incremento de eventos cardiovasculares, calcificación vascular y mortalidad en población con y sin ERC (8,15,16); mientras que niveles bajos de fósforo se han relacionado con menor tasa de eventos cardiovasculares en población sin ERC (15). No obstante, el fósforo sérico se asocia con incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular, incluso estando en rango normal (7,8,17). Se ha demostrado que el fósforo sérico es un factor de riesgo independiente de mortalidad por todas las causas (desarrollo de insuficiencia cardíaca y eventos coronarios, en pacientes con historia previa de infarto de miocardio incluso con fosfatemia en rango normal) (8).

Como se ha comentado, la hiperfosfatemia es un factor clave en el desarrollo de calcificaciones vasculares por la inducción de cambio de fenotipo en las células de músculo liso vascular (VSMC: del inglés, *Vascular Smooth Muscle Cells*) que se diferencian hacia células similares a osteoblastos (6,18,19). Existen también numerosos estudios experimentales en animales que demuestran que la hiperfosfatemia promueve calcificaciones vasculares (20,21). Asimismo, en estudios clínicos se ha comprobado también que elevados niveles séricos de fósforo son un factor de riesgo para el desarrollo de calcificaciones vasculares, con la subsecuente afectación cardiovascular (6). También se ha comprobado tanto *in vitro* como *in vivo* que la hiperfosfatemia causa disfunción endotelial. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que el exceso de fósforo inhibe la síntesis de óxido nítrico, a través de la producción de radicales libres de oxígeno y de la inactivación de la óxido nítrico sintetasa endotelial; lo cual altera la vasodilatación dependiente de endotelio. Como es sabido, tanto las calcificaciones vasculares como la disfunción endotelial se asocian al desarrollo y progresión de la enfermedad cardiovascular (17).

### **2.2.1 Regulación de fósforo:**

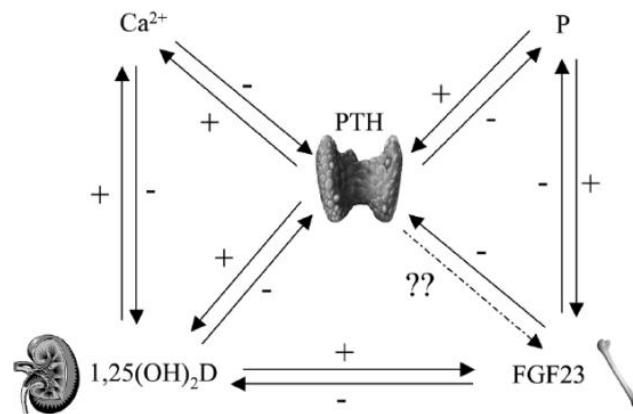
Como se observa en la Ilustración 3, son varias las hormonas que intervienen en la regulación de los niveles séricos de fósforo. De un lado, PTH y calcitriol son consideradas hormonas calciotrópicas que participan del control del fósforo.

La secreción de PTH es modulada por la concentración de calcio extracelular; sin embargo, y como fue documentado por nuestro grupo en 1996, el fósforo puede directamente promover la secreción de PTH (22). Este aspecto fue posteriormente corroborado por otros grupos de investigación en pacientes con ERC (12,23). A su vez, la PTH promueve la fosfaturia disminuyendo los co-transportadores de sodio-fósforo (Na-Pi 2a y Na-Pi 2c), promoviendo su internalización en las células del túbulo proximal y reduciendo con ello el fósforo sérico (24). La PTH además favorece la producción de calcitriol (12).

El calcitriol tiene como precursor el colecalciferol, el cual previamente sufre una 25-hidroxilación en el hígado y posteriormente una 1- $\alpha$ -hidroxilación en el riñón que determinan la forma activa de la vitamina D. Los efectos de la vitamina D en la homeostasis del calcio y del fósforo son mediados por la unión al receptor de vitamina D (VDR) (23). El calcitriol incrementa la absorción intestinal de fósforo mejorando la expresión del co-transportador Na-Pi tipo 2b. El mismo aumento de fósforo suprime la producción de calcitriol (12).

De esta forma, el fósforo es regulado tanto por la PTH como por el calcitriol. En población general, el fósforo sérico tiene efecto directo sobre la síntesis de calcitriol y también sobre su degradación

a través de FGF23 (25). Además, el calcitriol suprime la síntesis de PTH y favorece la producción de FGF23 (12,23). Como se describirá posteriormente con más detalle, el FGF23 es uno de los elementos fundamentales en la regulación del fósforo produciendo aumento de fosfaturia y disminución de la fosfatemia.



**Ilustración 3. Regulaciones endocrinas en el metabolismo óseo-mineral.** Mecanismo de retroalimentación entre hormona paratiroidea (PTH), calcio (Ca<sup>2+</sup>), fósforo (P), calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D) y FGF23 (factor de crecimiento fibroblástico 23). FGF23 es estimulado por la concentración sérica de fósforo para contribuir en su regulación (26).

Además, hay que mencionar que otras hormonas intervienen también en la regulación del fósforo como son: el glucagón, que promueve la fosfaturia; la insulina; la somatostatina, que al inhibir la secreción de insulina produce hiperglucemia y disminuye la reabsorción de fósforo (27); los glucocorticoides, que suprimen la reabsorción de fósforo; o la hormona del crecimiento, que mejora la reabsorción de fósforo modulando la expresión de los co-transportadores de sodio-fósforo (12).

### 2.2.2 Fosfaturia y balance de fósforo en la dieta:

Las personas con función renal normal mantienen el fósforo sérico en rango normal, incluso a pesar de una dieta rica en fosfatos. Esto se consigue a través del incremento de los niveles de FGF23. Estos niveles aumentan en proporción a la ingesta, induciendo mayor excreción urinaria de fósforo y disminuyendo los niveles de vitamina D para reducir su absorción intestinal (10). Fundamentalmente, junto con el calcitriol y la PTH, el FGF23 regula las altas concentraciones de fósforo (tras la ingesta), incrementando la excreción renal y disminuyendo la absorción de fósforo

en el intestino a través de la inhibición de los transportadores de sodio-fósforo de los túbulos renales (28,29).

Según la *European Food Safety Authority* (EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), la ingesta diaria de fósforo recomendada es de 1000-1767 mg (30). Las consecuencias de una elevada ingesta de fósforo están siendo objeto de estudio en los últimos años. Chang et al (31) demostraron en una población sana americana que la elevada ingesta de fósforo (mayor de 1400 mg/día), y no las concentraciones plasmáticas de fósforo, se asocian con un incremento de la mortalidad. Más recientemente, Trautvetter et al. (29) realizaron un estudio paralelo, doble ciego, controlado por placebo en el que participaron 66 adultos sanos con función renal normal. Los pacientes tratados recibieron suplementos de fosfato monosódico con o sin carbonato cálcico para conseguir una ingesta adicional de 1000 mg de fósforo al día. Tras 8 semanas de intervención, mostraron que la ingesta de 1000 mg de fósforo diarios no influye en las concentraciones de fósforo sérico. En adultos sanos existe una correcta homeostasis del fósforo que supone la normalización de los niveles séricos a pesar de sufrir cargas agudas de fósforo. El suplemento de fósforo incrementó la fosfaturia, pero además su excreción fecal, lo que indica la formación de fosfato cálcico en intestino. Respecto a FGF23, solo se encontró un aumento temporal de sus niveles a las 4 semanas de la administración de los suplementos, después se mantuvo en rango dentro de la normalidad. Por otro lado, y respecto a los grupos de intervención, se detectó un descenso en la excreción renal de calcio en los que no recibieron suplementos de calcio, mientras que curiosamente, esta excreción renal de calcio permaneció estable en los que recibieron suplementos cálcicos; lo cual indica que ante una ingesta elevada de fósforo y sin una adecuada suplementación de calcio parece detectarse un impacto negativo sobre el metabolismo del calcio (29).

La práctica clínica diaria en pacientes con ERC subraya la importancia de realizar una restricción de fósforo en la dieta, y más en concreto, del fósforo inorgánico vinculado sobre todo a aditivos, el cual es absorbido prácticamente al 100% (32). Por el contrario, no se debe reducir la ingesta del fósforo orgánico, que es el que se encuentra en los alimentos ricos en proteínas y se absorbe en un 35-86%; ya que conllevaría a una desnutrición proteica (32,33). Aproximadamente el 90% del fósforo filtrado por el glomérulo es reabsorbido por las células tubulares renales, lo cual es regulado por PTH y FGF23, que disminuyen su reabsorción tubular. Por tanto, se recomienda una restricción de los aditivos y conservantes alimenticios basados en fósforo inorgánico ya que se absorben rápidamente e incrementan considerablemente los niveles de fósforo sérico (32).

Hoy día no sabemos si hay o no una relación entre fosfaturia, inducida tanto por FGF23 como por PTH, y las distintas posibles fuentes de fósforo derivadas de la ingesta. Uno de los objetivos de



esta tesis está dirigido a explorar la relación entre las distintas fuentes de fósforo y las hormonas fosfatúricas. Del mismo modo se investigará en la obtención de un biomarcador basado en parámetros bioquímicos que nos permita ponderar la ingesta de fósforo del paciente con ERC.

### 2.2.3 Quelantes de fósforo

Un quelante es un fármaco que capta el fósforo contenido en los alimentos ingeridos reduciendo su absorción y aumentando su excreción por heces. El uso de quelantes está indicado en estadios avanzados de insuficiencia renal con hiperfosfatemia. Existe una amplia variedad de quelantes de fósforo. Algunos de ellos están basados en calcio, incorporando al calcio como principal elemento captor de fósforo, mientras que otros no son dependientes de calcio. A continuación, se mencionan algunos de los más empleados en la práctica clínica:

- Quelantes cálcicos: acetato cálcico (Royen®), carbonato de calcio (Mastical®), acetato cálcico/carbonato de magnesio (Osvarén®).
- Quelantes no cálcicos: hidróxido de aluminio (Pepsamar®), carbonato de lantano (Fosrenol®) y carbonato de sevelamer (Renvela®)
- Nuevos quelantes: oxihidróxido sucroférico (Velphoro®).

Para la elección del tipo de quelante se deben tener en cuenta diversos factores tales como edad, género, estado menopáusico, presencia de diabetes, remodelado óseo, calcificaciones valvulares y vasculares o el estado de inflamación (33).

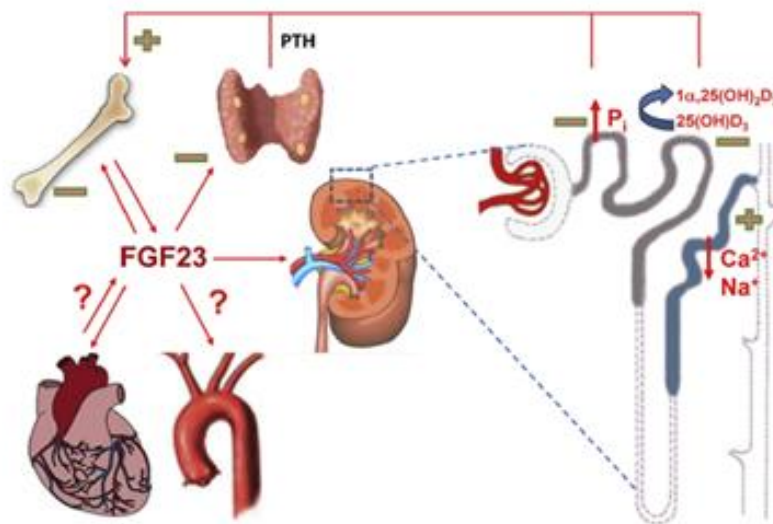
Con el objetivo reducir y normalizar los niveles séricos de fósforo, las guías KDIGO indican que se debe iniciar el tratamiento con quelantes de fósforo cuando éste exceda del límite normal (fósforo > 5 mg/dl) (34) lo cual suele suceder en estadios avanzados de la ERC. Simultáneamente al uso de quelantes de fósforo se debe realizar una restricción de la ingesta de fósforo en la dieta al objeto de reducir también su absorción a nivel intestinal (10,34). Esta absorción intestinal de fósforo es altamente dependiente de la naturaleza y de la cantidad de fósforo ingerido en la dieta, así como de la expresión del co-transportador de Na-Pi tipo 2b. En pacientes con ERC (no en diálisis) se ha comprobado que el empleo de quelantes de fósforo reduce la excreción urinaria de fósforo y atenúa la progresión del hiperparatiroidismo secundario (13).

A pesar de esto, actualmente existe controversia acerca de qué quelante de fósforo (cálcico o no cálcico) es el más adecuado y cuál es el momento más indicado para administrarlo (35,36).

### 2.3 Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23):

El FGF23 es una hormona fosfatúrica, descubierta en el año 2000 (37), que reduce la reabsorción de fósforo a través de la disminución de los co-transportadores Na-Pi 2a y Na-Pi 2c en las células epiteliales renales del túbulo proximal. A nivel renal, FGF23 también resulta ser un inhibidor de la enzima 1- $\alpha$ -hidroxilasa que finalmente determina una disminución del calcitriol (5,10,11).

FGF23 es secretado en el hueso por osteocitos y osteoblastos maduros y es estimulado fundamentalmente por la PTH, la vitamina D (calcitriol) o el incremento de fósforo extracelular (5,10,11). No obstante, también se ha visto que el déficit de hierro, el incremento de calcio intracelular o el estímulo proinflamatorio promueven la secreción de FGF23 en el hueso (5,10,38).



**Ilustración 4. Funciones endocrinas de FGF23.** La secreción ósea de FGF23 (factor de crecimiento fibroblástico 23) es estimulada por fósforo (Pi), hormona paratiroidea (PTH) y calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). A nivel renal, el FGF23 inhibe la reabsorción de fósforo y la expresión de 1- $\alpha$ -hidroxilasa en el túbulo proximal. Aumenta la reabsorción de calcio (Ca<sup>2+</sup>) y sodio (Na<sup>+</sup>) en el túbulo distal. En las glándulas paratiroides, el FGF23 inhibe la secreción de PTH. A nivel fisiopatológico se ha relacionado con hipertrofia ventricular izquierda y se está investigando su efecto a nivel de los vasos sanguíneos (Adaptada de (5)).

#### 2.3.1 Funciones fisiológicas de FGF23:

Para ejercer el efecto fosfatúrico en el riñón, FGF23 precisa de la unión a receptores específicos (FGFR1-4) y a su co-receptor Klotho (la unión a Klotho aumenta la afinidad de la unión de FGF23 a FGFR1) (5,10,39).

La acción fisiológica primaria de FGF23 es estimular la excreción urinaria de fósforo a través de la supresión de la expresión de transportadores Na-Pi 2a y Na-Pi 2c en la membrana apical de células del túbulo proximal. La presencia de transportadores Na-Pi en la membrana apical es necesaria para la reabsorción del fósforo de la orina al epitelio (5,10,28,40). Na-Pi 2a es el principal transportador de fósforo y es crucial para la capacidad adaptativa del túbulo proximal a la ingesta de fósforo en la dieta, a pesar de niveles persistentemente elevados de FGF23 (41).

El FGF23 directamente, junto con su co-receptor Klotho, disminuye la expresión de Na-Pi 2a en la membrana de células renales epiteliales del túbulo proximal por fosforilación del complejo NHERF-1 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulatory coFactor-1*) a través de las quinasas 1 y 2 (ERK1/2) y la quinasa 1 regulada por glucocorticoides (*Serum/Glucocorticoid-regulated Kinase-1* (SGK1)). FGF23 a través de NHERF-1 regula la presencia de Na-Pi 2a en la membrana apical del epitelio del túbulo proximal (5,42). Se ha documentado que Klotho podría actuar también como factor fosfatúrico autocrino alterando la función de Na-Pi 2a a través de su actividad glucuronidasa (5,39). Tanto la PTH como el FGF23 interactúan también en la regulación de la reabsorción renal de fósforo (5,10). En la glándula paratiroides, FGF23 inhibe la secreción de PTH vía FGFR- Klotho dependiente activando directamente la vía MAPK que termina disminuyendo la secreción de PTH (26).

FGFR1 y Klotho se expresan en paratiroides (26,43). En estudios previos del grupo, se ha demostrado que en las glándulas paratiroides de ratas con insuficiencia renal se produce un descenso de FGFR1 y Klotho, lo cual produce resistencia a la acción de FGF23 (44). Sin embargo, en condiciones de hipocalcemia, FGF23 no es igualmente efectivo en la inhibición de PTH (45).

### **2.3.2 Fisiopatología de FGF23:**

Se ha documentado una relación significativa entre niveles de FGF23 y progresión de la enfermedad renal (46–48), hipertrofia de ventrículo izquierdo (49), disfunción endotelial (50), eventos cardiovasculares (incremento del riesgo de infarto de miocardio e ictus) (47,51) y mortalidad en pacientes con ERC (5,47,52) (independientemente de los niveles de fósforo sérico y de otros factores de riesgo conocidos (5,10,52).

FGF23 promueve directamente enfermedad cardiovascular y progresión de la enfermedad renal debido a que induce retención de sodio y de volumen (5,48). FGF23 se ha descrito también como predictor independiente de progresión renal (46,47). En modelos animales de uremia se ha

demostrado que la neutralización de FGF23 incrementa los niveles séricos de vitamina D, disminuye el hiperparatiroidismo secundario y mejora otros parámetros de metabolismo óseo-mineral. A pesar de estos beneficios para la enfermedad renal, también produce elevación de los niveles séricos de fósforo que contribuyen al aumento de calcificaciones vasculares y con ello a la mortalidad (53).

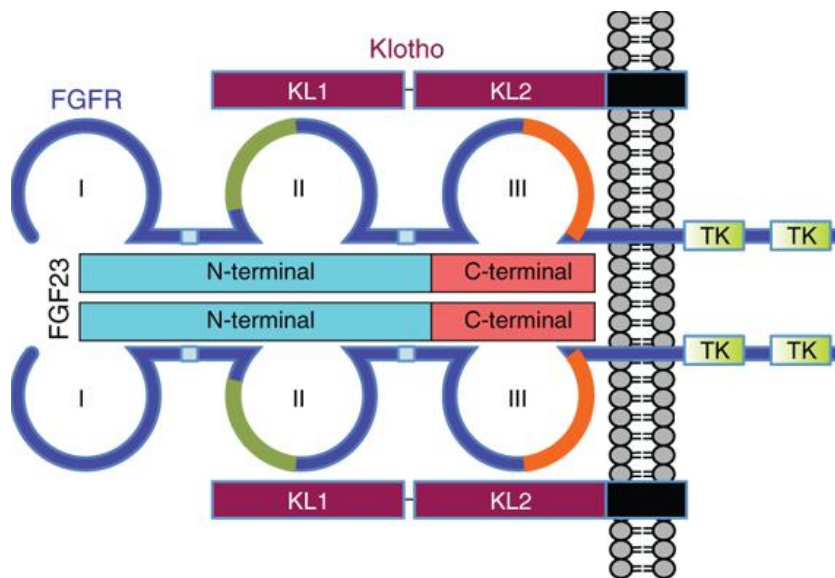
Además, FGF23 actúa sobre los cardiomiocitos induciendo hipertrofia de ventrículo izquierdo a través de la activación de FGFR4 de una forma independiente de Klotho (5,49,54). La hipertrofia ventricular izquierda es una de las mayores complicaciones en los pacientes con ERC ya que contribuye a disfunción diastólica, insuficiencia cardiaca congestiva, arritmias y muerte. No obstante, en un estudio reciente se ha demostrado que dichos efectos hipertróficos pueden ser reversibles *in vitro* e *in vivo*, a través del bloqueo específico de FGFR4 (55).

A nivel de endotelio, FGF23 puede inducir disfunción endotelial por interferencia directa con la vasodilatación mediada por óxido nítrico. FGF23 incrementa los niveles de radicales superóxidos, disminuyendo los niveles de óxido nítrico (5,11,50). Al causar disfunción endotelial, contribuye a mayor morbimortalidad cardiovascular produciendo arterioesclerosis a nivel de arteria carótida (11,50).

Con respecto a las calcificaciones vasculares, existe controversia. Los estudios más recientes están siendo inconsistentes y contradictorios con respecto al efecto de FGF23 sobre la calcificación vascular (56,57). Scialla et al defienden que el FGF23 no promueve calcificación vascular y que son las concentraciones elevadas de fósforo las que inducen calcificación *in vitro* (57). Sin embargo, Jimbo et al afirman que el FGF23 favorece el fenotipo osteogénico de las VSMC inducido por fósforo a través de la activación de ERK1/2 (19).

### **2.3.3 Receptores de FGF23 (FGFR):**

Los FGFR son receptores tirosina quinasa, que se fosforilan tras la activación de la unión con el ligando. La Ilustración 5 muestra la estructura bioquímica de FGFR.

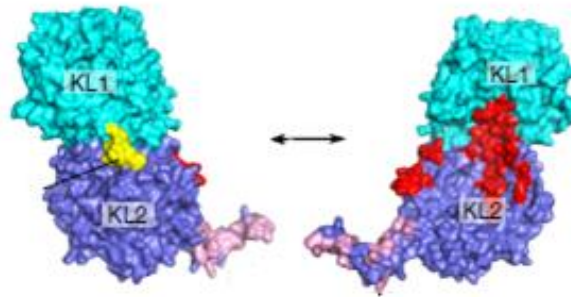


**Ilustración 5. Estructura bioquímica de FGFR.** El complejo FGF-FGFR consta de dos moléculas receptoras, dos FGFs y un proteoglicano de heparán sulfato que estabiliza y secuestra los ligandos de FGF. El FGFR (receptor de FGF23) comprende tres inmunoglobulinas (I-III) extracelulares, una hélice transmembrana y una tirosín quinasa (TK) de dominio intracelular (Adaptada de (58)).

Hay 4 tipos de FGFR diferentes (FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4) pero todavía existen controversias sobre cuáles de ellos son responsables de las acciones de FGF23 y en que tejidos o tipos celulares actúa (5). Existen evidencias de que, tanto en riñón, hueso como en tejido adiposo, FGF23 actúa a través del complejo FGFR1-Klotho (5,39,59,60), pero también se conoce que Klotho puede unirse además a FGFR3 y FGFR4 (5). Wu et al emplearon anticuerpos selectivos de FGFR1 para estudiar los efectos de la activación de dicho receptor en la homeostasis del fósforo. Demostraron que la activación de FGFR1 es suficiente para inducir expresión de FGF23 y disminuir los niveles séricos de fósforo en ratones adultos estimulando la fosfatúria a través de la supresión de la expresión de transportadores Na-Pi 2a y Na-Pi 2c (60). Las células epiteliales del túbulo proximal expresan FGFR1, FGFR3 y FGFR4, pero no FGFR2 (5,42). No obstante, se ha sugerido que FGFR1 y FGFR4 son los receptores más críticos para la acción fosfatúrica de FGF23 (61). Se ha demostrado también que el aumento de los niveles de FGF23 tanto en fracaso renal agudo como en ERC es mediado por FGFR. Los estudios *in vitro* mostraron que los ligandos de FGFR incrementan la transcripción de FGF23 en diferentes células óseas y que la inhibición de FGFR previene dicho efecto (62). Hay que señalar que hoy día, y a nivel renal, no se conoce cómo la ERC afecta a la expresión de los receptores de FGF23. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral está dirigido a evaluar los cambios asociados a los niveles de FGF23 sobre sus receptores renales, con especial interés en FGFR1 y Klotho.

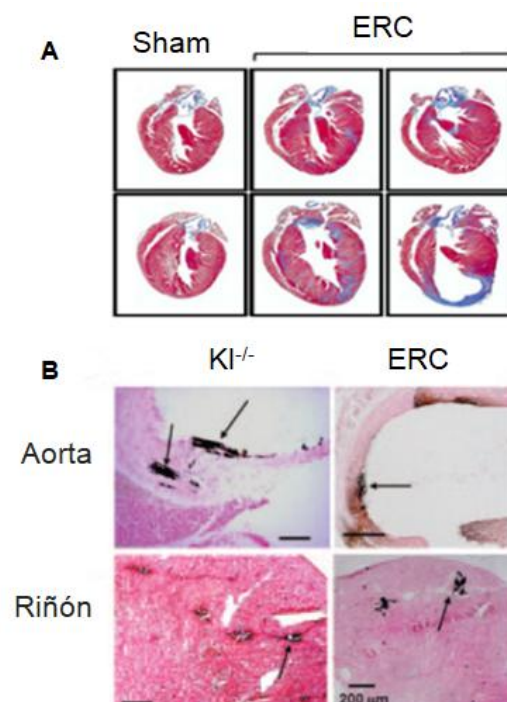
## 2.4 Klotho:

$\alpha$ Klotho es una proteína transmembrana descubierta en 1997 por Makoto Kuro-O (63). Klotho presenta homología con la familia de proteínas  $\beta$ -glicosidasas. La estructura de la proteína Klotho se muestra en la Ilustración 6.



**Ilustración 6. Estructura de la proteína Klotho.** Los dominios KL1 (señalado en azul cian) y KL2 (señalado en morado) están unidos por un conector corto rico en prolina (señalado en amarillo). La estructura termina con el brazo de unión al receptor (señalado en rosa) que interactúa directamente con FGFR1. FGF23 encaja en un espacio generado entre Klotho y FGFR1 (señalado en rojo) (Adaptada de (64)). FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23; FGFR1: receptor 1 de FGF23.

La proteína Klotho se descubrió como un factor anti-envejecimiento (63). La ausencia de Klotho en ratones Knock-out se relaciona con envejecimiento, calcificación vascular y fibrosis cardíaca como se observa en la Ilustración 7 (11,65–68).



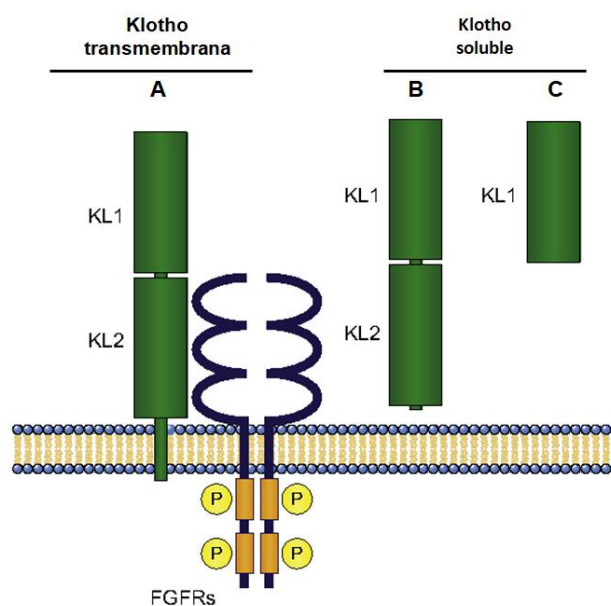


**Ilustración 7. La ausencia de Klotho inducida por la ERC se relaciona con A) fibrosis cardíaca (Adaptada de (65)) B) y con calcificación vascular (Tinción von Kossa: calcificación en aorta y riñones de ratones  $Kl^{-/-}$  (modelo experimental Knock-out de Klotho) y de ratones con ERC (Enfermedad renal crónica) señaladas con flechas) (Adaptada de (66)).**

Klotho tiene propiedades anti envejecimiento: modulación de homeostasis  $Ca^{2+}/Pi$  (69), efectos antioxidantes (70), supresión del factor 1 de crecimiento similar a insulina (*Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1)) (71), protección de endotelio por la síntesis de óxido nítrico, inhibición del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) y expresión de moléculas de adhesión endoteliales (72).

Se conocen tres isoformas de la proteína Klotho: transmembrana, truncada o proteolizada y soluble (5,39).

Como se aprecia en la Ilustración 8, el dominio extracelular de Klotho (Klotho transmembrana) consiste en dos secuencias con actividad  $\beta$ -glicosidasa KL1 y KL2 (5,11), que al ser escindido por secretasas se convierte en Klotho proteolizado y Klotho soluble (11,73).



**Ilustración 8. Isoformas de la proteína Klotho.** Klotho transmembrana (A) puede ser escindido por secretasas en fragmentos (B y C) que son secretados al torrente circulatorio (Klotho soluble) (Adaptada de (74)).

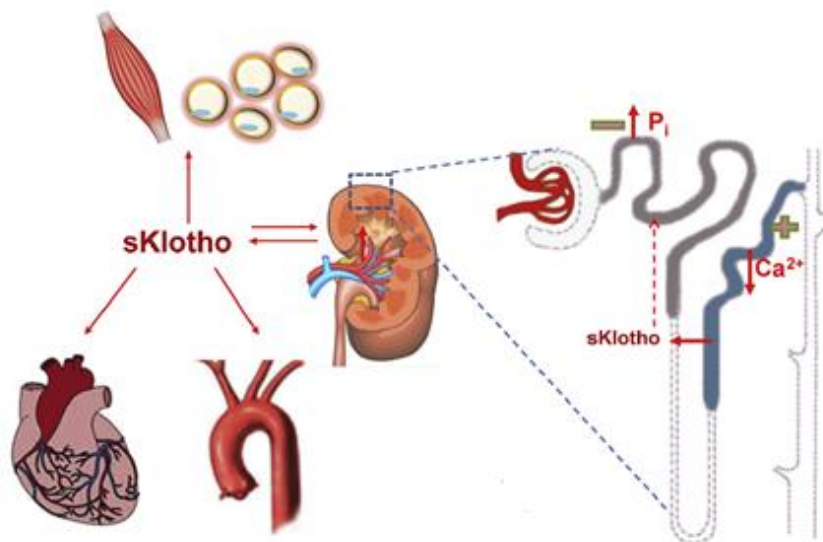
Klotho está expresado en múltiples tejidos. En condiciones fisiológicas el riñón es su fuente principal, pero también puede encontrarse expresado con cierta abundancia en glándulas paratiroides (5,11) y cerebro. Finalmente, también se ha detectado su expresión en VSMC e

incluso en osteoblastos (11,63). Por tanto, es posible que las acciones del  $\alpha$ Klotho no estén suscritas a sus efectos renales, sino que pueda haber un efecto de Klotho en otros órganos. Además, dada la existencia de una fracción de Klotho soluble, sería posible encontrar efectos de esta proteína sobre cualquier tipo celular del organismo.

#### 2.4.1 Funciones fisiológicas de Klotho:

Las funciones fisiológicas de Klotho conocidas hasta el momento son:

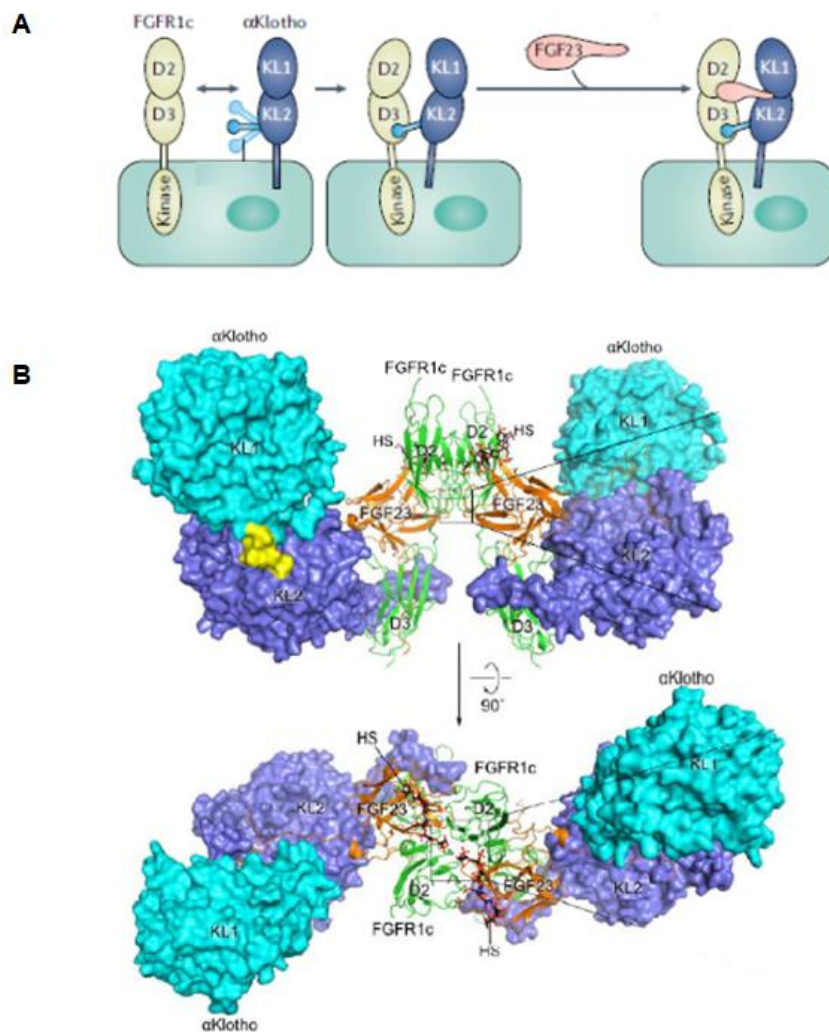
- Co-receptor de FGF23 como proteína transmembrana con capacidad para señalización celular (Klotho transmembrana).
- Función enzimática con actividad glicosidasa, con efectos directos en el túbulo proximal (Klotho proteolizado)
- Función hormonal (Klotho soluble) derivada de una escisión de los dominios extracitosólicos (5,75).



**Ilustración 9. Funciones endocrinas de Klotho.** El riñón es también la principal fuente de Klotho soluble (sKlotho). Se ha documentado que este Klotho inhibe la reabsorción de fósforo ( $P_i$ ) en los túbulos proximales y estimula la reabsorción de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en los túbulos distales. sKlotho actúa sobre músculo, tejido adiposo y sistema vascular. Protege contra la hipertrofia cardíaca y la calcificación vascular (Adaptada de (5)).

Hasta el momento, la acción mejor descrita de Klotho es la correspondiente a su efecto como co-receptor de FGFR mejorando la unión de FGF23 (Ilustración 10). De esta manera, se forma un complejo entre Klotho, FGFR y FGF23 más estable. Esta acción permite una activación más eficiente, con la consecuente activación de la señal de traducción en los órganos diana (11,64).





**Ilustración 10. Complejo FGF23-Klotho-FGFR.** A) Estructura básica de formación del complejo FGF23-Klotho-FGFR1. El dominio KL2 de la proteína Klotho tiene un bucle saliente denominado brazo de unión al receptor (señalado en celeste) que se une al dominio D3 del FGFR1. El FGF23 encaja en un surco generado por la unión de Klotho a FGFR1 y se une a Klotho a través de su extremo carboxi terminal, mientras el extremo amino terminal se une al dominio D2 de FGFR1 (adaptada de (76)). B) Representación de la estructura del Complejo FGF23-Klotho-FGFR (adaptada de (64)). FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23; FGFR1: receptor 1 de FGF23.

Klotho es necesario para convertir FGFR en receptores específicos de FGF23 incrementando la afinidad de estos receptores por FGF23 y no por otros factores de crecimiento fibroblásticos (11). De momento, sabemos que Klotho carece de un papel independiente de FGF23 en la homeostasis ósea mineral, siendo su labor principal la de promover la fosfaturia (39). Se ha documentado *in vitro* que tanto FGF23 como Klotho incrementan su expresión por la activación a nivel transcripcional del receptor de vitamina D por lo que este factor de transcripción podría estar relacionado con el desarrollo de sus acciones fosfatúricas (75). De esta manera se ha observado que el promotor de Klotho contiene elementos de respuesta a VDR por lo que se sugiere que la

expresión de Klotho está influenciada por la acción de la vitamina D. Sin embargo, hasta el momento solo hay datos *in vitro* que relacionen a la vitamina D con la expresión de Klotho. En esta tesis trataremos de estudiar *in vivo* e *in vitro* si la estimulación del VDR a través de la adición de calcitriol, podría suponer una estrategia terapéutica eficiente para incrementar los niveles de Klotho renal y con ello favorecer la fosfaturia y evitar hiperfosfatemia y calcificación vascular.

#### **2.4.2 Regulación FGF23-Klotho:**

En la ERC el Klotho soluble está disminuido mientras que el FGF23 está incrementado. Recientemente se ha documentado un estudio en el que se observa en 152 pacientes con ERC 3-5 una asociación significativa entre el descenso del filtrado glomerular (FG) y el aumento del cociente FGF23/Klotho soluble (77). Los niveles séricos de Klotho empiezan ya a descender en estadio 2 de ERC, precediendo incluso a la elevación de FGF23 y posteriormente a la de PTH y fósforo sérico (11). En las glándulas paratiroides, la menor expresión de Klotho y FGFR induce resistencia a la inhibición de FGF23, por lo que favorece el incremento de FGF23 y PTH en la ERC (10).

#### **2.4.3 Fisiopatología de Klotho:**

Los niveles séricos de Klotho empiezan a descender en estadios muy tempranos de la ERC. Además, se ha demostrado que es una proteína muy susceptible de modificar su expresión como consecuencia de procesos patológicos como inflamación o estrés oxidativo (11).

Para explicar los mecanismos a través de los cuales Klotho desciende, resulta particularmente interesante el trabajo publicado por Zhou L et al, en el que se describe que en modelos murinos con ERC existe una asociación entre la pérdida de Klotho y el incremento de moléculas activadoras de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina (78). Durante la uremia existen diferentes estímulos con capacidad para promover la activación de esta ruta, hecho que podría repercutir sobre los niveles renales de Klotho.

La ruta WNT es de gran importancia en el contexto de la formación ósea y está también directamente relacionada con los procesos de calcificación extraósea. En estudios previos del grupo, se ha demostrado que el aumento de fósforo asociado a calcificación de VSMC induce una activación de la ruta a través de la traslocación nuclear de  $\beta$ -catenina (79,80).

#### 2.4.4 Ruta WNT/ $\beta$ -catenina:

$\beta$ -catenina es una proteína localizada en la membrana plasmática de la célula, donde interacciona con moléculas de adhesión como E-cadherina favoreciendo la comunicación célula a célula (81). Sin embargo, también puede tener otras localizaciones donde está implicada en una compleja vía de señalización celular.

La vía de señalización WNT/ $\beta$ -catenina es una ruta compleja y muy conservada entre distintas especies. Esta ruta participa en procesos celulares básicos como proliferación, migración o apoptosis. Igualmente resulta clave en procesos de diferenciación celular hacia distintos tipos celulares (82). De esta manera, se ha comprobado que la activación de esta ruta es clave para la transdiferenciación osteogénica. Desde un punto de vista fisiopatológico, la activación anómala de esta ruta se ha relacionado también con la formación de tumores o con el desarrollo de calcificación vascular. Según el mecanismo de acción, el estudio de esta ruta se ha dividido en las siguientes partes:

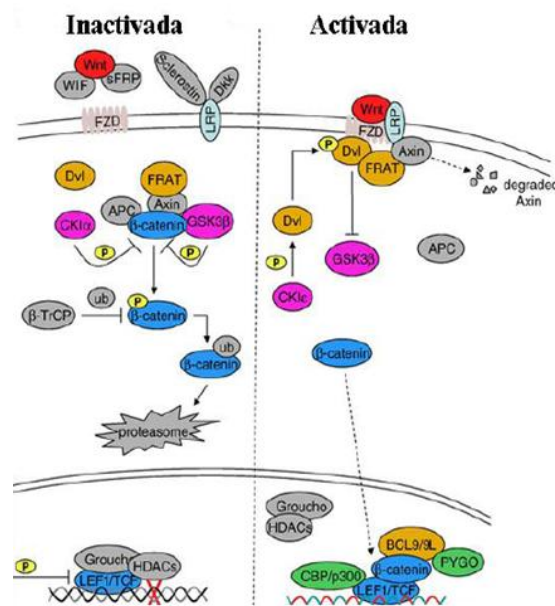
- Canónica o dependiente de  $\beta$ -catenina
- No canónica o dependiente de Calcio
- Ruta de polaridad celular planar

##### 2.4.4.1 Ruta WNT/ $\beta$ -catenina canónica

La Ilustración 11 muestra un esquema detallado de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina canónica. Como se puede observar, cuando esta ruta está inactiva,  $\beta$ -catenina se encuentra en el citoplasma secuestrada por un complejo proteico formado por glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), Axin, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) y Caseína quinasa-1 $\alpha$  (CK-1 $\alpha$ ). Allí,  $\beta$ -catenina es fosforilada en varios residuos serina/treonina, y se convierte en diana para ser degradada por ubiquitinación en el proteosoma.

Por el contrario, la ruta se activa cuando un ligando perteneciente a la familia de glicoproteínas WNT se une a un receptor de la familia *Frizzled* (Fzd) de 7 dominios transmembrana. Esta interacción con el ligando permite a Fzd, junto al co-receptor Lrp 5/6 (del inglés, *Lipoprotein Related Protein 5/6*), activar a la proteína citoplasmática *Dishevelled* (Dsh). Dsh, a su vez, inhibe la formación del complejo formado por GSK-3 $\beta$ , Axin, APC y CK-1 $\alpha$ , permitiendo la liberación de  $\beta$ -catenina, que se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde interacciona con el factor de transcripción TCF/LEF (del inglés, *T Cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor-1*) regulando la expresión de genes diana claves en la proliferación celular como ciclina D1 ó el

oncogen *c-Myc* (83).



**Ilustración 11. Esquema de la ruta WNT/β-catenina** publicado por Ling L. et al (84). Durante el estado inactivo de la ruta, β-catenina es degradada por el proteosoma; mientras que en estado activo, β-catenina se transloca al núcleo donde se une a diferentes factores de transcripción y promueve la señalización celular.

Por otro lado, se ha comprobado que la ruta WNT/β-catenina está fuertemente regulada por retroalimentación negativa por inhibidores endógenos. Uno de estos principales inhibidores es Dkk-1 (*Dickkopf*). Esta proteína interacciona con el co-receptor Lrp5/6 impidiendo la unión de Fzd con WNT (85). Dkk-1 también puede actuar junto a una proteína citoplasmática denominada Kremen, impidiendo igualmente la traslocación de β-catenina al núcleo. Sin embargo, en ausencia de Dkk-1, Kremen es capaz de realizar la acción contraria, favorecer la activación de la ruta (86). Otros inhibidores de la ruta son esclerostina o los de la familia de proteínas denominada *Secreted Frizzled Related Protein* (sFRP) que compiten por Fzd impidiendo o dificultando la unión de WNT (87).

La activación de esta ruta canónica impide la fosforilación y degradación de β-catenina, por lo que la β-catenina no fosforilada es translocada al núcleo para regular la expresión de genes diana (88,89).

En esta tesis se postula que una elevada concentración de fósforo podría inducir la activación de esta ruta en células tubulares renales al igual que ocurre en VSMC (18). Igualmente se pretende explorar una posible relación entre la activación de WNT y la reducción de los niveles renales de Klotho.



# HIPÓTESIS



## **HIPÓTESIS:**

Con estas premisas, consideramos necesario estudiar, en el contexto de la ERC y el metabolismo óseo mineral, las alteraciones que se producen a nivel molecular que contribuyen a la progresión de la enfermedad renal. Una de las hipótesis que planteamos es la existencia de una resistencia a FGF23 que posibilita que el FGF23 suba excesivamente mientras que Klotho baja considerablemente, disminuyendo con ello la fosfaturia y promoviendo por tanto la hiperfosfatemia y la calcificación vascular. A través de modelos experimentales animales e *in vitro* se pretende explorar los mecanismos a través de los cuales se produce esta resistencia al FGF23 en el riñón.

De igual modo, tenemos la hipótesis de que en estadios tempranos de la ERC la excesiva carga tubular de fósforo podría ser responsable de un daño renal que contribuya posteriormente a la progresión de la ERC. A través de estudios clínicos en pacientes con ERC evaluaremos en qué medida la elevada ingesta de fósforo y el exceso de fósforo en orina podrían servir como marcadores de progresión del daño renal.





# OBJETIVOS



## **OBJETIVOS:**

El objetivo general de esta tesis es estudiar tanto en condiciones fisiológicas como urémicas los mecanismos que subyacen a la resistencia a FGF23. Del mismo modo se pretende identificar un biomarcador capaz de predecir la progresión de la ERC.

El conocimiento de esta información podría permitirnos identificar dianas terapéuticas o generar biomarcadores con los que poder controlar la progresión de la ERC.

### **Objetivos específicos:**

- 1.- Estudiar en ratas sanas y urémicas el efecto de la administración exógena de FGF23 sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1.
- 2.- Analizar en ratas urémicas la relación entre FGF23 y los receptores renales de FGFR1 y Klotho.
- 3.- Evaluar en ratas urémicas el efecto de la administración de calcitriol sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1.
- 4.- Dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce la disminución renal de Klotho.
- 5.- Valorar el papel de la fosfaturia sobre el deterioro de la función renal en pacientes con síndrome metabólico y enfermedad renal crónica estadios 2-3.
- 6.- Evaluar la relación entre la ingesta de fósforo y la fosfaturia en pacientes con síndrome metabólico y enfermedad renal crónica estadios 2-3.
- 7.- Investigar en modelos animales experimentales los mecanismos a través de los cuales la sobrecarga de fósforo promueve daño renal.



# MATERIAL Y MÉTODOS



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales y métodos realizados para el desarrollo de esta tesis se dividen en 3 bloques de acuerdo a las distintas investigaciones realizadas.

- **BLOQUE 1:** Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23 (Modelos *in vivo* e *in vitro*, Experimentos 1-5).
- **BLOQUE 2:** Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión daño renal (Estudio clínico 1 y Modelos *in vivo* e *in vitro*, Experimentos 6-7).
- **BLOQUE 3:** Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo (Estudio clínico 2).

#### **BLOQUE 1: Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23.**

##### **3.1 Experimentos en Animales (Experimentos 1-3)**

Para el desarrollo de los experimentos *in vivo* se han utilizado modelos murinos de ratas Wistar macho de 230-260 g de peso y 9-10 semanas de vida. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, y con ciclos de 12h luz/oscuridad. Fueron alimentados con una dieta estándar que contiene 0.6% de calcio y 0.6% de fósforo. El día previo al sacrificio los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para la recogida de muestras de orina de 24 horas. Se determinó el volumen de orina recogido en estas 24 horas y se almacenó en alícuotas para la posterior medida de fósforo y creatinina. Al finalizar los tratamientos, se realizó eutanasia por punción aórtica y exanguinación bajo anestesia general con 20 mg/kg de tiopental sódico intraperitoneal.

Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Para el desarrollo de este bloque se han realizado sucesivos experimentos en modelos animales dirigidos a responder las preguntas que iban planteándose a medida que avanzaba la investigación y se obtenían resultados. Posteriormente, para comprobar los resultados obtenidos *in vivo* se plantearon experimentos *in vitro* con distintos tipos celulares que también se describirán más adelante.

#### **EXPERIMENTO 1: Efecto de la administración de FGF23 recombinante (rFGF23) sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1 en ratas sanas.**

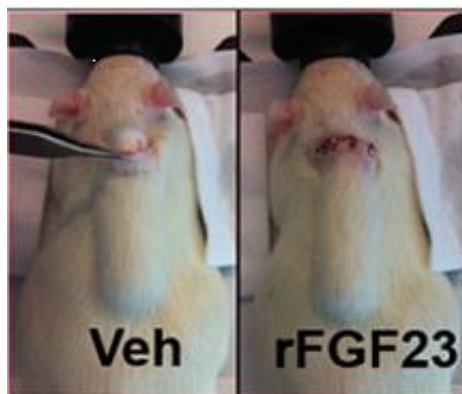


Se utilizaron 12 ratas con función renal normal, las cuales se dividieron en dos grupos:

- Grupo control o vehículo (n=6).
- Grupo rFGF23 (n=6).

La infusión de rFGF23 o vehículo se realizó a través de mini bombas osmóticas durante 14 días. Las ratas control recibieron vehículo constituido por tampón A5Su pH 5.0. Las ratas tratadas recibieron 15 µg/día de rFGF23. Esta dosis de rFGF23 es la misma que la utilizada en otros estudios previos nuestros y de otros grupos de investigación (26,44). El FGF23 intacto recombinante fue generosamente donado por la compañía Amgen, Inc, EEUU con quién colaboramos. Se trata de un rFGF23 con una mutación en R176Q que impide su ruptura en otros fragmentos de manera que se asegura que los efectos encontrados se deben a la molécula de FGF23 intacta añadida.

A cada una de las ratas se le colocó una mini bomba osmótica, modelo Alzet 2004 (Charles River Laboratories, Barcelona, España), en la zona dorsal de forma subcutánea entre los hombros tal y como se muestra en la Ilustración 12. El procedimiento se llevó a cabo bajo anestesia inhalatoria (Sevoflurano; Abbott, Madrid, España). En condiciones asépticas, la bomba fue cargada con rFGF23 (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, EE.UU.) para el grupo experimental o con un vehículo (tampón A5Su pH 5.0) para el grupo control.



#### **Ilustración 12. Localización de la bomba Alzet en la zona dorsal de la rata.**

La bomba Alzet administraba una infusión continua de 15 µg/día de rFGF23 o vehículo durante 14 días. En ese periodo de tiempo experimental, la dieta de todas las ratas contenía fósforo moderadamente alto (0,9%) para evitar la hipofosfatemia inducida por el rFGF23. Asimismo, para evitar un descenso de calcitriol (CTR) a consecuencia del exceso de FGF23, todas las ratas recibieron CTR (8 ng/rata, i.p., 3 veces/semana). Tras 14 días de tratamiento, se procedió a la extracción de muestras que permitían en primer lugar validar el modelo experimental y

posteriormente evaluar a través de Western blot y RT-PCR (Retrotranscripción - Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés, *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) los niveles renales de FGFR1 y Klotho.

### **3.1.1 Recogida de muestras y determinaciones bioquímicas**

La sangre se recolectó a través de punción aórtica abdominal en el mismo momento del sacrificio en tubos específicos para suero (BD Vacutainer, Becton Dickinson and Company, Reino Unido) y plasma (EDTA Vacutainer, Becton Dickinson, New Jersey, EE.UU.). Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar suero y plasma. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. En las ratas que recibieron CTR, la sangre se recogió a las 48 horas de la última administración intraperitoneal de éste. Los niveles de calcio sérico iónico se determinaron usando un analizador Spotlyte Ca<sup>2+</sup>/pH (Menarini Diagnostics, Barcelona, España). Los niveles de PTH intacta fueron cuantificados por ELISA (del inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Inmunotopics, San Clemente, CA, EE.UU.). Las concentraciones séricas de creatinina y fósforo se midieron por espectrofotometría (Sigma Diagnostics, Livonia MI, EE.UU), mientras que las concentraciones séricas de CTR se cuantificaron por radioinmunoensayo (InmunoDiagnostic Systems, Boldon, Reino Unido). Por último, los niveles de FGF23 intacto (iFGF23) se determinaron con el kit de la casa comercial Kainos Laboratories (Tokyo, Japón).

### **3.1.2 Procesamiento de tejido renal**

Tras lavado con solución salina fría, el riñón izquierdo fue rápidamente extraído y alicuotado en criotubos que se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C para los posteriores análisis por Western blot y RT-PCR de los cambios en la expresión y cantidad de FGFR1 y Klotho.

#### **3.1.2.1 Preparación del Homogenado renal**

Para realizar el análisis por Western blot de las proteínas indicadas, se obtuvieron lisados renales por disrupción mecánica del riñón con micropistilos en tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM (Tris: Tris hidroximetil amino metano), pH 7,4, EDTA 5 mM (EDTA: ácido etilendiaminotetraacético), NaCl 300 mM (NaCl: cloruro sódico), Neocuproína 0,1 mM, Triton X-100 al 1% y 1 mM de PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 1 mM de DTT (Ditiotretol) y 70 µg/ml de PIC (cóctel de inhibidor de proteasas, del inglés, *Proteasas Inhibitor Cocktail*). El homogenado se incubó en hielo durante 15 minutos con vórtex cada 5 minutos. Posteriormente las muestras

fueron centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron recogidos para proceder a determinar la cantidad de proteínas usando el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### **3.1.2.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford**

Este método se basa en la interacción del reactivo Bradford con las proteínas formando complejos colorimétricos relativamente estables de manera que se produce un cambio de coloración, el cual se cuantifica midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Los valores obtenidos se comparan con una recta estándar de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina. El protocolo para la determinación de proteínas fue el siguiente:

Para la elaboración de la recta patrón se prepararon 8 diluciones de la proteína sérica de albúmina bovina (BSA, del inglés, *Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich), cuya concentración máxima es de 25 µg/ml. El volumen final de cada muestra o estándar estaba compuesto por 5 µl del homogenado renal, 50 µl de NaOH 1 N y 745 µl de agua destilada a los que se le añadieron 200 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU). Se mezclaron las muestras vigorosamente con la ayuda de un vórtex justo antes de proceder a su carga.

Se cargaron por duplicado 200 µl de las 8 concentraciones de la recta patrón y de cada una de las muestras en una placa M96 de fondo transparente y curvo. Se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Biotek Power Wave XS, EE.UU) y se cuantificó la concentración de proteína de cada muestra. Para ello se calculó la ecuación de la recta patrón obtenida mediante una recta de regresión a partir de los valores de absorbancia de las diluciones del estándar. Dicha ecuación se usó para aplicar los datos de absorbancia de las muestras y calcular las concentraciones de éstas.

Una vez determinada la proteína de cada muestra, se procedió a realizar pool de concentraciones equimolares de los distintos animales pertenecientes a cada grupo con los que realizar Western blot de FGFR1 y Klotho usando β-actina como control de carga.

### **3.1.3 Técnica del Western blot**

El Western blot es una técnica basada en inmunodetección que emplea la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos a sus antígenos. Llevamos a cabo una inmunodetección indirecta usando un anticuerpo primario, para localizar la proteína de interés, y un anticuerpo secundario que reconoce al primario y localiza los complejos antígeno-anticuerpo.

### **3.1.3.1 Preparación de muestras**

Se utilizaron 50 µg de proteína, los cuales se diluyeron en agua y en tampón de carga 4X (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) hasta un volumen final de 30 µl. Para la desnaturalización de las proteínas necesaria para realizar el Western blot y exponer las zonas de reconocimiento del anticuerpo se incubó la mezcla en un termobloque a 70° C durante 10 minutos.

### **3.1.3.2 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE (SDS: Dodecil sulfato sódico, PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida)**

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en un gel SDS de poliacrilamida al 7% (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). Para ello, se añadió tampón Running 1X a la cubeta tanto por fuera del sistema de cristales del gel como por encima de los pocillos, donde se cargan las muestras. Posteriormente, se cargaron los 30 µl de muestra en cada pocillo, más 10 µl de peso molecular dual color en uno de los pocillos del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V y 95 mA durante 1 hora aproximadamente.

### **3.1.3.3 Transferencia semiseca de proteínas a una membrana de nitrocelulosa**

La transferencia de proteínas consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas para su posterior detección. Se realizó una transferencia semiseca. Para ello se equilibró primero todo el material a utilizar en la transferencia sumergiéndolo en un tampón de transferencia 1X (Tris base 50 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.02% y 20% de metanol) durante unos minutos. Pasado ese tiempo se hizo un "sándwich" del material sumergido sobre el transfer en este orden: Papel whatman absorbente, gel con las proteínas embebidas en él y separadas en función de su peso molecular, membrana de nitrocelulosa y de nuevo papel whatman. La transferencia se realizó durante 30 minutos en condiciones constantes de voltaje e intensidad (25 V y 230 mA).

Para confirmar la equivalencia de carga de proteína en las distintas muestras, al finalizar la transferencia las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 0.1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) y 5% de ácido acético durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana con agua hasta que la proteína transferida fue claramente visible. Una vez hecho esto, se procedió a tomar una fotografía de la membrana para documentar la correcta cuantificación y carga de las muestras. Seguidamente, mediante lavados con TTBS (*Tween Tris Buffered Saline* (Tris tampón salino con Tween-20) (Sigma-Aldrich): Tris base 20 mM; Tween-20 al 0.2% (v/v); NaCl 150 mM; a pH=7.6) se eliminó completamente el colorante para proceder a continuación con el bloqueo de las membranas.

### **3.1.3.4 Bloqueo de la membrana**

Este paso de bloqueo de la membrana es importante para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, eliminando el posible ruido de fondo o los falsos positivos que pudieran aparecer. De esta manera, la membrana fue bloqueada durante 1h a temperatura ambiente con leche al 5% (Bio-Rad, Munich, Alemania) disuelta en TTBS y a un pH de 7.6. Durante esta hora de incubación, la membrana se mantuvo en una agitación suave y constante.

### **3.1.3.5 Inmunodetección con anticuerpo primario y secundario**

Tras el bloqueo, la membrana se lavó tres veces con TTBS durante 15 minutos cada una y después se incubó con el anticuerpo primario específico contra las proteínas de interés y contra la proteína de expresión constitutiva diluido en TTBS. Dicha incubación fue durante toda la noche en agitación suave y a 4°C. Los anticuerpos primarios usados para este Western blot fueron los que se detallan a continuación:

- Anti-FGFR1: 5 µg/ml; Genetex, Irvine, CA, EE.UU.
- Anti-Klotho (de rata): 0.5 µg/ml; Transgenic, Kobe, Japón.

β-actina (dilución 1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU) fue usada como proteína de control de carga para asegurar una carga equitativa entre pocillos. Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TTBS durante 15 minutos. Para reconocer y detectar el anticuerpo primario, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios marcados enzimáticamente a temperatura ambiente durante 1 hora y con agitación suave. En concreto, se utilizó anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:5000 en una solución de TTBS + leche en polvo al 5%. Tras la incubación la membrana se lavó 3 veces con TTBS durante 15 minutos.

### **3.1.3.6 Revelado**

Como se ha indicado, se utilizaron anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano para hacer visible las proteínas reconocidas por los anticuerpos. Dicha enzima cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciendo así una reacción quimioluminiscente susceptible de ser detectada y cuantificada. Por tanto, la proteína inmunomarcada se detectó mediante el uso del reactivo ECL plus (ECL Advance Western blot detection system; Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia.) con el cual se incubaron las membranas sobre un cristal durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la posterior visualización de las bandas se usó el documentador de geles LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia). Una vez obtenidas las microfotografías, los niveles de las proteínas visualizados se cuantificaron usando el programa de análisis de imágenes ImageJ versión 1.44 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU). Los resultados se

expresaron en términos de densidad óptica relativa y se calcularon mediante la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de interés frente a la intensidad de la banda correspondiente a la proteína constitutiva y relativizada a la muestra control.

### 3.1.4 RT-PCR:

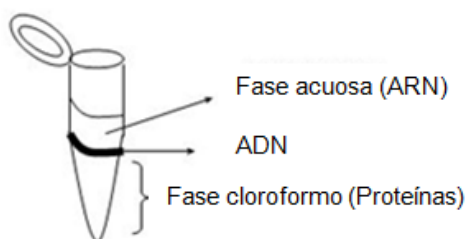
Esta técnica fue utilizada para evaluar la expresión renal de FGFR1 y Klotho en los distintos grupos de animales y en los posteriores estudios *in vitro*.

#### 3.1.4.1 Recogida de muestras

Para realizar el análisis por RT-PCR, se obtuvo el homogenado renal como se describió en el apartado 3.1.2.1 y se recogió en tubos eppendorf. A continuación se añadió a cada eppendorf 1 ml de Trizol para que se produjera la lisis celular y se mezcló vigorosamente la muestra con ayuda de un vórtex. Después se realizó extracción y cuantificación de ARN (ácido ribonucleico), tratamiento con DNasa (enzimas que digieren fragmentos de ADN: ácido desoxirribonucleico) y RT-PCR a tiempo real.

#### 3.1.4.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el protocolo habitual en el que se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo por muestra y se agitó vigorosamente con vórtex. Después se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos y 4°C, y a continuación se recogió la fase superior acuosa de cada una de las muestras, en la cual se encuentra el ARN.



#### Ilustración 13. Separación de fases tras la centrifugación con cloroformo.

Posteriormente, para precipitar el ARN se utilizaron 500  $\mu$ l de isopropanol por mililitro de Trizol usado en cada muestra. Después se incubaron las muestras durante 10 minutos a -80°C. Antes y después del periodo de precipitación, las muestras se agitaron vigorosamente con vórtex. A continuación, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para eliminar los restos de isopropanol y conseguir mayor pureza del ARN extraído, el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Por último, se retiró el sobrenadante

y el precipitado se dejó secar durante unos minutos a temperatura ambiente para eliminar los posibles restos de etanol. El precipitado se diluyó en 50 µl de agua estéril libre de ARNasas (enzimas que digieren fragmentos de ARN) y se calentó en un termobloque a 55°C durante 5 minutos.

#### **3.1.4.3 Cuantificación de ARN**

El ARN aislado de las muestras fue cuantificado mediante la medida de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU). Las unidades de concentración de ARN que proporciona el aparato son en µg/µl.

#### **3.1.4.4 Tratamiento con DNAsa**

Para eliminar la posible contaminación con ADN genómico, el ARN total extraído con Trizol fue sometido a un tratamiento con DNAsas. Para ello se utilizó el kit de DNAsa de la casa comercial Sigma-Aldrich (Referencia AMPD1, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

El protocolo empleado fue el siguiente: Se trató 1 µg de ARN con 1 µl de tampón de reacción 10X, 1 µl de DNAsa y agua libre de ARNasas y DNAsas hasta completar un volumen final de 10 µl. Esta mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió a la reacción 1 µl de solución de parada y se dejó incubar durante 10 minutos a 70°C en un termobloque.

#### **3.1.4.5 Técnica RT-PCR a tiempo real**

La RT-PCR permite la amplificación específica de una pequeña cantidad de moléculas de ARNm (ARN mensajero), primero mediante una retrotranscripción del ARN, produciendo ADNc (ADN copia), y posteriormente amplificando dicho ADNc en sucesivos ciclos de PCR. De esta manera, la RT-PCR es una técnica muy sensible, que requiere poco ARN.

Se realizó en un termociclador LightCycler 480 en placas de 96 pocillos de Roche (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, USA) con un kit comercial QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción requiere la presencia de una polimerasa termoestable, iones divalentes (principalmente  $Cl_2Mg$ ), 4 dNTP (Desoxirribonucleósidos-trifosfato) marcados con un fluoróforo SYBR® Green, y dos cebadores, pequeños oligonucleótidos complementarios a la secuencia génica que se desea valorar. Los cebadores o primers son los encargados de la unión al fragmento de ADN que se desea amplificar, indicando a la polimerasa dónde debe comenzar y parar la reacción en cada ciclo. El ADN sintetizado contiene intercalada en la monocadena el fluorocromo SYBR® Green, que se encarga de emitir una fluorescencia proporcional a la



concentración de ADN.

El ciclo umbral es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

El ADN sintetizado y el ADN molde tras la amplificación, se unen formando una doble cadena ya que son complementarios. La temperatura de fusión o de melting ( $T_m$ ), es la temperatura necesaria para separar este ADN bicatenario. La  $T_m$  es específica de cada fragmento, ya que depende de su longitud y de su contenido en guanina+citosina, de forma que pueden obtenerse curvas diferentes por cada producto amplificado, donde el pico máximo corresponde a la  $T_m$ , y el área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto. La cuantificación de la expresión relativa se determinó por la fórmula  $2^{-\Delta(\Delta CT)}$  descrita por Livak and Schmittgen (2001) (90). En este estudio, la expresión génica relativa de cada uno de los genes de estudio se determinó mediante RT-PCR cuantitativa relativa utilizando el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen control constitutivo.

Los primers de rata de FGFR1 fueron adquiridos en Qiagen, mientras que los primers de Klotho fueron diseñados con el software *free Oligo 7* (<http://www.oligo.net/>) cuya secuencia se muestra en la Tabla 1.

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
GAPDH – Rata	AGGGCTGCCTTCTCTTGTGAC	TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG
Klotho – Rata	CTCTGAAAGCCTACGTGTTGG	TAGAAACGAGATGAAGGCCAG

**Tabla 1. Secuencia de los primers de Klotho y GAPDH (5'-3') de rata.**

Para confirmar que el producto obtenido en la PCR es resultado específico de los primer empleados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con Bromuro de Etidio a una concentración de 10 mg/ml, en tampón de Tris-base, ácido acético y EDTA (TAE) 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular para valorar el tamaño de cada amplicón. Las muestras y el marcador de peso molecular correspondiente se dejaron migrar durante 45-60 minutos, a un



potencial eléctrico de 90-110 V. El resultado se visualizó y fotografió en un documentador de geles tipo ChemiDoc XRS de Bio-Rad. Una vez comprobado el tamaño del amplicón y la ausencia de dímeros se procedió a validar el primer y realizar las correspondientes medidas.

## **EXPERIMENTO 2: Efecto de FGF23 elevado, secundario a insuficiencia renal y dieta alta en fósforo, sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1.**

Este experimento fue realizado para analizar el papel de los altos niveles de FGF23 sobre los receptores FGFR1 y Klotho en condiciones de daño renal. Para ello, se utilizaron 27 ratas que fueron sometidas a nefrectomía 5/6 (Nx5/6) y que se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo Nx-LP (n=7): Nx5/6 y dieta baja en fósforo (LP: del inglés, *Low Phosphate*), que contiene calcio 0.6% y fósforo 0.2%.
- Grupo Nx-HP (n=10): Nx5/6 y dieta alta en fósforo (HP: del inglés, *High Phosphate*), con calcio 0.6% y fósforo 1.2%.

Posteriormente, para discernir si los posibles efectos encontrados son debidos a los altos niveles de FGF23 o no, se procedió a analizar otro grupo de animales nefrectomizados al que se administró un anticuerpo anti-FGF23 que reduce los altos niveles de FGF23 ocasionados por la nefrectomía y el alto fósforo.

- Grupo Nx-HP+anti-FGF23 (n=10): Nx5/6 y dieta rica en fósforo que recibieron anti-FGF23 (0.75 mg/kg, i.p., 3 veces/semana). El anticuerpo anti-FGF23 fue generosamente donado por Amgen Inc (One Thousands Oaks, Ca, USA) con quién colaboramos. La información con respecto a la generación y dosificación del anticuerpo ha sido obtenida de la publicación realizada por el grupo de investigación de la Dra. Shalhoub et al.(53).

La nefrectomía 5/6 se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

### **3.1.5 Nefrectomía 5/6**

La insuficiencia renal por nefrectomía 5/6 se realizó en dos tiempos. Cada rata fue anestesiada con xilacina (5 mg/kg i.p.) y ketamina (80 mg/kg i.p.) y posteriormente se realizó una incisión de 5-8 mm en la superficie mediolateral izquierda del abdomen. El riñón izquierdo fue expuesto y se eliminó 2/3 de la masa renal. Después de 1 semana, se volvió a anestesiarse a cada rata y el riñón derecho fue extraído por completo. Las glándulas adrenales izquierdas se mantuvieron. Las ratas recibieron la dieta correspondiente al día siguiente de la segunda intervención quirúrgica. Todas las dietas fueron obtenidas de Altromin, Lage, Alemania.

A los 14 días se extrajeron muestras de sangre donde se analizaron los mismos parámetros bioquímicos descritos en el apartado 3.1.1 y muestras de riñón donde se analizaron a nivel de proteína y de ARNm la expresión de FGFR1 y Klotho tal como se indicó en los apartados 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4. Hay que señalar que la medida de FGF23 no pudo ser realizada en el Grupo Nx-HP+anti-FGF23 dado que la administración del anticuerpo anti-FGF23 interfiere con los anticuerpos de FGF23 de los ensayos ELISA disponibles. Por este motivo se tuvieron muy en cuenta los niveles de fósforo en sangre y orina para determinar la eficiencia del anticuerpo anti-FGF23.

### **3.1.6 Cuantificación de FGF23 intacto**

Los niveles de FGF23 intacto fueron determinados mediante la técnica ELISA tipo sándwich (Kainos Laboratories, Tokyo, Japón). Para ello, se añadieron muestras de plasma a unos pocillos recubiertos con un anticuerpo anti-FGF23 (parte N-terminal) dirigido contra la longitud del FGF23 N-terminal que captura el FGF23 intacto y el N-terminal. A continuación se lavaron los pocillos 5 veces con una solución de lavado y se añadió otro anticuerpo anti-FGF23 (parte C-terminal) conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) para detectar la longitud C-terminal. De esta forma, solo se reconoce el FGF23 intacto. La lectura de las muestras se realizó mediante absorbancia con la ayuda de un espectrofotómetro a 450 nm. Cuanto más actividad HRP se detecta, hay más intensidad de amarillo y más absorbancia que es proporcional a la cantidad de FGF23 intacto que se calcula a través de una recta patrón con concentraciones conocidas de FGF23.

### **EXPERIMENTO 3: Evaluación *in vivo* del efecto del suplemento con calcitriol sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1 en ratas con insuficiencia renal.**

Al objeto de analizar si la administración de vitamina D podría ser una estrategia adecuada para incrementar los niveles renales de Klotho y con ello mejorar la fosfaturia se utilizaron 14 ratas nefrectomizadas (Nx5/6) con dieta estándar de calcio (0.6%) y fósforo (0.6%) y se dividieron en dos grupos:

- Grupo Nx (n=7): Nx5/6 y dieta estándar que recibieron vehículo (salino normal) intraperitoneal durante 5 días.
- Grupo Nx+CTR (n=7): Nx5/6 y dieta estándar que recibieron calcitriol (20 ng, i.p., cada 48 h) también durante 5 días.

En estas condiciones, transcurridos 5 días del inicio del experimento se procedió a analizar los parámetros bioquímicos en sangre descritos en el apartado 3.1.1 y los parámetros renales relativos a la expresión de FGFR1 y Klotho a nivel de ARNm y proteína como se describió en los apartados 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4.

### **3.2 Experimentos “*in vitro*” (Experimentos 4-5)**

Para corroborar los resultados obtenidos *in vivo* en los tres primeros experimentos y proponer mecanismos a través de los cuales éstos se desencadenan, nos planteamos utilizar modelos *in vitro* con células HEK-293. Se trata de una línea de células embrionarias de riñón humano adquiridas en la casa comercial Lonza (Walkersville, MD, EE.UU).

#### **EXPERIMENTO 4: Efecto *in vitro* del exceso de fósforo sobre la expresión de Klotho en células renales HEK-293: estudio del papel de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina.**

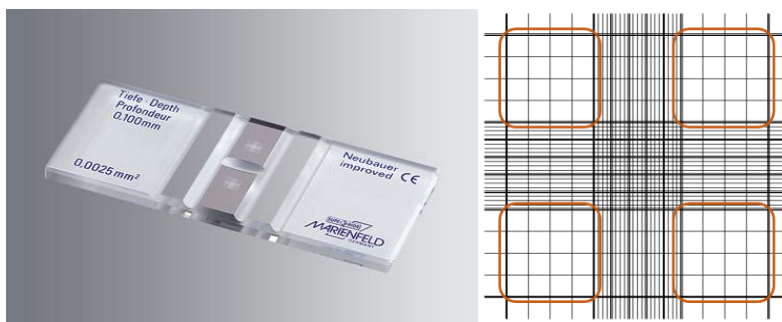
El objetivo de este experimento fue investigar *in vitro* si elevadas concentraciones de fósforo modifican la expresión de Klotho y FGFR1 en células renales. Las células HEK-293 fueron cultivadas en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de FBS (Suero bovino fetal, del inglés, *Fetal Bovine Serum*: Bio Whittaker; Verviers, Bélgica), piruvato sódico (1 mM), glutamina (4.5 g/L), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y HEPES (Hidroxietil piperizina-etano-sulfonato) (20 mM). Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C en condiciones de un 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad para su mantenimiento y crecimiento. Las células HEK-293 se utilizaron entre el quinto y décimo pase. Se sembraron con una densidad de 20.000 células/m<sup>2</sup> y los tratamientos comenzaron una vez éstas alcanzaron el 90% de confluencia. Después de alcanzar esta confluencia, las células fueron subcultivadas y sembradas en placas de 6 pocillos de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo y las células adheridas al frasco fueron lavadas 2 veces con suero fisiológico. Posteriormente, las células se levantaron con una solución de Tripsina/EDTA (Sigma Aldrich Inc, MO, EE. UU.) con una incubación de 5 minutos a 37°C. Transcurrido este periodo de incubación, se añadió medio de cultivo con presencia de FBS al 20%, para inhibir la acción de la tripsina. A continuación, la suspensión celular se trasladó del frasco de cultivo a un tubo universal y fue centrifugada durante 5 minutos a 400 g y a 4°C. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo fresco y posteriormente se extrajo una alícuota para contar las células.

### 3.2.1 Recuento y determinación de la viabilidad celular

Para contar las células, se obtuvo una alícuota de la suspensión celular a la cual se le añadió el mismo volumen de Azul tripán (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) y de esta mezcla se cargaron 10  $\mu$ l en la cámara de Neubauer. A continuación, se contaron las células vivas en cada cuadrante de 1  $\text{mm}^2$ , en el microscopio óptico. El azul tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en el interior de células que tienen la membrana alterada. Por tanto, una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta incorporará el colorante a su citoplasma y se teñirá de azul. De este modo se puede determinar la viabilidad celular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(\text{Células incoloras} / \text{células totales}) \times 100 = \% \text{ viabilidad celular}$$

La cámara de Neubauer (Ilustración 14) es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas en cuyo fondo se ha marcado una cuadrícula de dimensiones conocidas en cada una de ellas. Se cubre la cámara con un cubreobjetos, posteriormente se introduce por capilaridad entre la cámara y el cubre, la mezcla de 10  $\mu$ l con las células a contar.



**Ilustración 14. Cámara de Neubauer para conteo de células.**

Cada cuadrícula contiene cuatro áreas de 4x4 cuadrados. El volumen de cada zona es  $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$ . Si contamos las células que hay en cada área, se puede calcular la concentración de la suspensión celular según la siguiente fórmula:

$$\text{Media de conteos de las cuatro áreas} \times 2 \times 10^4 = \text{Número de células/ml.}$$

Si multiplicamos este valor por el número de ml de la suspensión celular obtenemos por tanto el número total de células adheridas al frasco de cultivo.

Una vez contadas y lavadas las células, se cultivaron en placas de 6 pocillos (Nunc, Dinamarca). A la mitad de los pocillos se añadió fósforo en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en proporción 1:2 (Sigma-Aldrich) para obtener una concentración final de fósforo de 3.3 mM. Los otros 3 pocillos quedaron sin tratamiento como células control. Tras 5 días de cultivo se procedió en primer lugar a determinar la expresión de FGFR1 y Klotho. El medio de cultivo fue cambiado diariamente y a los 5 días de tratamiento se realizaron análisis de RT-PCR de FGFR1 y Klotho humanos (Tabla 2) y Western blot de Klotho. En la Tabla 2 se muestran los primers de Klotho y GAPDH de humano y en la Tabla 3 se recogen los anticuerpos utilizados en el Western blot. Se siguió el mismo procedimiento empleado con las muestras de tejido renal en el apartado 3.1.4.

	<b>Fordward</b>	<b>Reverse</b>
GAPDH – Hum.	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT
Klotho – Hum.	CCACTCGAAACCATCCATGAG	GACCACCAAGAGAGATGATGC

**Tabla 2. Secuencia de los primers de Klotho y GAPDH (5'-3') de humano. Hum: humano.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia</b>
Klotho (humano)	Transgenic Inc.	1:500	KO603
$\beta$ -actina (constitutivo)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500	sc-47778

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el Western blot: Klotho y  $\beta$ -actina.**

El Western blot de Klotho se realizó en la fracción de proteína citoplasmática de acuerdo al siguiente protocolo:

### **3.2.2 Extracción de proteína citoplasmática**

En otras placas de 6 pocillos, tras finalizar el experimento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos 2 veces con suero fisiológico. Para obtener la fracción citoplasmática se añadió al pocillo 150 µl de una solución de lisis a pH 7.9 que contiene 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA (Etilen glicol-bis), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 70 µg/ml de PIC, 0.5% Igepal CA-630. Todos los componentes celulares de esta solución de lisis fueron adquiridos en la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EE.UU). La lisis celular se produjo en frío con ayuda de un rascador de células o scraper. El volumen recuperado del pocillo se trasladó a un eppendorf que se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido es la fracción citoplasmática. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el posterior uso para el análisis de Klotho. Para este Western blot de Klotho se usó el anticuerpo Anti-Klotho como se ha mostrado en la Tabla 3 y se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.1.3.

### **3.2.3 Estudio del papel de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina sobre el descenso de Klotho inducido por fósforo.**

Para estudiar el papel de la ruta WNT se empleó el inhibidor endógeno de la ruta WNT, Dkk-1. Los pocillos con altas concentraciones de fósforo (3.3 mM) se suplementaron con 100 ng/ml de Dkk-1 recombinante humano (R&D Systems Inc., Mineapolis, MN, EE. UU). Tras 5 días de tratamiento con Dkk1, se analizaron los niveles de  $\beta$ -catenina tanto a través de Western blot como por microscopía Confocal. Se usó el programa ImageJ versión 1.44 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU) para estudiar las imágenes obtenidas por Western blot y microscopía Confocal. Todos los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces.

#### **3.2.3.1 Microscopía Confocal**

Antes de comenzar el marcaje, se retiró el medio de cultivo y las HEK-293 se lavaron con PBS (Solución salina tamponada de fosfato, del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (3 veces) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol (MERCK, Madrid, España). Primero en metanol al 50% en agua a 4° C durante 2 minutos, luego con metanol al 100% a -20° C durante 20 minutos, y para terminar de nuevo con metanol al

50% en agua a 4° C durante 2 minutos. Al finalizar se lavaron con abundante volumen de PBS (3 veces) para retirar cualquier resto de metanol. A continuación se incubó durante 1h a temperatura ambiente con anti- $\beta$ -catenina (Dilución 1:50, Referencia 610153, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El anticuerpo se preparó en PBS con 1% BSA para evitar uniones inespecíficas. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron de nuevo con PBS antes del marcaje con el anticuerpo secundario. Se empleó un anti-mouse IgG-FITC (Dilución 1:500, Referencia F0232, DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. También fue diluido en PBS con 1% de BSA. Al terminar, y manteniendo las condiciones de oscuridad, se tiñeron los núcleos con DAPI (4'6' diamidino 2 fenilindol) (Invitrogen, California, USA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las HEK-293 se lavaron con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente antes del montaje con glicerol al 70% en agua. Los márgenes del cubre se sellaron con laca de uñas. Finalmente, las muestras se guardaron en frío y en oscuridad hasta ser observadas en el microscopio confocal LSM 5 Exciter Carl Zeiss (Munich, Alemania). Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ donde se utilizó el Coeficiente de Mander para indicar el porcentaje de píxeles azules correspondientes a DAPI que solapan con píxeles verdes que corresponden a  $\beta$ -catenina.

### 3.2.3.2 Extracción de proteína nuclear

La fracción nuclear se obtuvo tras incubar el pellet descartado de la lisis citoplasmática con otra solución de lisis también a pH 7.9 que contiene 20 mM HEPES, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 46  $\mu$ g/ml de PIC. Todos los componentes de la solución de lisis también fueron provistos por la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EE.UU). Las muestras se incubaron con la solución de lisis en frío durante 20 minutos agitando la muestra vigorosamente cada 5 minutos con ayuda de un vórtex. Posteriormente se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido en este caso es la fracción nuclear. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta el momento de su uso. Para este Western blot se usó el anticuerpo anti- $\beta$ -catenina, con incubación toda la noche en TTBS con 5% de leche en polvo, y  $\beta$ -actina como constitutivo, como se muestra en la Tabla 4.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
Anti- $\beta$ -catenina	Cell Signaling Technology	1:1000	9562
$\beta$ -actina (constitutivo)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500	sc-47778

**Tabla 4. Anticuerpos utilizados en el Western blot: Anti- $\beta$ -catenina y  $\beta$ -actina.**

**EXPERIMENTO 5: Efecto *in vitro* del suplemento con calcitriol sobre la expresión de Klotho en células HEK-293.**

El objetivo de este experimento fue evaluar *in vitro* si la suplementación con calcitriol en un medio con altos niveles de fósforo modifica la expresión de Klotho en células HEK-293. Las células se cultivaron en presencia de 3,3 mM de fósforo (de la misma forma que en el experimento anterior) en placas de 6 pocillos. Otras placas recibieron, además de los altos niveles de fósforo, un suplemento de calcitriol de  $10^{-9}$  M. Tras 5 días de tratamiento, se procedió a retirar el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y después a lavarlos 2 veces con suero fisiológico. A continuación se añadió a cada pocillo 1 ml de Trizol (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) para lisar y levantar las células. La lisis celular se produjo en frío. Seguidamente, las células fueron resuspendidas con una pipeta y la suspensión celular colocada en un eppendorf. Las muestras se sometieron a una agitación vigorosa con vórtex durante 10-15 segundos y posteriormente se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. De igual manera, tras 5 días, se realizó el análisis de Klotho por Western blot tal como ha sido expuesto en los apartados 3.1.3 y 3.1.4. Dicho experimento se realizó 3 veces.



## **BLOQUE 2: Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal.**

### **ESTUDIO CLÍNICO 1: Estudio acerca del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal en pacientes con estadios iniciales de enfermedad renal crónica.**

#### **3.3 Diseño del estudio clínico 1**

Los estudios en modelos experimentales del Bloque 1 estaban dirigidos a evaluar el papel del exceso de fósforo sobre el estado renal de Klotho y FGFR1 y la resistencia a FGF23. Como continuación de estos estudios del primer bloque, en este bloque 2 se propuso realizar un estudio clínico observacional de carácter retrospectivo con pacientes en seguimiento en la consulta de Nefrología durante 3 años para determinar el papel de la sobrecarga de fosforo sobre la progresión del daño renal. Estos pacientes se caracterizaban por tener síndrome metabólico con buen control de factores de riesgo cardiovascular, ERC estadios 2-3, pero con fosfatemia en rango normal y sin albuminuria manifiesta. Es decir, presentan afectación renal pero no tienen albuminuria, que es considerada un factor importante de progresión de la ERC. De esta forma, al no presentar factores de progresión renal (buen control de factores de riesgo cardiovascular y ausencia de albuminuria), se puede dilucidar el efecto de la fosfaturia sobre el deterioro de la función renal. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Reina Sofía y se obtuvo consentimiento informado.

Los criterios de selección de los pacientes fueron los siguientes:

##### **3.3.1 Criterios de inclusión:**

1. Sujetos con edad entre 18 y 86 años.
2. Pacientes con síndrome metabólico, definido por la presencia de tres o más de los criterios diagnósticos establecidos (91):
  - perímetro abdominal elevado (mujeres  $\geq 88$  cm, hombres  $\geq 102$  cm)
  - triglicéridos elevados ( $\geq 1.65$  mmol/L) o uso de medicación específica
  - HDL-colesterol (Lipoproteína de alta densidad, del inglés, *High Density Lipoprotein*) reducido (hombres  $< 1$  mmol/L, mujeres  $< 1.25$  mmol/L) o uso de medicación específica
  - glucosa en ayunas alterada ( $\geq 6.05$  mmol/L) o uso de medicación antidiabética
  - hipertensión arterial (presión arterial sistólica ó diastólica  $\geq 140$  o  $\geq 90$  mm Hg)

respectivamente) o uso de medicación antihipertensiva.

3. FGe medido por CKD-EPI, entre 30 y 90 ml/min/1.73m<sup>2</sup> (estadios 2 y 3 de la clasificación de ERC)

### 3.3.2 Criterios de exclusión:

1. Pacientes con hiperfosfatemia, definida como concentración de fósforo superior a 5 mg/dl.
2. Ratio albúmina/creatinina (ratio Alb/Cr) en orina superior a 0.4 mg/mg o ratio proteína/creatinina (ratio Prot/Cr) en orina superior a 1 mg/mg.
3. Pacientes con patología glomerular, tubular o intersticial.

Se seleccionaron 95 pacientes que cumplían dichos criterios y de los cuales se disponía de un seguimiento en consulta de 3 años para poder detectar cambios en la evolución de la función renal.

Los datos basales de edad, género, índice de masa corporal (IMC), perímetro abdominal, presión arterial, enfermedad cardiovascular y medicación se obtuvieron de la historia clínica. Del mismo modo se obtuvieron datos analíticos en sangre (hemograma, creatinina, urea, glucosa, calcio, fósforo, magnesio, albúmina, perfil lipídico, ferritina y proteína C reactiva) y orina (iones, calcio, fósforo, proteína, albúmina y creatinina). A lo largo de las visitas de seguimiento, se controlaron los factores de riesgo cardiovascular: hábitos de vida y medicación para presión arterial, lípidos y glucosa, ajustando tratamiento cuando fue preciso de acuerdo con los valores obtenidos en cada visita.

### 3.3.3 Determinaciones bioquímicas

El hemograma se analizó con el autoanalizador Pentra 120 Retic<sup>®</sup> (ABX, Francia). Los parámetros bioquímicos en sangre y orina (Albúmina sérica, creatinina sérica y urinaria, urea, sodio, potasio, fósforo, albúmina y proteínas urinarias) fueron medidos en el hospital con el autoanalizador Architect c-16000 (Abbott<sup>®</sup>, Chicago, Illinois (EEUU)). El filtrado glomerular se calculó por la fórmula de CKD-EPI (92). La tasa de cambio en el FG (ml/min/1.73m<sup>2</sup> por año) fue calculada con la diferencia entre la última visita y la visita basal. Observando estos cambios en FG durante el tiempo, identificamos dos grupos de pacientes en función de la mediana de descenso del FG que fue de 0.5007 ml/min. De esta manera se define al Grupo I (pacientes progresores) como aquellos en los que el FG disminuye >0.5007 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/año y al Grupo II (pacientes no progresores) donde se incluyeron aquellos pacientes en los que el FG disminuye <0.5007 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/año.

En base a esta distribución se procedió a analizar las características demográficas y clínicas de

los pacientes así como los parámetros bioquímicos en sangre y orina de 24h para valorar si existen diferencias entre ambos grupos. Posteriormente se realizó un análisis de correlación simple, para detectar las variables más influyentes en el cambio de FG; y un análisis de regresión lineal múltiple, usando el cambio en el FG como variable dependiente, para identificar variables que pudieran predecir el cambio en este FG. Finalmente se generó un modelo matemático empleando un análisis de regresión logística para identificar los factores que podrían potencialmente predecir la progresión en el deterioro de la función renal (progresores vs. no progresores).

### **3.4 Modelos experimentales “*in vivo*” (Experimento 6)**

#### **EXPERIMENTO 6: Estudio experimental acerca de la relación entre la elevada fosfaturia y el deterioro de la función renal en ratas sanas y heminefrectomizadas con dieta alta en fósforo.**

En este bloque experimental, se utilizaron modelos animales para valorar el papel de la sobrecarga de fósforo sobre el daño renal. Para ello los animales fueron alimentados o con una dieta baja en fósforo (LP), fósforo 0.2% y calcio 0.6%) o con una dieta con alto contenido de fósforo (HP), fósforo 1.2% y calcio 0.6%). Al finalizar los tratamientos tras 21 días, se realizó eutanasia tal como se explica en el apartado 3.1.

#### **3.4.1 Animales**

Para el desarrollo de los experimentos *in vivo* de este Bloque 2 se han utilizado modelos murinos de ratas Wistar macho manteniéndose las mismas condiciones que las descritas en el apartado 3.1. Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universidad de Córdoba y el IMIBIC.

Se utilizaron 41 ratas (24 heminefrectomizadas y 17 sham) que recibieron dietas con baja o alta concentración de fósforo durante 3 semanas. De esta manera. Los grupos estudiados fueron los siguientes:

- Grupo I (n=9): Sham+ Dieta baja en Fósforo (Sham+LP).
- Grupo II (n=8): Sham+ Dieta alta en Fósforo (Sham+HP).
- Grupo III (n=12): Heminefrectomía + LP (1/2Nx+LP).
- Grupo IV (n=12): Heminefrectomía + HP (1/2Nx+HP).

### **3.4.2 Procedimientos experimentales: Heminefrectomía**

Se realizó nefrectomía izquierda para conseguir ratas heminefrectomizadas (1/2Nx). Las ratas del grupo control se sometieron a intervención simulada para considerarse Sham. El protocolo (anestesia, incisión, ligadura,...) es el mismo que el descrito en el apartado 3.1, con la diferencia de que se elimina el riñón izquierdo por completo en un acto único.

### **3.4.3 Recogida de muestras y determinaciones bioquímicas**

La recogida de muestras de sangre y riñón fue realizada de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.1.1. En este experimento se realizó también un análisis histológico para lo cual se procesaron muestras de tejido renal. De esta manera, tras lavado con solución salina fría, el riñón remanente (izquierdo) fue rápidamente extraído, cortado en finas secciones que se fijaron en paraformaldehído al 4% para análisis histológico. Otras muestras de riñón fueron congeladas en nitrógeno líquido para prevenir deterioro del tejido y a continuación fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis por Western blot y RT-PCR.

### **3.4.4 Western blot**

En los diferentes grupos de animales, los niveles renales de Klotho y p65 (es un fragmento de NF- $\kappa$ B que es un factor de transcripción proinflamatorio) fueron analizados por Western blot. Para ello se utilizó proteína citosólica a partir de homogenados renales tal y como se expuso en los apartados 3.1.2 y 3.1.3.

Para la detección de la proteína  $\alpha$ -klotho se usaron los mismos anticuerpos descritos en la Tabla 3.

Por otro lado, a partir de la fracción nuclear, aislada tal y como se describió en el apartado 3.2.3.2, se procedió al análisis de los niveles de expresión del fragmento p65 de NF- $\kappa$ B de la casa Santa Cruz Biotechnology Inc., a una dilución de 1:200 en TTBS con 5% de leche en polvo. Se incubó a 4°C durante la noche. Como se partía de un lisado de proteína enriquecido con la fracción nuclear se usó un constitutivo que se encontrara en el núcleo. Por ello, la proteína TFIIB fue utilizada como control de carga. El anticuerpo monoclonal usado para detectarlo fue suministrado por la casa Cell Signaling Technology (Inc., Danvers, MA, EE.UU.) a una dilución de 1:1000 en TTBS con 5% de leche en polvo. En la Tabla 5 se recogen los anticuerpos utilizados en el Western blot.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
NF- κB p65 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:200	sc-372
TFIIB (constitutivo)	Cell Signaling Technology	1:1000	4169

**Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el Western blot: NF- κB p65 (C-20) y TFIIB.**

### 3.4.5 Análisis histológico

La evaluación histológica de los riñones se realizó en secciones de tejido de 3 μm fijadas con solución de paraformaldehído al 4% e incluidas en parafina. Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y PAS (tinción de ácido periódico, del inglés, *Periodic Acid Staining*). La calcificación renal y la mineralización se evaluaron mediante tinción de von Kossa. Los protocolos de cada una de las tinciones, realizadas en el Servicio de Anatomía Patológica, se describen a continuación:

#### 3.4.5.1 Tinción Hematoxilina-Eosina

La hematoxilina colorea los núcleos celulares y la eosina, los citoplasmas. En primer lugar se retiró la parafina de los portas tras una incubación en xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se hidrataron en una secuencia descendente de alcoholes: etanol 100% (2 baños), 95%, 70%, agua bidestilada, de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron las muestras durante 20 minutos con Hematoxilina de Harris (MERCK, Madrid, España) a temperatura ambiente y se lavaron en abundante agua del grifo durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se introdujeron 1 segundo en HCl 1N, y se dejaron 1 minuto en una solución Azuleante (MERCK, Madrid, España) a temperatura ambiente. Después se volvieron a lavar con agua del grifo durante 5 minutos y se tiñeron con Eosina (MERCK, Madrid, España) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavaron de nuevo con agua del grifo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se deshidrataron, siguiendo una secuencia ascendente de alcoholes hasta acabar con dos baños de xilol. El montaje de la muestra se realizó añadiendo unas gotas de medio de montaje Eukkit® sobre el corte y colocando un cubre sobre la muestra hasta quedar bien sellado.

#### **3.4.5.2 Tinción tricrómico de Masson**

Esta técnica permite la coloración de fibras colágenas y elásticas, observándose tres colores distintos: azul, correspondiente a tejido conjuntivo y fibroso; rojo relativo a tejido muscular y lila para los núcleos celulares. En primer lugar, las muestras se desparafinaron e hidrataron tal como se realizó en la tinción de hematoxilina-eosina. A continuación, las muestras se tiñeron con una solución de Hematoxilina férrica de Weigert (Sharlau Chemie, Sharlab S.L., Barcelona, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron durante 5 minutos con agua del grifo. Luego se tiñeron con una solución de Fucsina ácida 0.5% (Sharlau Chemie, Sharlab S.L., Barcelona, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, las muestras se lavaron con agua del grifo durante 5 minutos. A continuación, los portos se trataron con una serie de soluciones ácidas durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente; el orden fue el siguiente: ácido fosfomolibdico al 1% (Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, USA), azul de anilina (Sharlau Chemie, Sharlab S.L., Barcelona, España), ácido acético al 1% en agua, y alcohol acético (ácido acético al 1% en alcohol absoluto). Finalmente se llevó a cabo una deshidratación con un baño ascendente de alcoholes y se montaron las muestras con el medio sintético Eukit®.

#### **3.4.5.3 Tinción de ácido periódico o PAS**

Determina la presencia de depósitos de polisacáridos en los tejidos. Se utilizó un kit comercial de la casa Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Las células se fijaron con una solución fijadora durante 1 minuto a temperatura ambiente. Al finalizar, se lavaron con agua bidestilada y se incubaron con una solución que contiene ácido periódico durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron tres veces con agua bidestilada y se tiñeron con el reactivo de Schiff, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, las células se lavaron de nuevo con agua bidestilada durante 5 minutos a temperatura ambiente y se contratiñeron con hematoxilina de Gill durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con abundante agua bidestilada se montaron las muestras con el medio de montaje Eukitt.

#### **3.4.5.4 Tinción de von kossa**

Esta técnica se utiliza para el estudio de la formación de partículas de fosfato cálcico, las cuales tiñe de color negro. En primer lugar las muestras se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se fijaron con tampón formalina (agente reductor), durante 10 minutos, y después se lavaron con agua. Luego se deshidrataron siguiendo una secuencia ascendente de alcoholes: etanol 70%, 95% y 100%, dos veces cada uno. A continuación, las muestras se rehidrataron desde etanol 100%, a 95%, a 80% hasta llegar a agua. Se retiró el agua, se añadió una solución de nitrato de plata al 2% y se expusieron a una fuente de luz de 70W durante 20 minutos. Se lavaron

nuevamente con agua y se añadió tiosulfato de sodio (5%) durante 3 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua y fucsina ácida, y se añadió contratinción de 5 ml de fucsina ácida al 1%, con 95 ml de ácido pícrico y 0.25 ml 12N HCL, durante 5 minutos. Después se lavaron con agua, luego con etanol al 95% dos veces y finalmente con etanol al 100% otras dos veces. Una vez secados los portales se procedió al análisis de las muestras.

#### **3.4.6 Análisis inmunohistoquímico**

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron con un kit de la casa comercial Dako Cytomation (Glostrup, Dinamarca). Las secciones de tejido renal se desparafinaron en xilol, se rehidrataron en etanol y se incubaron a 100 °C en solución de recuperación de antígeno ChemMate™ pH 6.0 (Dako, Barcelona, España) durante 20 min. Tras lavado en PBS, los cortes renales se incubaron durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente se incubaron con anticuerpos de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) de rata (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución 1:100 durante 60 min. Después se lavaron durante 5 minutos en PBS y se incubaron 30 min con un polímero marcado con actividad HRP. Se usó diaminobenzidina durante 5 minutos para producir color marrón en las zonas positivas. Finalmente, las secciones renales se contrastaron con hematoxilina y se montaron en medio Eukitt (Labobam, Navarra, España).

#### **3.4.7 Cuantificación de la actividad Glutathion Peroxidasa en tejido renal.**

Para determinar la actividad de la enzima glutathion peroxidasa (GPx), el tejido renal fue homogeneizado y la proteína renal total se extrajo utilizando un tampón específico basado en Tris-HCl pH 7,5, EDTA 5 mM y DTT 1 mM. A continuación, se utilizaron 20 µg de proteína para determinar la actividad por espectrofotometría con un kit de ensayo GPx (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE. UU). El kit se basa en una sucesión de reacciones acopladas donde la GPx oxida el glutatió genérico generando glutatió oxidado que es reducido por la enzima glutatió reductasa mediante oxidación del NADPH (Nicotiamida-Adenina dinucleótido fosfato) generando de nuevo glutatió reducido. El kit mide el NADPH oxidado que es relativo a la actividad GPx.

Para hacer el ensayo de GPx se usaron 50 mg de riñón de rata que fueron lisados mecánicamente añadiendo nitrógeno líquido. Se rompió con un mortero y el homogenado fue recogido en un eppendorf con 250 µl de tampón frío (Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM y DTT 1mM). El riñón fue homogeneizado con ayuda de un micropistilo y la realización de vórtex cada 30 segundos con incubación en hielo. A continuación se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue recogido en otro tubo conteniendo la fracción proteica en la que se



valorará la actividad GPx. Se cuantificó la proteína por el método Bradford tal como se describió en el apartado 3.1.2.2. Para realizar el ensayo GPx con este kit se usaron 20 µg de proteína por cada reacción diluyendo con tampón Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM, 1 mg/ml BSA y pH 7.6. Además se cargaron por cada reacción: 100 µl de tampón (Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.6), 50 µl de co-sustrato (que contiene glutation liofilizado y la enzima glutation reductasa), 50 µl de NADPH, 20 µl de muestra con 20 µg de proteína y 20 µl de hidroperóxido de cumeno como sustrato. Al añadir el hidroperóxido de cumeno se inicia la reacción y comienza a oxidarse el NADPH a NADP+ y esto produce una disminución de la absorbancia a 340 nm. La absorbancia fue medida durante 5 minutos y se hicieron cálculos para obtener la pendiente. Las muestras con una actividad GPx más alta agotan el sustrato más rápido y la pendiente es mayor. La fórmula para hacer los cálculos fue:

$$\text{Actividad GPx} = (\text{incremento de absorbancia } 340\text{nm}/\text{min})/0.00373 \mu\text{M}^{-1}$$

\*0.00373 es el coeficiente de extinción molar del NADPH a NADP+ ajustado a la superficie del pocillo.

### 3.4.8 Expresión renal del ARNm de $\alpha$ -klotho

El ARN total del tejido renal se extrajo con 1 ml de reactivo Trizol (Sigma-Aldrich CO). Las muestras de ARN aisladas se trataron con DNAsa (Sigma-Aldrich CO) siguiendo las instrucciones del fabricante. La metodología de la extracción de ARN se describe en el apartado 3.1.4.2, la cuantificación de ARN en 3.1.4.3 y el tratamiento con DNAsa en 3.1.4.4. La RT-PCR (descrita en el apartado 3.1.4.5) se realizó con 50 ng de ARN tratado utilizando el kit de un solo paso SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline Reagents Limited, Reino Unido). Los primers para la PCR se sintetizaron con el programa Oligo para  $\alpha$ -klotho (Forward 5'-GAAAATGGCTGGTTTGTCTCG-3' 'Reverse 5'-CCTGATGGCTTTTAAGCTTTC-3') y GAPDH como gen control constitutivo (Forward 5'-AGGGCTGCCTTCTCTTGAC-3' 'Reverse 5'-TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG-3'. La expresión de los genes diana se normalizó a la expresión de GAPDH de acuerdo con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 3.5 Modelos experimentales “*in vitro*” (Experimento 7)

**EXPERIMENTO 7: Estudio *in vitro* acerca del papel del fósforo sobre la generación de estrés oxidativo en células KEK-293.**



Para estudiar los mecanismos involucrados en el deterioro de la función renal a consecuencia de la excesiva fosfaturia se diseñó el siguiente experimento. Las células HEK-293 fueron cultivadas en DMEM en ausencia de FBS y sobre microplacas de poliestireno negro de 96 pocillos. Una vez que las células estaban en una confluencia del 90–95%, se complementaron con fosfato de sodio monobásico y dibásico en proporción 1:2 para obtener concentraciones de 2.6, 3.3 ó 5 mM de fosfato inorgánico.

### **3.5.1 Evaluación del estrés oxidativo**

Después de 24 horas, el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*) fue determinado utilizando las sondas fluorescentes 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCFDA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU) a 25  $\mu$ M, 5-clorometilfluoresceína diacetato (CMFDA, Thermo Fisher Scientific) a 1  $\mu$ M ó dihidrorodamina (DHRH, Thermo Fisher Scientific) a 2,5  $\mu$ M. Las sondas fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, las células fueron lavadas y se midió la fluorescencia con un fluorímetro Tecan F200pro (Tecan Group Ltd, Suiza) a una longitud de onda de excitación / emisión de 485/510 nm.

### **BLOQUE 3: Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo.**

#### **ESTUDIO CLÍNICO 2: Estudio de la relación entre el tipo de ingesta de fósforo en la dieta y la fosfaturia en pacientes con enfermedad renal crónica estadios 2-3.**

##### **3.6 Diseño del Estudio clínico 2**

El objetivo de este estudio fue investigar una posible relación entre la fuente dietética de fósforo (vegetal, animal o inorgánico) y la excreción urinaria de fósforo. Se pretende dilucidar y diferenciar cada fuente de fósforo de la dieta y conocer su relación con la excreción de fósforo en orina. De esta forma, a través del análisis de orina se pretende identificar la fuente de fósforo que se relaciona con una mayor fosfaturia. Es decir, calculando uno o varios parámetros en orina podríamos dilucidar el tipo de dieta que realiza cada paciente y de esta manera, podríamos realizar educación nutricional para preservar y/o mejorar la función renal de los pacientes. La ingesta de los tipos de fuente de fósforo se estimó a través de una encuesta nutricional realizada a cada paciente para recoger la alimentación que ha llevado a cabo durante los 3 días previos a la extracción de sangre y recogida de orina de 24h. Para ello se realizó un estudio transversal de 71 pacientes con síndrome metabólico, ERC estadios 2-3, sin hiperfosfatemia ni albuminuria significativa. Se mantuvo el perfil de pacientes incluidos en el Estudio clínico 1, por lo que los criterios de selección son los mismos que los descritos en los apartados 3.3.1 y 3.3.2, ampliando los criterios de exclusión con: insuficiencia cardiaca congestiva, infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B o C, hepatopatía crónica, enfermedad inflamatoria sistémica o historia previa de cáncer en los últimos años. De igual modo que en el Estudio clínico 1 (apartado 3.3), se recogieron variables demográficas y clínicas. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Reina Sofía y se obtuvo consentimiento informado.

##### **3.6.1 Recogida de muestras y determinaciones bioquímicas**

Se recogieron muestras de sangre y de orina de 24 horas. El mismo día de la visita se extrajo sangre para determinación de hemograma y parámetros bioquímicos. La orina de 24 horas se recogió el día previo a la extracción analítica. La determinación de cada parámetro se realizó como se describe en el apartado 3.3. Los niveles de PTH intacta y de FGF23 c-terminal (cFGF23) fueron cuantificados por ELISA (Immutopic, San Clemente, CA, EE.UU). Los niveles de FGF23 intacto se determinaron con el kit de la casa comercial Kainos Laboratories (Tokyo, Japón).

### **3.6.1.1 Cuantificación de PTH**

Se midió PTH en las muestras de plasma de los pacientes mediante la técnica ELISA (Immutopic, San Diego, CA, EE.UU). Para ello se utilizaron 50 µL tanto de la muestra de plasma como de los estándares y controles del kit. Posteriormente, se añadió a cada uno de los pocillos 50 µL del reactivo de detección A proporcionado por el kit y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta. A continuación, se lavaron los pocillos 3 veces con una solución de lavado y se añadieron 100 µL del reactivo de detección B. Después se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se lavaron los pocillos 5 veces con una solución de lavado y se añadieron 90 µL de la solución sustrato. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 50 µL de la solución de stop. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Biotek PowerWave XS, EE.UU).

### **3.6.1.2 Cuantificación de FGF23 c-terminal**

En las muestras de plasma de los pacientes y se midió cFGF23 mediante la técnica ELISA (Kit de Immotopics, San Diego, CA, EE.UU). Para ello se utilizaron 100 µL tanto de la muestra de plasma como de los estándares y controles del kit. Posteriormente se añadieron 50 µL a cada uno de los pocillos de la placa de una solución conteniendo el anticuerpo de trabajo, consistente en una parte de anticuerpo biotinilado y otra parte de anticuerpo HRP y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 3 horas y en agitación lenta. A continuación, se lavaron los pocillos 5 veces con una solución de lavado y se echaron 150 µL del sustrato HRP del ELISA. Después se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación lenta. La lectura de las muestras se realizó mediante absorbancia con la ayuda de un espectrofotómetro a 620 nm. Inmediatamente después se paró la reacción con la adición de 50 µL de una solución stop y se volvió a leer la absorbancia a 450 nm.

### **3.6.1.3 Cuantificación de FGF23 intacto**

El procedimiento para valorar el iFGF23 fue exactamente el mismo que el indicado en el apartado 3.1.6.

## **3.6.2 Variables de excreción urinaria de fósforo**

Para determinar la excreción de fósforo en orina de 24h se calcularon las siguientes variables:

- **Excreción de fósforo en orina 24 h (Fosfaturia) (mg/día):** calculada multiplicando la concentración de fósforo en orina (mg/dl) por el volumen de orina recogido en 24h (dl).

- **Ratio fósforo/creatinina (ratio P/Cr) (mg/mg):** es el cociente entre la concentración de fósforo y la concentración de creatinina en la orina de 24h. De esta forma, se corrige la excreción de fósforo en función de la creatinina excretada por el paciente, haciendo comparables la excreción de fósforo en orina de hombres y mujeres.

- **Ratio fósforo/urea (ratio P/U) (mg/mg):** es el cociente entre la concentración de fósforo y la concentración de urea en la orina de 24h. Refleja el fósforo excretado relativo a la ingesta proteica.

- **Fracción de excreción de fósforo (FeP) (%):** calculada como

$$\text{FeP} = \left[ \frac{(\text{Creatinina sérica} \times \text{Fósforo urinario})}{(\text{Creatinina urinaria} \times \text{Fósforo sérico})} \right] \times 100.$$

- **Fosfaturia/CKD-EPI:** es el cociente entre la fosfaturia (mg/día), calculada como se explica en la primera variable, y el FG medido como CKD-EPI (ml/min/1.73m<sup>2</sup>); por lo que esta variable indica la excreción de fósforo con respecto a la función renal.

### 3.6.3 Estimación de ingesta

Cada paciente realizó una encuesta dietética donde se recoge la ingesta realizada durante los 3 días previos a la extracción de sangre y a la recogida de orina. El objetivo de dicha encuesta fue estimar la cantidad media diaria de fósforo ingerida por paciente, incluyendo tanto la ingesta de fósforo total como de cada fuente de fósforo. De esta forma, cada alimento se dividió en función de si correspondía a fósforo inorgánico o a fósforo orgánico (y este a su vez, en origen proteico animal o vegetal). Se utilizaron tablas nutricionales (93) para estimar la ingesta media de fósforo por paciente, realizando una equivalencia entre la cantidad ingerida por cada paciente y los valores mostrados por cada 100g de alimento.

El registro dietético es adecuado como método principal de evaluación dietética para una encuesta dietética paneuropea que cumple con los propósitos de la EFSA. La información sobre el consumo de alimentos se registra diariamente, reflejando el consumo por comida y entre comidas (desayuno, mediodía, almuerzo, merienda y cena), lo que permite evaluar la exposición aguda, como ocurre en el caso de la presente tesis. En la práctica no es necesario recoger información de más de 4 días consecutivos (94). La forma utilizada para registrar el consumo en esta tesis fue abierta porque una forma cerrada podría ser menos adecuada debido a que no todos los alimentos consumidos podrían estar en la lista. Las cantidades de alimentos se evalúan utilizando los utensilios que se encuentran comúnmente en los hogares (tipo de plato, recipiente, taza, vaso

etc) e indicando la cantidad consumida de cada producto. Antes de realizar las encuestas dietéticas, los pacientes recibieron información sobre cómo describir adecuadamente los alimentos, las cantidades consumidas, los métodos de cocción, etc para saber cómo completarla correctamente. La encuesta se revisó con el paciente durante la visita clínica con el objetivo de aclarar lo cumplimentado y agregar alimentos y cantidades omitidos.

### 3.7 Estadística

El test de Kolmogorov-Smirnov fue empleado para determinar la distribución normal de los datos. Se consideraron valores estadísticamente significativos si  $p < 0.05$ . El paquete estadístico utilizado ha sido SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, EE UU).

Para los experimentos *in vivo* e *in vitro* del bloque 1 y 2 los valores son expresados como media  $\pm$  desviación estándar. La diferencia entre medias de más de dos grupos fue medida por ANOVA (análisis de varianza) y posteriormente por análisis *post hoc* de Duncan (en Bloque 1) y de Tukey (en Bloque 2). El análisis del rango múltiple (Duncan) prueba las diferencias entre las medias empezando con la media más grande contra la segunda más grande, y así sucesivamente, comparando en cada caso con un valor crítico obtenido por tablas. Es muy eficaz por su poder de discriminación. Y la prueba de Tukey se utiliza en experimentos que implican un número elevado de comparaciones. Se define un solo comparador, resultante del producto del error estándar de la media por el valor tabular en la tabla de Tukey usando como numerador el número de tratamientos y como denominador los grados de libertad del error. La comparación de medias de dos grupos diferentes se realizó con *t de Student's* de datos desapareados.

Para los estudios en pacientes del Bloque 2 los valores son expresados como media  $\pm$  desviación estándar. La comparación de medias de dos grupos diferentes se realizó con *t de Student's* de datos desapareados. Para el cálculo de la tasa de cambio en el FG (ml/min/1.73m<sup>2</sup> por año) se usó el método de mínimos cuadrados. Se hizo análisis de correlación simple (Spearman) para comparar la relación entre la tasa de cambio en el FG y otras variables; y posteriormente, análisis de regresión logística y de regresión múltiple, para identificar variables que pudieran predecir el cambio en el FG.

Finalmente para los estudios realizados en el Bloque 3, los valores fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Las variables categóricas se presentan como porcentaje (%). Para comparar la relación entre las diferentes variables de fosfaturia y otras variables se utilizó análisis de correlación simple (Spearman). Se dividió la variable P/U en terciles para comparar la ingesta de fósforo, la fosfaturia, FGF23 y PTH. La diferencia entre medias de más de dos grupos fue

medida por ANOVA. Los paquetes estadísticos utilizados fueron SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, EE UU) para los cálculos estadísticos y R (R Development Core Team, Vienna, Austria) para la realización de figuras.



# RESULTADOS





## 4. RESULTADOS

### **BLOQUE 1: Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23.**

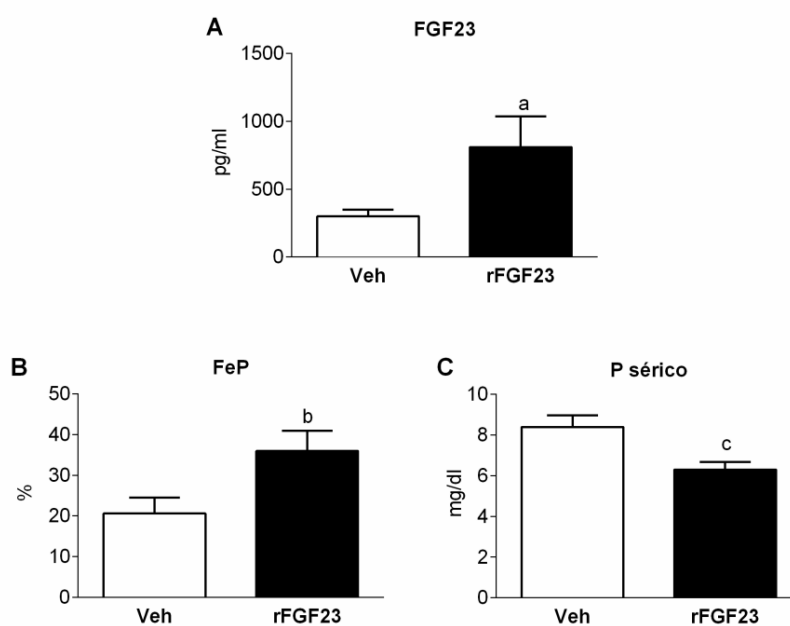
#### **EXPERIMENTO 1: Efecto de la administración de FGF23 recombinante (rFGF23) sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1 en ratas sanas.**

En las ratas adultas con función renal normal alimentadas con dieta con contenido normal en fósforo (0.6%), tras 14 días con o sin alto rFGF23 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre vehículo y rFGF23 respecto a los niveles séricos de creatinina, calcio, PTH y CTR (Tabla 6).

<b>Tratamiento</b>	<b>Creatinina (mg/dl)</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> (mM)</b>	<b>PTH (pg/ml)</b>	<b>CTR (pg/ml)</b>
Vehículo	0.52 ± 0.22	1.24 ± 0.03	52 ± 18.2	215 ± 32
rFGF23	0.48 ± 0.14	1.23 ± 0.03	50 ± 10.9	183 ± 45

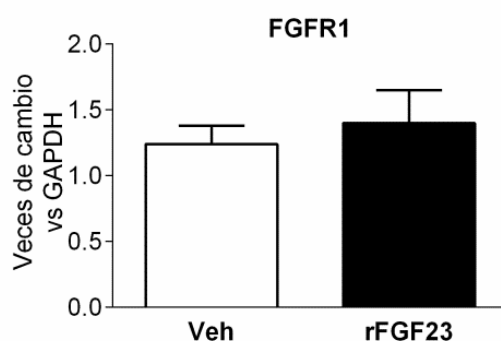
**Tabla 6. Parámetros bioquímicos relacionados con función renal y metabolismo mineral (Experimento 1).** Ca<sup>2+</sup>: calcio iónico; PTH: hormona paratiroidea; CTR: calcitriol.

La infusión continua de rFGF23 a través de la bomba Alzet durante 14 días incrementó la concentración sérica de FGF23 por 3 veces como se muestra en la Figura 1A. La elevación de los niveles séricos de FGF23 (Figura 1A) se asoció con un incremento en la FeP (Figura1B) y con una reducción moderada de la concentración sérica de fósforo (Figura 1C).



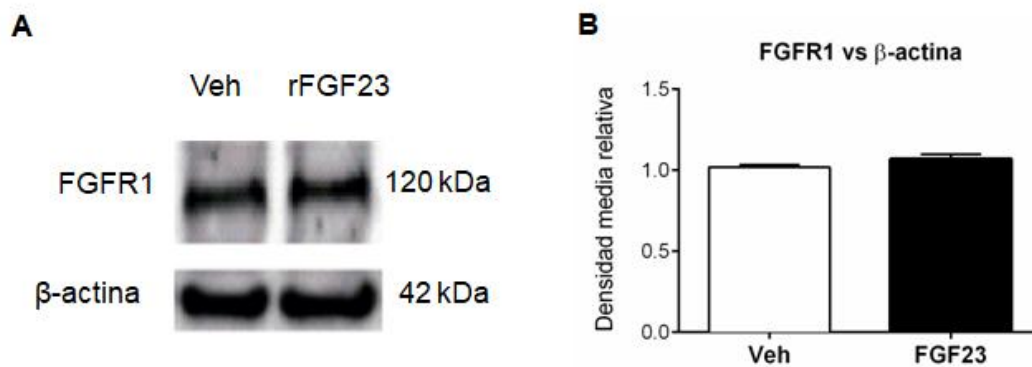
**Figura 1. Niveles séricos de FGF23 (A), FeP (B) y fósforo (C) tras la infusión de rFGF23 o vehículo (Experimento 1).** La imagen es representativa de un grupo de animales en cada grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD (n=6 por grupo). Diferencias significativas entre tratamientos con rFGF23 y vehículo: <sup>a</sup>p<0.001; <sup>b</sup>p<0.05; <sup>c</sup>p<0.01. FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; FeP: Fracción de excreción de fósforo; P: fósforo; Veh: vehículo; rFGF23: FGF23 recombinante.

Respecto a la expresión génica de FGFR1, se encontró que fue similar en las ratas tanto si recibieron vehículo como rFGF23 (Figura 2).



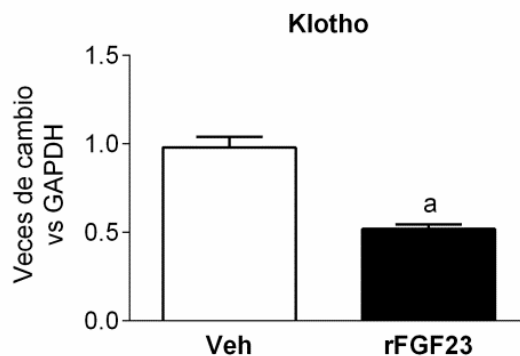
**Figura 2. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de FGFR1 en ratas con función renal normal (Experimento 1).** Expresión renal de FGFR1 a nivel de ARNm. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD (n=6 por grupo). FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; FGFR1: receptor 1 de FGF23; Veh: vehículo; rFGF23: FGF23 recombinante.

A nivel de proteína de FGFR1, tampoco se observaron cambios en ratas al recibir vehículo o rFGF23 (Figura 3).



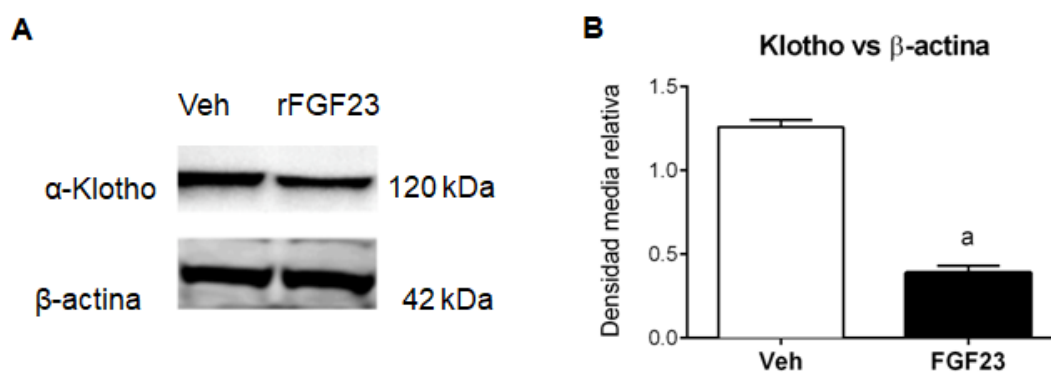
**Figura 3. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de FGFR1 en ratas con función renal normal (Experimento 1).** A) Expresión renal de FGFR1 a nivel de proteína. B) Cuantificación de FGFR1 normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa. La imagen de Western blot corresponde con un pool de muestras de todos los animales del grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD (n=6 por grupo). FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; FGFR1: receptor 1 de FGF23; Veh: vehículo; rFGF23: FGF23 recombinante.

Sin embargo, la administración de rFGF23 se asoció con una reducción significativa de la expresión renal de Klotho (Figura 4).



**Figura 4. Efectos de FGF23 elevado sobre la expresión renal de Klotho en ratas con función renal normal (Experimento 1).** Expresión renal de Klotho a nivel de ARNm. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD (n=6 por grupo). Diferencias significativas entre tratamientos con rFGF23 y vehículo: <sup>a</sup>p<0.001. FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Veh: vehículo; rFGF23: FGF23 recombinante.

A nivel de proteína, también se observaron dichos cambios en la expresión renal de Klotho tras la administración de rFGF23 (Figura 5).



**Figura 5. Efectos de FGF23 elevado sobre la expresión renal de Klotho en ratas con función renal normal (Experimento 1).** A) Expresión renal de Klotho a nivel de proteína. B) Cuantificación de Klotho normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa. La imagen de Western blot corresponde con un pool de muestras de todos los animales del grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD (n=6 por grupo). Diferencias significativas entre tratamientos con rFGF23 y vehículo: <sup>a</sup>p<0.001. FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Veh: vehículo; rFGF23: FGF23 recombinante.

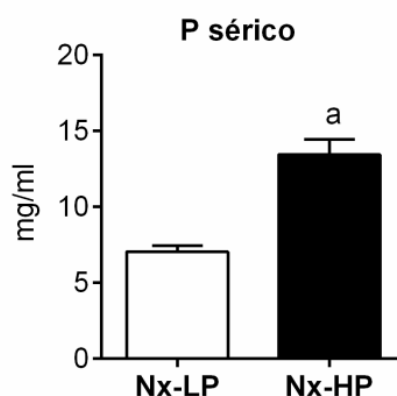
**EXPERIMENTO 2: Efecto de FGF23 elevado, secundario a insuficiencia renal y dieta alta en fósforo, sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1.**

Para realizar este experimento se utilizaron 27 ratas que fueron sometidas a Nx5/6 y que recibían dieta con alto (Nx-HP) o con bajo fósforo (Nx-LP). Como se muestra en la Tabla 7, este modelo de insuficiencia renal presenta mayores cifras de creatinina que las ratas sanas con función renal normal del experimento 1 (Tabla 6), bajo nivel de calcio, altos niveles de PTH y bajos niveles de CTR, sobre todo en las ratas con dieta con alto contenido en fósforo.

Tratamiento	Creatinina (mg/dl)	Ca <sup>2+</sup> (mM)	PTH (pg/ml)	CTR (pg/ml)
Nx-LP	0.91 $\pm$ 0.11	1.22 $\pm$ 0.03	59 $\pm$ 15	193 $\pm$ 26
Nx-HP	1.05 $\pm$ 0.24	1.04 $\pm$ 0.06*	1111 $\pm$ 306*	82 $\pm$ 27*

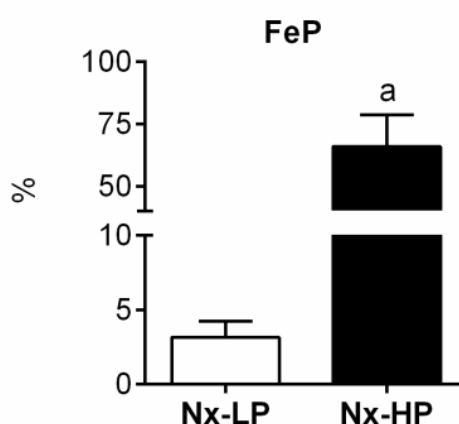
**Tabla 7. Parámetros bioquímicos relacionados con función renal y metabolismo mineral (Experimento 2).** Ca<sup>2+</sup>: calcio iónico; PTH: hormona paratiroidea; CTR: calcitriol. \*p<0.001.

Entre ambos grupos de ratas, otro de los elementos diferenciales fue el nivel de fósforo sérico, como se refleja en la Figura 6.



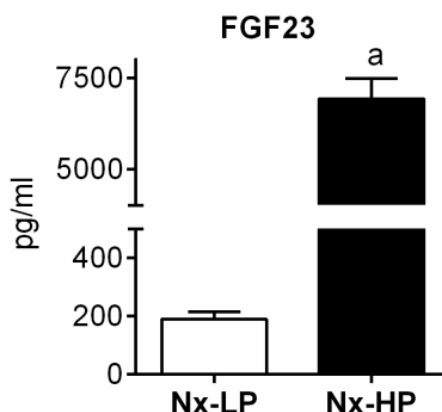
**Figura 6. Niveles séricos de fósforo en ratas urémicas alimentadas con dieta baja en fósforo (Grupo Nx-LP, n=7) o dieta alta en fósforo (Grupo Nx-HP, n=10) (Experimento 2).** Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup>p<0.001. P: fósforo; Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

De igual manera encontramos que al igual que el fósforo sérico, la FeP incrementó más en las ratas Nx-HP que en las Nx-LP (reflejado en Figura 6 y 7 respectivamente).



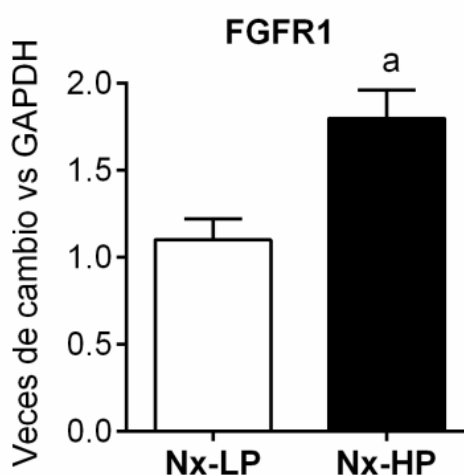
**Figura 7. FeP en ratas urémicas alimentadas con dieta baja en fósforo (Grupo Nx-LP, n=7) o dieta alta en fósforo (Grupo Nx-HP, n=10) (Experimento 2).** Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup>p<0.01. FeP: Fracción de excreción de fósforo; Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

Como muestra la Figura 8, los cambios en el contenido de fósforo de la dieta promovieron diferencias significativas en los valores de FGF23 entre ambos grupos. De esta manera, la concentración sérica de FGF23 fue notablemente más elevada en las ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo (Nx-HP) que en aquellas que recibieron dieta baja en fósforo (Nx-LP) (6932  $\pm$  1688 vs 190  $\pm$  76.1 pg/ml; media +SD).

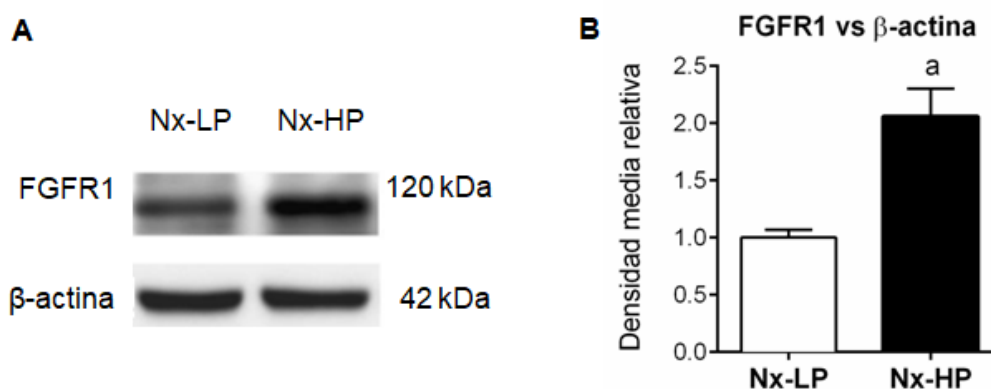


**Figura 8. Niveles séricos de FGF23 en ratas urémicas alimentadas con dieta baja en fósforo (Grupo Nx-LP, n=7) o dieta alta en fósforo (Grupo Nx-HP, n=10) (Experimento 2).** Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup>p<0.001. FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

A continuación, se procedió a evaluar el estado de los receptores de FGF23 (FGFR1 y Klotho) a nivel renal. En el grupo de ratas con dieta alta en fósforo, los niveles elevados de FGF23 se asociaron con un incremento en la expresión de FGFR1 tanto a nivel génico (Figura 9) como proteico (Figura 10).

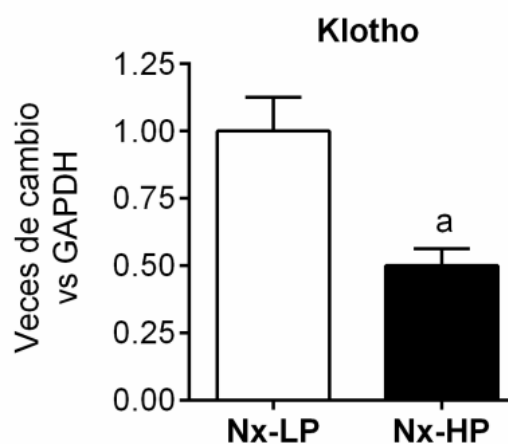


**Figura 9. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de FGFR1 en ratas urémicas (Experimento 2).** Expresión renal de ARNm de FGFR1 en cada grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup>p<0.001. FGFR1: receptor 1 de FGF23; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.



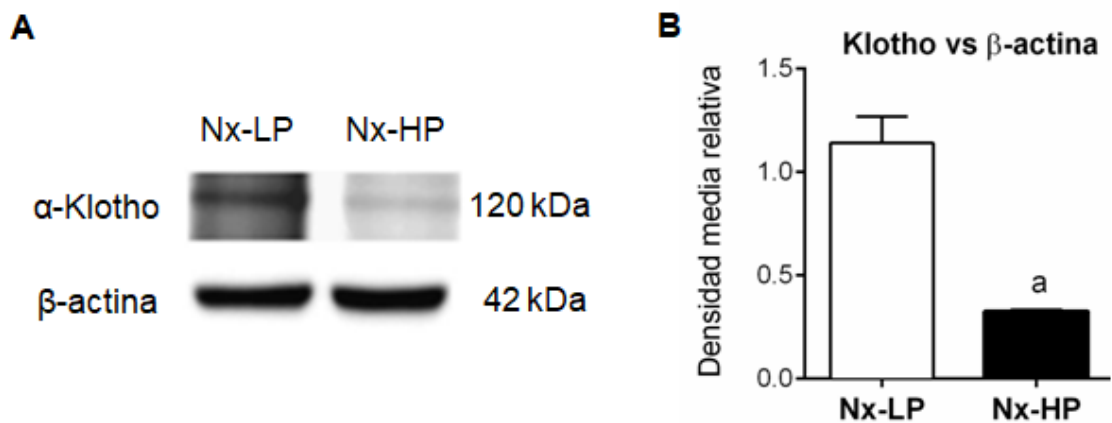
**Figura 10. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de FGFR1 en ratas urémicas (Experimento 2).** A) Expresión renal de proteína de FGFR1 en cada grupo. β-actina se usó como control de carga. B) Cuantificación de FGFR1 normalizado por niveles de β-actina medidos en densidad media relativa. Los valores se expresan como media ± SD. <sup>a</sup>p<0.001. FGFR1: receptor 1 de FGF23; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

Respecto al co-receptor Klotho, encontramos igualmente a nivel de ARNm y de proteína una reducción estadísticamente significativa en sus niveles (Figura 11 y 12 respectivamente).



**Figura 11. Efectos de FGF23 elevado sobre la expresión renal de Klotho en ratas urémicas (Experimento 2).** Expresión renal de ARNm de Klotho en cada grupo. Los valores se expresan como media ± SD. <sup>a</sup>p<0.001. Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

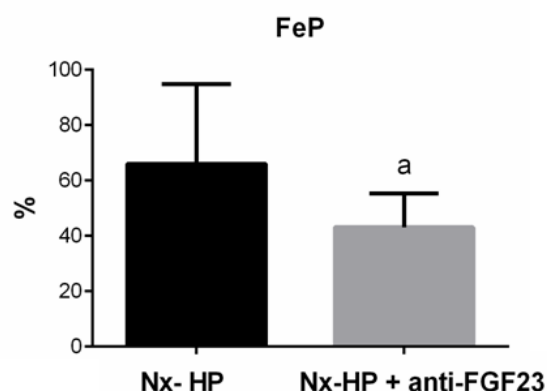




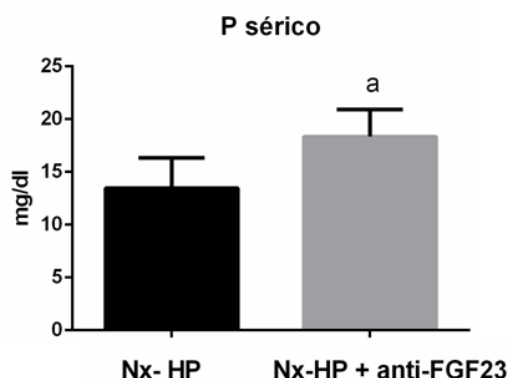
**Figura 12. Efectos de FGF23 elevado sobre la expresión renal de Klotho en ratas urémicas (Experimento 2).** A) Expresión renal de proteína de Klotho en cada grupo. β-actina se usó como control de carga. B) Cuantificación de Klotho normalizado por niveles de β-actina medidos en densidad media relativa. Los valores se expresan como media ± SD. <sup>a</sup>p<0.001. Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

En consecuencia, los altos niveles de FGF23 observados en las ratas Nx-HP producían efectos opuestos sobre FGFR1 y Klotho. Además, el promotor de estos cambios no está identificado, de manera no se puede discernir si el efecto sobre la reducción de Klotho o el incremento de FGFR1 es consecuencia de los elevados niveles de FGF23 o por la sobrecarga de fósforo.

Para dilucidar la relación entre los cambios en la expresión de receptores renales de FGFR1 y Klotho se realizó otro experimento en el que se administró anti-FGF23 a ratas Nx-HP (Nx-HP + anti-FGF23), para así neutralizar el efecto del exceso de FGF23. En estas condiciones, la administración de anti-FGF23 produjo una reducción en la FeP (Figura 13) y además consecuentemente un incremento en los niveles séricos de fósforo (Figura 14).



**Figura 13. FeP en ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo con o sin administración de anti-FGF23 (Experimento 2).** Los valores se expresan como media ± SD. <sup>a</sup>p<0.001. FeP: Fracción de excreción de fósforo; Nx: nefrectomía; HP: Dieta alta en fósforo; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23.



**Figura 14. Niveles séricos de fósforo en ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo con o sin administración de anti-FGF23 (Experimento 2).** Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup> $p < 0.001$ . P: fósforo; Nx: nefrectomía; HP: Dieta alta en fósforo; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23.

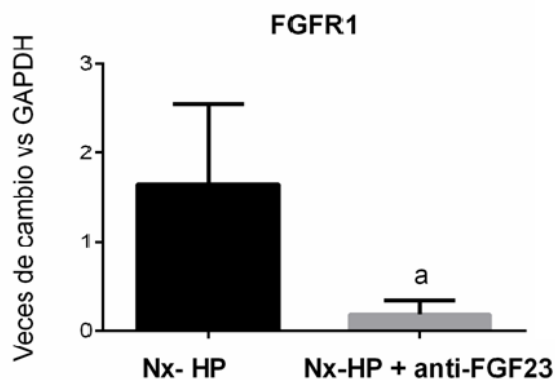
Lamentablemente, los niveles séricos de FGF23 no se pudieron determinar en este grupo de ratas ya que la administración de anti-FGF23 interfiere en la cuantificación de FGF23.

En comparación con las ratas Nx-HP, la administración de anti-FGF23 resultó también en un incremento de las concentraciones séricas de calcitriol y calcio ( $p < 0.001$ ) como se muestra en la Tabla 8. De hecho, los valores de calcio y calcitriol en estas ratas que recibieron anti-FGF23 fueron similares a las ratas alimentadas con dieta pobre en fósforo (Nx-LP). Por otro lado, los valores de creatinina incrementaron significativamente con respecto al grupo Nx-LP ( $p < 0.001$ ).

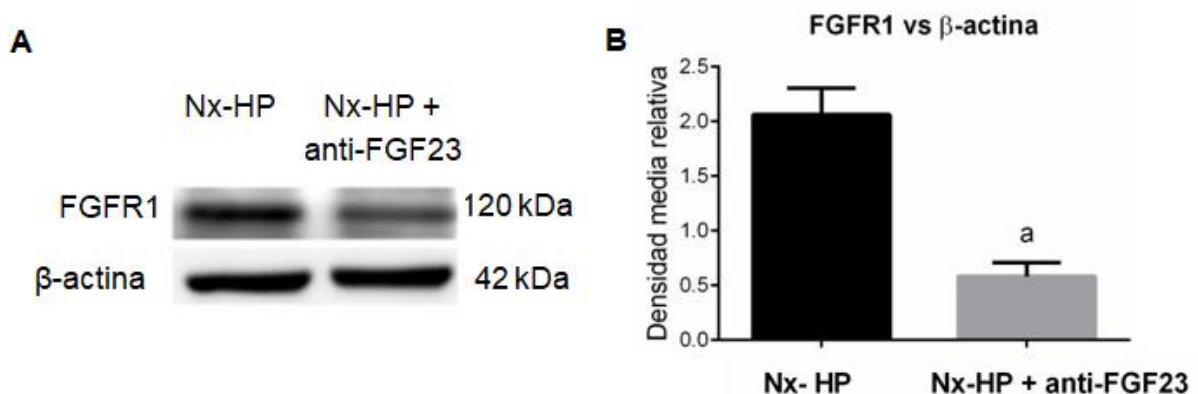
Tratamiento	Creatinina (mg/dl)	Ca <sup>2+</sup> (mM)	PTH (pg/ml)	CTR (pg/ml)
Nx-LP	0.91 $\pm$ 0.11	1.22 $\pm$ 0.03	59 $\pm$ 15	193 $\pm$ 26
Nx-HP	1.05 $\pm$ 0.24	1.04 $\pm$ 0.06*	1111 $\pm$ 306*	82 $\pm$ 27*
Nx-HP +antiFGF23	1.5 $\pm$ 0.6*	1.18 $\pm$ 0.07†	896 $\pm$ 531*	171 $\pm$ 20††

**Tabla 8. Parámetros bioquímicos relacionados con función renal y metabolismo mineral (Experimento 2 completo).** Ca<sup>2+</sup>: calcio iónico; PTH: hormona paratiroidea; CTR: calcitriol. \* $p < 0.001$  vs Nx-LP; †  $p < 0.05$  vs Nx-HP; ††  $p < 0.001$ .

Con respecto a los receptores renales de FGF23, la neutralización de FGF23 por administración de anti-FGF23 redujo la expresión de FGFR1 en un 75%. Los niveles altos de FGF23 produjeron por tanto un aumento renal de FGFR1 tanto a nivel génico (Figura 15) como de proteína (Figura 16).

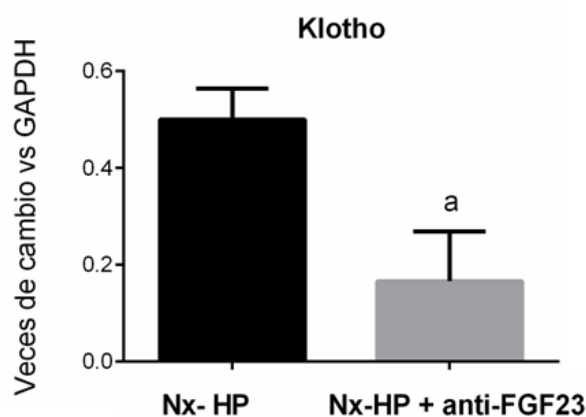


**Figura 15. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de FGFR1 en ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo con o sin administración de anti-FGF23 (Experimento 2).** Expresión renal de ARNm de FGFR1 en cada grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup> $p < 0.001$ . FGFR1: receptor 1 de FGF23; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; HP: Dieta alta en fósforo.

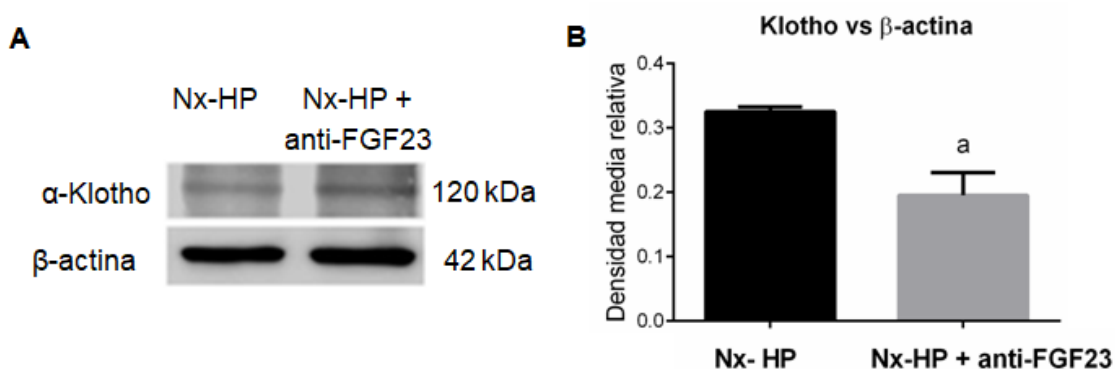


**Figura 16. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de FGFR1 en ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo con o sin administración de anti-FGF23 (Experimento 2).** A) Expresión renal de proteína de FGFR1 en cada grupo.  $\beta$ -actina se usó como control de carga. B) Cuantificación de FGFR1 normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup> $p < 0.001$ . FGFR1: receptor 1 de FGF23; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; HP: Dieta alta en fósforo.

La expresión de Klotho continuó descendida tras la neutralización de FGF23 en las ratas Nx-HP + anti-FGF23 con respecto a las ratas Nx-HP, como se aprecia en las Figuras 17 y 18. Por tanto, no se vincula al FGF23 con el descenso de Klotho, siendo probablemente la sobrecarga de fósforo (elevación de FeP) responsable de la reducción de Klotho a nivel renal.



**Figura 17. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de Klotho en ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo con o sin administración de anti-FGF23 (Experimento 2).** Expresión renal de ARNm de Klotho en cada grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup> $p < 0.01$ . FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; HP: Dieta alta en fósforo.

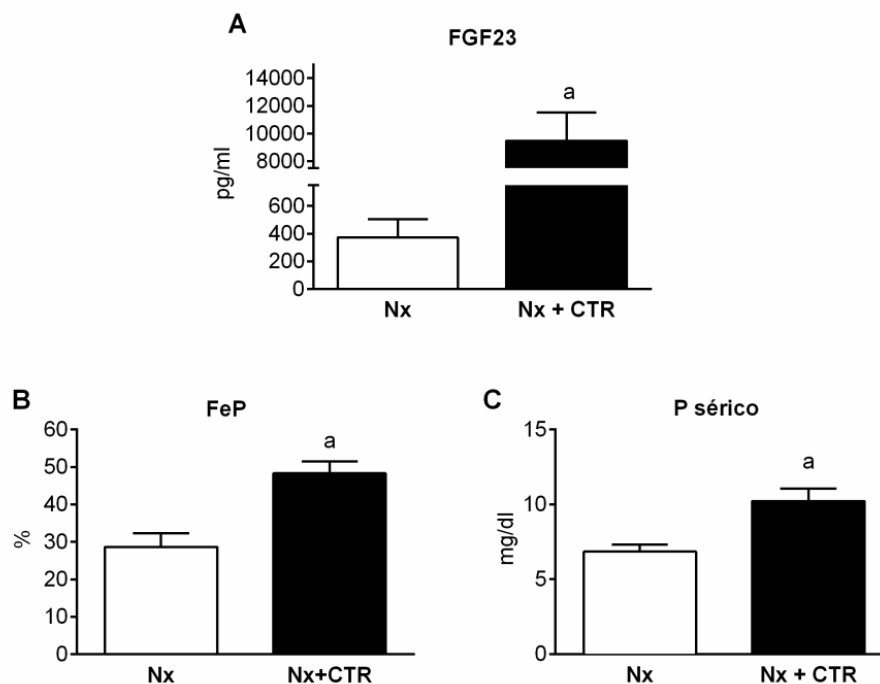


**Figura 18. Efectos de FGF23 elevado en la expresión renal de Klotho en ratas urémicas alimentadas con dieta alta en fósforo con o sin administración de anti-FGF23 (Experimento 2).** A) Expresión renal de proteína de Klotho en cada grupo.  $\beta$ -actina se usó como control de carga. B) Cuantificación de Klotho normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. <sup>a</sup> $p < 0.001$ . FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; HP: Dieta alta en fósforo.

Por tanto, en las ratas urémicas, la elevación de la FeP se asoció con la reducción de Klotho a nivel renal, mientras que los niveles altos de FGF23 produjeron un aumento de FGFR1 a nivel renal. Con los resultados de este experimento, se postula al fósforo por tanto como el elemento que promueve la resistencia a FGF23; sin embargo, son necesarios estudios *in vitro* que reproduzcan este hallazgo y estudien los mecanismos de señalización por los que se desarrolla. Por ello, se plantearon los estudios *in vitro* que se mostraran posteriormente.

**EXPERIMENTO 3: Evaluación *in vivo* del efecto del suplemento con calcitriol sobre la expresión renal de Klotho y FGFR1 en ratas con insuficiencia renal.**

La administración de calcitriol a ratas nefrectomizadas causó un aumento de los niveles séricos de FGF23 y fósforo así como de FeP como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19. Niveles séricos de FGF23 (A), FeP (B) y fósforo (C) en ratas con nefrectomía 5/6 alimentadas con una dieta normal de Ca y P (Ca 0.6%, P 0.6%) (Nx, n=7) o nefrectomizadas que reciben calcitriol (Nx-CTR, n=7) y el mismo tipo de dieta (Experimento 3).** Los valores son expresados como media ± SD. <sup>a</sup>p<0.01. FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; FeP: Fracción de excreción de fósforo; P: fósforo; Nx: nefrectomía; CTR: calcitriol.

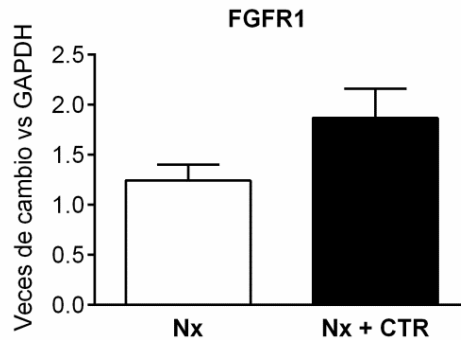
El suplemento con calcitriol también incrementó la concentración sérica de calcio (p<0.01) y redujo los niveles de PTH (p<0.001) como aparece en la Tabla 9.

**Tabla 9.**

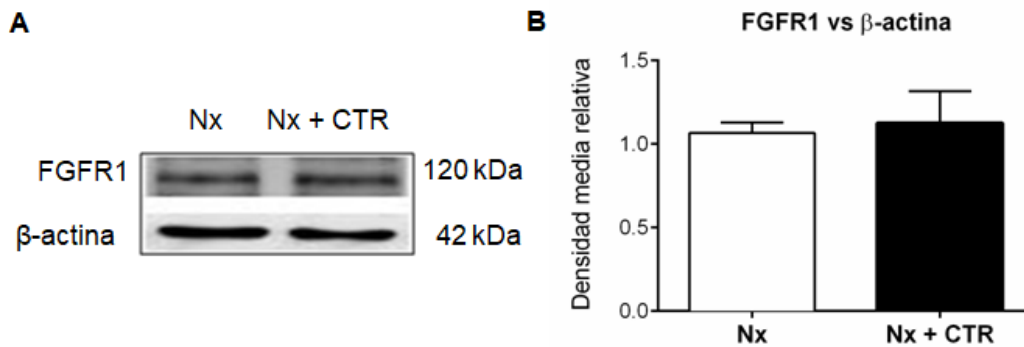
Tratamiento	Creatinina (mg/dl)	Ca <sup>2+</sup> (mM)	PTH (pg/ml)	CTR (pg/ml)
Nx + NP	0.92 ± 0.20	1.19 ± 0.04	181 ± 23†††	173 ± 22
Nx + NP + CTR	1.18 ± 0.29	1.38 ± 0.09††	80 ± 2†††	214 ± 31‡

**Parámetros bioquímicos relacionados con función renal y metabolismo mineral (Experimento 3).** Ca<sup>2+</sup>: calcio iónico; PTH: hormona paratiroidea; CTR: calcitriol; Nx: nefrectomía; NP: Dieta normal en fósforo. ‡ p<0.05; †† p<0.01; ††† p<0.001.

En cuanto a la expresión renal de FGFR1, tal como muestran la Figuras 20 y 21, no se detectó un incremento significativo ni en expresión génica ni en proteína.

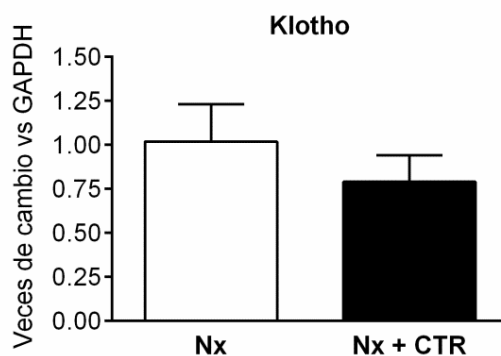


**Figura 20. Efectos de la administración de calcitriol sobre la expresión renal de FGFR1 (Experimento 3).** Expresión renal de ARNm de FGFR1. Los valores son expresados como media  $\pm$  SD. FGFR1: receptor 1 de FGF23; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; CTR: calcitriol.

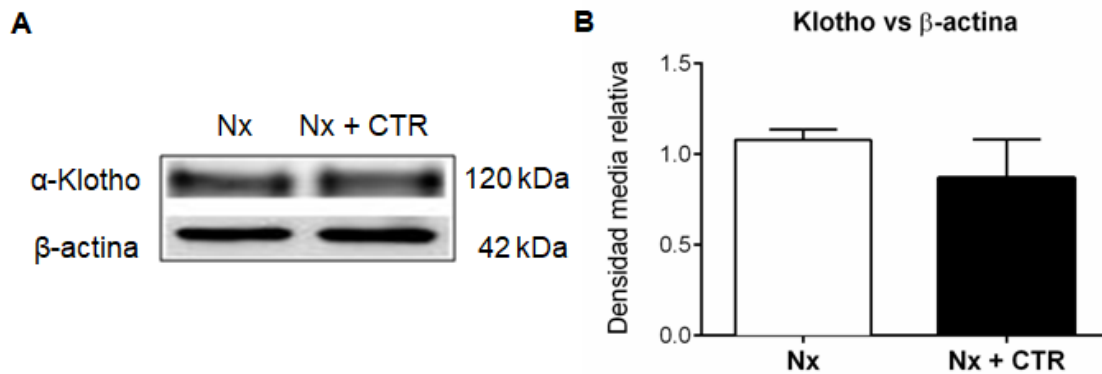


**Figura 21. Efectos de la administración de calcitriol sobre la expresión renal de FGFR1 (Experimento 3).** A) Expresión renal de proteína de FGFR1. B) Cuantificación de FGFR1 normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa. Los valores son expresados como media  $\pm$  SD. FGFR1: receptor 1 de FGF23; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; CTR: calcitriol.

Sin embargo, a pesar del aumento de fósforo sérico y de la FeP, el tratamiento con calcitriol consiguió que la expresión renal de Klotho no descendiera significativamente (Figuras 22 y 23).



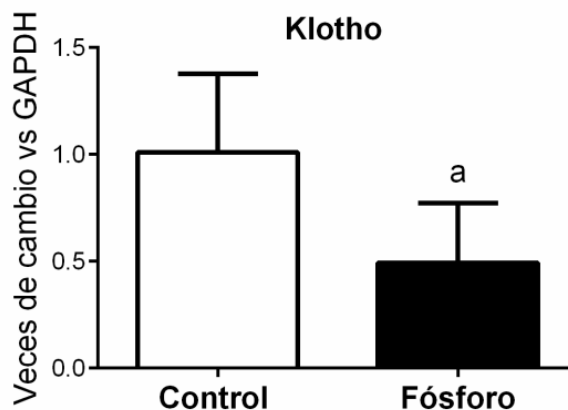
**Figura 22. Efectos de la administración de calcitriol sobre la expresión renal de Klotho (Experimento 3).** Expresión renal de Klotho a nivel de ARNm. Los valores son expresados como media  $\pm$  SD. Nx: nefrectomía; CTR: calcitriol.



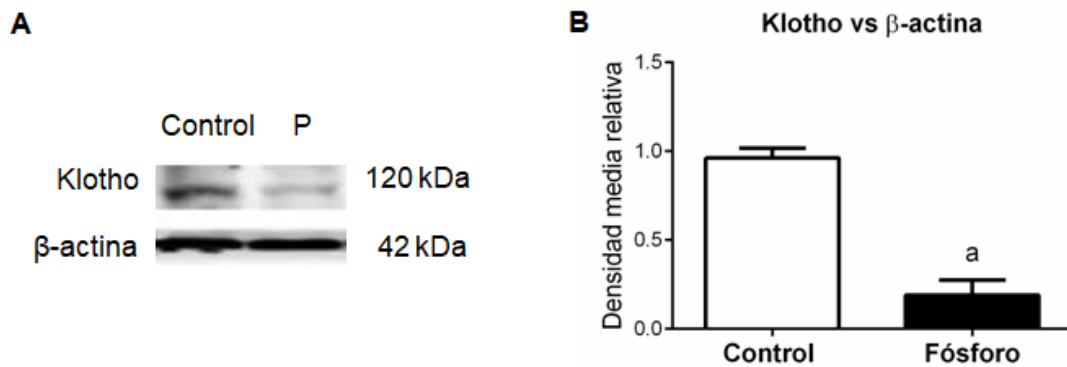
**Figura 23. Efectos de la administración de calcitriol sobre la expresión renal de Klotho (Experimento 3).** A) Expresión renal de Klotho a nivel de de proteína. B) Cuantificación de Klotho normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa. Los valores son expresados como media  $\pm$  SD. Nx: nefrectomía; CTR: calcitriol.

**EXPERIMENTO 4: Efecto *in vitro* del exceso de fósforo sobre la expresión de Klotho en células renales HEK-293: estudio del papel de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina.**

El exceso de fósforo produjo un descenso en la expresión de Klotho en células HEK-293. Este efecto sobre Klotho se observó tanto en la expresión de ARNm como de proteína (Figuras 24 y 25).

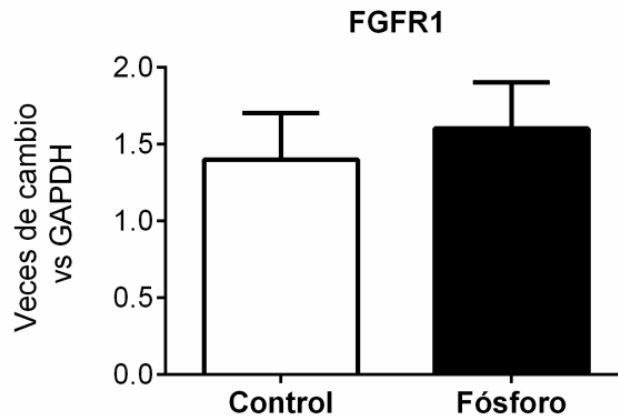


**Figura 24. Relación entre altos niveles de fósforo y Klotho en células HEK-293 (Experimento 4).** Expresión de ARNm de Klotho. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos. <sup>a</sup> $p < 0.001$ .



**Figura 25. Relación entre altos niveles de fósforo y Klotho en células HEK-293 (Experimento 4).** A) Expresión de Western blot de Klotho. B) Cuantificación de Klotho normalizado por niveles de β-actina medidos en densidad media relativa en ImageJ. Los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. Los valores se expresan como media ± SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos. <sup>a</sup>p<0.001. P: fósforo.

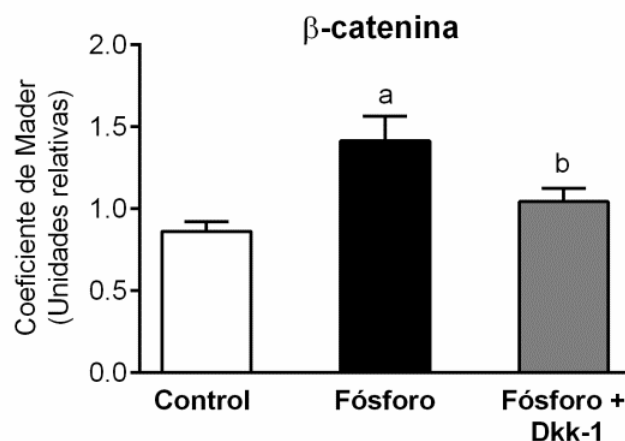
Finalmente, se observó que una concentración elevada de fósforo no modificó la expresión génica de FGFR1 (Figura 26).



**Figura 26. Relación entre altos niveles de fósforo y FGFR1 en células HEK-293. Expresión de ARNm de FGFR1 (Experimento 4).** Los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. Los valores se expresan como media ± SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos.

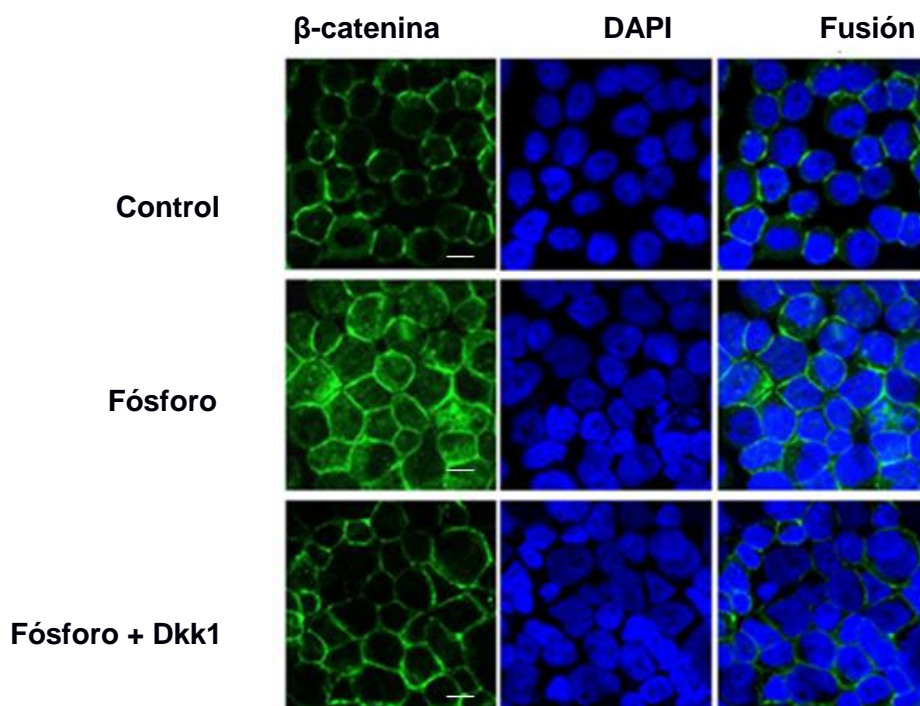
Para estudiar los mecanismos por los cuales el exceso de fósforo disminuye la expresión de Klotho, analizamos la posible intervención de la vía de señalización WNT/β-catenina. En células HEK-293, una concentración elevada de fósforo (3.3 mM) condujo a la translocación nuclear de β-catenina. Esta localización nuclear de β-catenina se cuantificó con el programa de análisis de imágenes ImageJ, que reveló diferencias significativas entre los tratamientos Control vs Fósforo (Figura 27).





**Figura 27. Relación entre altos niveles de fósforo y β-catenina en células HEK-293 (Experimento 4).** La colocalización nuclear se calculó con ImageJ utilizando el coeficiente de Mander que muestra el porcentaje de píxeles verdes que se sobrecarga con píxeles azules. Los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. Los valores se expresan como media ± SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos. <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs control; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs fósforo.

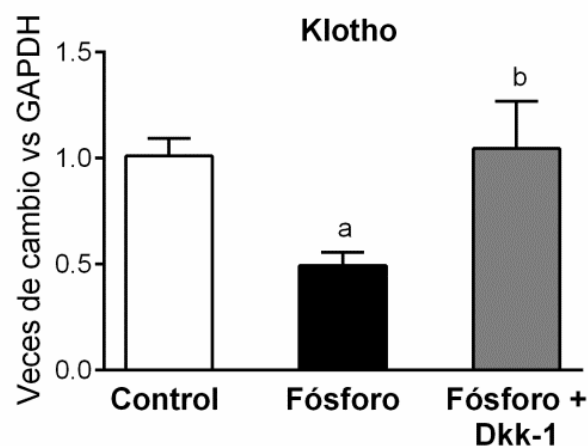
Para comprobar la relación entre la activación de la ruta WNT y el descenso de Klotho se procedió a evaluar el efecto de la adición de Dkk1 recombinante, inhibidor endógeno de la ruta. Los resultados muestran que la adición de Dkk1 inhibió la translocación nuclear de β-catenina inducida por altos niveles de fósforo (Figuras 27 y 28).



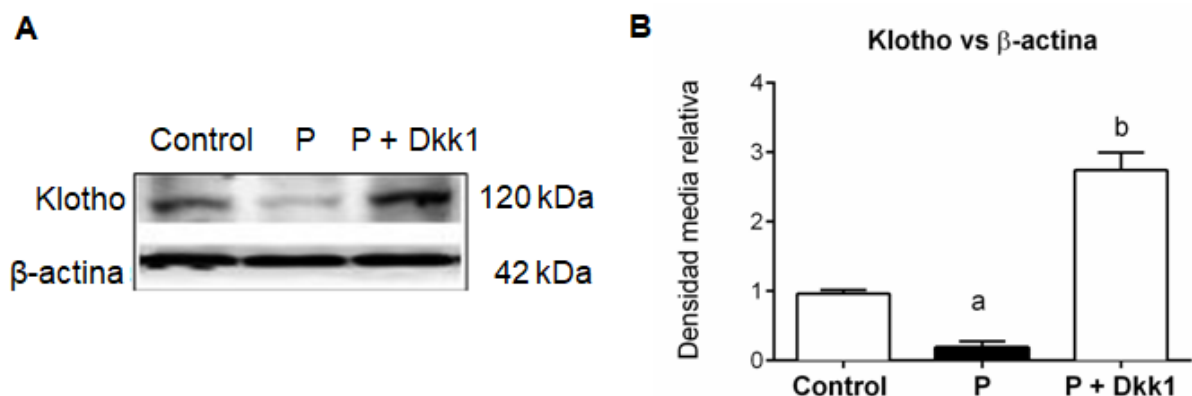
**Figura 28. Relación entre altos niveles de fósforo y β-catenina en células HEK-293 (Experimento 4).** Análisis de translocación nuclear de β-catenina en los 3 grupos de tratamiento:

control, fósforo y fósforo+Dkk1. Se muestran: la  $\beta$ -catenina en verde, la tinción con DAPI en azul para los núcleos y una imagen fusionada de verde y azul. Aumento original, 3400. Escala de barras, 20  $\mu$ m. DAPI: 4'6' diamidino 2 fenilindol.

En estas circunstancias, se comprobó que la inhibición de la ruta por Dkk1 en presencia de fósforo se asoció con la normalización de la expresión de Klotho, tanto en la expresión de ARNm como de proteína (Figuras 29 y 30).

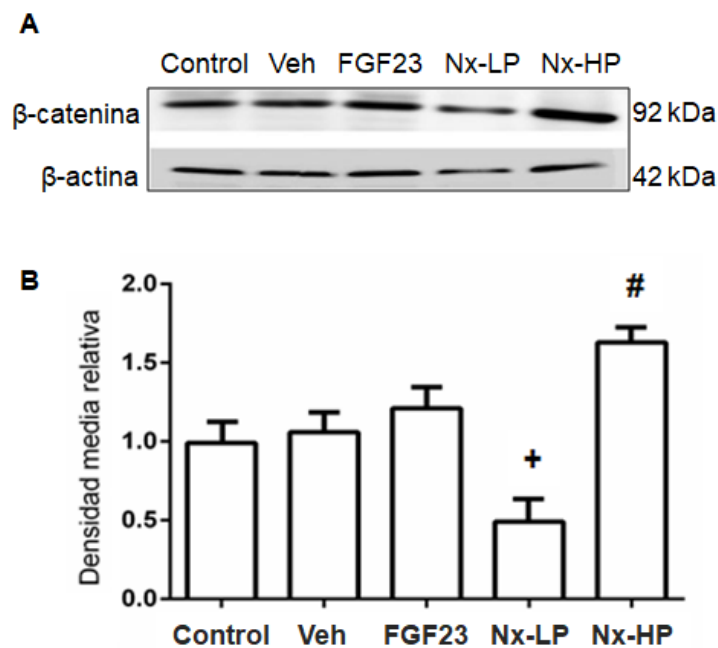


**Figura 29. Relación entre altos niveles de fósforo y Klotho en células HEK-293 inhibiendo la ruta WNT/ $\beta$ -catenina con Dkk1 (Experimento 4).** Expresión de ARNm de Klotho. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos. <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs control; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs fósforo.



**Figura 30. Relación entre altos niveles de fósforo y Klotho en células HEK-293 inhibiendo la ruta WNT/ $\beta$ -catenina con Dkk1 (Experimento 4).** A) Expresión de Western blot de Klotho. B) Cuantificación de Klotho normalizado por niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa en ImageJ. Los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos. <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs control; <sup>b</sup> $p < 0.01$  vs fósforo. P: fósforo.

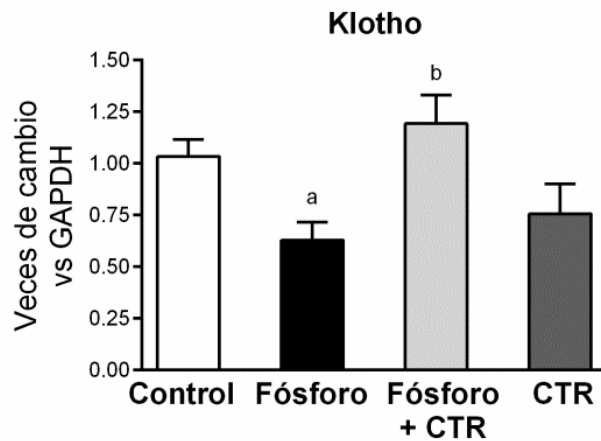
El efecto *in vivo* de fósforo en la expresión nuclear de  $\beta$ -catenina se analizó por Western blot en tejido renal de rata de distintos grupos experimentales. Se observó un incremento de la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina en las ratas nefrectomizadas alimentadas con una dieta rica en fósforo (Nx-HP) (Figura 31).



**Figura 31. Relación entre dieta rica en fósforo y  $\beta$ -catenina en ratas (Experimento 4).** A) Niveles de  $\beta$ -catenina nuclear analizados por Western blot en todos los grupos experimentales. B) Cuantificación de  $\beta$ -catenina nuclear respecto a los niveles de  $\beta$ -actina medidos en densidad media relativa en ImageJ. La imagen es representativa de un grupo de animales de cada grupo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SD. Se usó ANOVA para comparar medias entre grupos.  $^+p < 0.05$  vs todos los grupos;  $^{\#}p < 0.05$  vs Nx-LP. Veh: vehículo; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; Nx: nefrectomía; LP: Dieta baja en fósforo; HP: Dieta alta en fósforo.

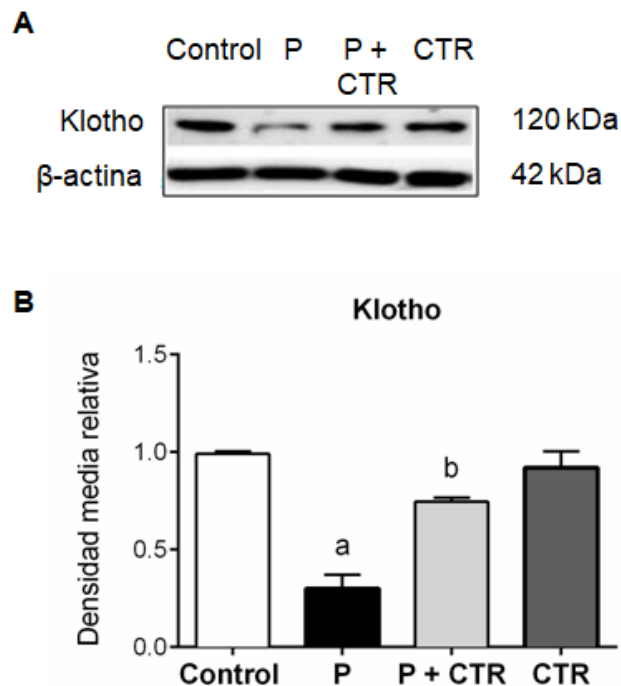
#### **EXPERIMENTO 5: Efecto *in vitro* del suplemento con calcitriol sobre la expresión de Klotho en células HEK-293.**

La suplementación con calcitriol ( $10^{-9}$  M) de las células HEK-293 impidió el descenso de la expresión del ARNm de Klotho inducido por un medio con alto contenido de fósforo. La adición de calcitriol ( $10^{-9}$  M) sólo, en un medio con niveles basales de fósforo, no tuvo efecto sobre la expresión de Klotho en estas células (Figura 32).



**Figura 32. Calcitriol restablece la expresión de Klotho *in vitro* (Experimento 5).** Efecto de CTR ( $10^{-9}$  M) en la expresión de ARNm de Klotho en células HEK-293 cultivadas en medio con alta concentración de fósforo (3.3 mM) durante 5 días. Los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs control; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs fósforo. CTR: calcitriol.

Estos resultados se confirmaron también a nivel de proteína por Western blot (Figura 33).

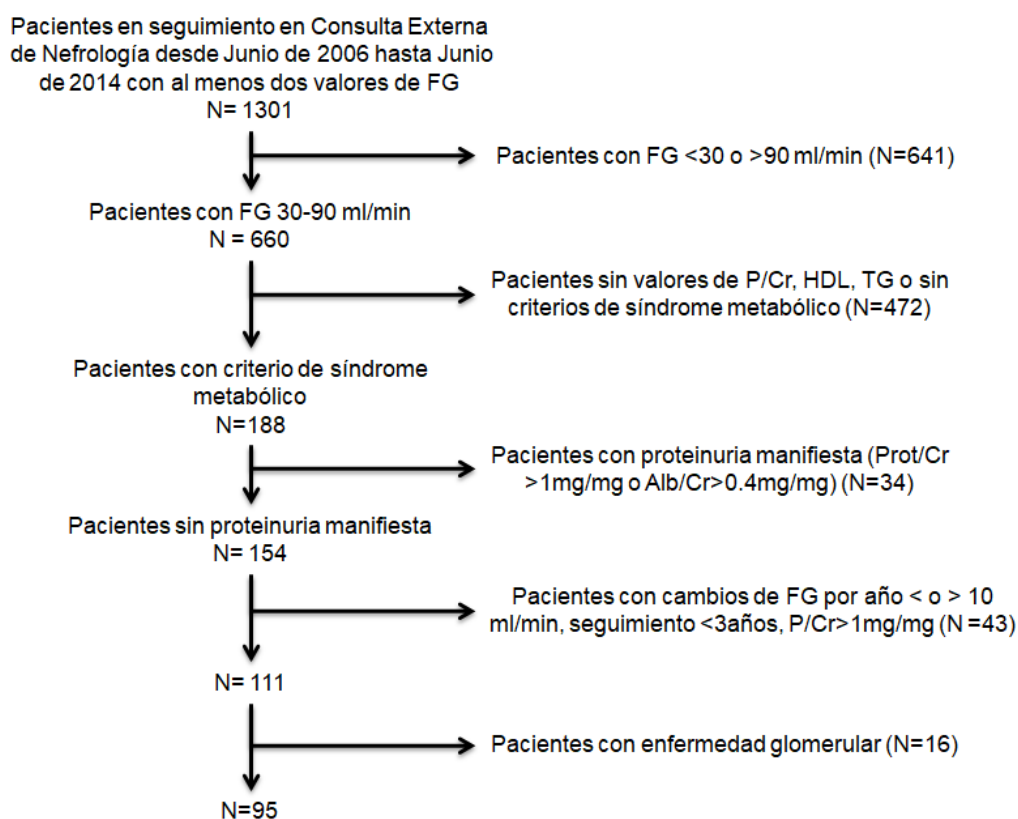


**Figura 33. Calcitriol restablece la expresión proteica de Klotho *in vitro* (Experimento 5).** A) Efecto de CTR ( $10^{-9}$  M) sobre la expresión proteica de Klotho en células HEK-293 cultivadas en medio con alta concentración de fósforo (3.3 mM) durante 5 días. B) Cuantificación medida como densidad media relativa del Western blot de Klotho normalizado por niveles de  $\beta$ -actina con el software ImageJ. Los experimentos *in vitro* se realizaron 3 veces. <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs control; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs fósforo. P: fósforo; CTR: calcitriol.

**BLOQUE 2: Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal.**

**ESTUDIO CLÍNICO 1: Estudio acerca del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal en pacientes con estadios iniciales de enfermedad renal crónica**

Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo al diagrama de flujo representado en la Figura 34, siendo incluidos en el estudio 95 pacientes que cumplían los criterios de selección descritos anteriormente (apartados 3.3.1 y 3.3.2).



**Figura 34. Diagrama de flujo que detalla cómo fueron seleccionados los pacientes (Estudio clínico 1).** FG: Filtrado glomerular; P/Cr: ratio fósforo/creatinina en orina; HDL: del inglés, *High Density Lipoprotein Cholesterol* (Lipoproteína de colesterol de alta densidad); TG: Triglicéridos; Prot/Cr: ratio proteína/creatinina en orina; Alb/Cr: ratio albumina/creatinina en orina.

Los 95 pacientes seleccionados tenían un seguimiento en consulta de 3 años para poder detectar cambios en la evolución de la función renal. La tasa de cambio en el FG (ml/min/1.73m<sup>2</sup> por año) fue calculada con la diferencia entre la última visita y la visita basal. Observando estos cambios en el FG durante el tiempo, identificamos dos grupos de pacientes en función de la mediana de

descenso del FG que fue de 0.5007 ml/min /1.73m<sup>2</sup> por año. Este fue el punto de corte establecido para dividir a los pacientes en progresores (n=47: cuando la tasa de cambio de FG era >0.5007 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/año) y en no progresores (n=48: cuando la tasa de cambio de FG era <0.5007 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/año). Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 10.

	<b>Todos (n=95)</b>	<b>No Prog (n=48)</b>	<b>Prog (n=47)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	63.1 ± 11.5	62.5 ± 11.7	63.7 ± 11.4	0.519
Género: varón	57 (60%)	29 (60.4%)	28 (59.6%)	0.933
Género: mujer	38 (40%)	19 (39.6%)	19 (40.4%)	0.620
Perímetro abdominal (cm)	107.3 ± 9.4	105.4 ± 5.5	109 ± 12.1	0.466
Índice masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	30.5 ± 4	30.5 ± 3.6	30.5 ± 4.4	0.655
PA sistólica (mmHg)	148 ± 23	145 ± 23	152 ± 24	0.200
PA diastólica (mmHg)	85 ± 14	87 ± 15	85 ± 12	0.478
Hipertensión (%)	97.9	97.9	97.9	0.988
Diabetes mellitus tipo2 (%)	40	35.4	44.7	0.357
SAOS (%)	22.1	22.9	21.3	0.847
ICC (%)	9.5	10.4	8.5	0.751
Enf. coronaria (%)	13.7	6.2	21.3	0.033
Arteriopatía periférica (%)	12.6	6.2	19.1	0.580
Enf. cerebrovascular (%)	9.5	10.4	8.5	0.751
IECA (%)	28.4	31.2	25.5	0.537
ARA II (%)	70.5	64.6	76.6	0.199
Diuréticos (%)	65.3	62.5	68.1	0.568
Calcio antagonistas (%)	52.6	45.8	59.6	0.180
Beta-bloqueantes (%)	43.2	47.9	38.3	0.344
Alfa-bloqueantes centrales (%)	33.7	33.3	34	0.942
Otros antihipertensivos (%)	12.6	16.7	8.5	0.232
Hipoglucemiantes orales (%)	25.3	18.8	31.9	0.140
Insulina (%)	17.9	20.8	14.9	0.450
Estatinas (%)	47.4	47.9	46.8	0.914
Fibratos/Omega3 (%)	17.9	16.7	19.1	0.752
Antiplaquetarios (%)	45.3	41.7	48.9	0.477

**Tabla 10. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio clínico 1 (n=95).** Prog: progresores; PA: presión arterial; SAOS: Síndrome de apnea obstructiva del sueño; ICC: insuficiencia cardiaca congestiva; Enf: enfermedad; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAll: antagonistas de los receptores de angiotensina II.

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos, excepto en la presencia de enfermedad coronaria (los pacientes progresores presentaban mayor incidencia: 21.3% vs 6.2%,  $p=0.033$ ); por lo que eran grupos homogéneos. Presentaban similar edad, índice de masa corporal, perímetro abdominal y control de presión arterial. La mayoría de los pacientes precisaba tratamiento antihipertensivo, siendo el tipo de medicación prescrita similar en ambos grupos, fundamentalmente inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARAll) o bloqueadores (calcio antagonistas, beta bloqueantes y alfa bloqueantes). La frecuencia de dislipemia, diabetes y la prescripción de tratamiento antidiabético e hipolipemiente fue similar entre progresores y no progresores.

Los parámetros bioquímicos en sangre y orina se muestran en las Tablas 11 y 12 respectivamente. Como puede observarse en la Tabla 11, los niveles séricos de fósforo se mantuvieron en rango normal en todos los pacientes. No hubo diferencias significativas en ningún otro parámetro bioquímico sanguíneo entre ambos grupos de pacientes.

	<b>Todos (n=95)</b>	<b>No Prog (n=48)</b>	<b>Prog (n=47)</b>	<b>p</b>
Glucosa (mmol/L)	6.7 ± 2.65	6.8 ± 3.34	6.8 ± 1.71	0.164
HbA1c (%)	6.9 ± 1.46	6.9 ± 1.8	6.9 ± 0.96	0.288
Urea (mmol/L)	8.4 ± 3.41	8.3 ± 3.35	8.6 ± 3.5	0.602
Creatinina (µmol/L)	108 ± 35.1	108 ± 35.9	108 ± 34.6	0.979
Sodio (mmol/L)	141 ± 3	141 ± 3.5	141 ± 2.4	0.498
Bicarbonato (mmol/L)	25 ± 4	25 ± 4.1	25 ± 3.4	0.701
Potasio (mmol/L)	4.4 ± 0.64	4.4 ± 0.76	4.3 ± 0.51	0.548
Magnesio (mmol/L)	0.91 ± 0.121	0.92 ± 0.121	0.9 ± 0.122	0.238
Calcio (mmol/L)	2.44 ± 0.09	2.43 ± 0.09	2.45 ± 0.108	0.609
Fósforo (mmol/L)	1.09 ± 0.169	1.1 ± 0.172	1.09 ± 0.166	0.748
Ácido úrico (µmol/L)	377 ± 103	390 ± 94.3	363 ± 110	0.156
Álbumina (g/L)	4.5 ± 0.5	4.6 ± 0.48	4.5 ± 0.43	0.328



Triglicéridos (mmol/L)	2.3 ± 1.37	2.3 ± 1.6	2.3 ± 1.17	0.772
HDL colesterol (mmol/L)	1.1 ± 0.3	1 ± 0.2	1.1 ± 0.38	0.495
LDL colesterol (mmol/L)	3.1 ± 0.87	3.1 ± 0.88	3.02 ± 0.87	0.555
Colesterol total (mmol/L)	5.1 ± 1.01	5.1 ± 1.05	5.06 ± 0.98	0.757
Hemoglobina (mmol/L)	8.5 ± 1.04	8.6 ± 1.02	8.4 ± 1.06	0.285
Ferritina (µg/L)	128 ± 177	147 ± 170	111 ± 183	0.065
Proteína C reactiva (mmol/L)	53 ± 88.6	57 ± 109.4	50 ± 61.5	0.685

**Tabla 11. Parámetros bioquímicos y hemograma en sangre (Estudio clínico 1).** Prog: progresores; HbA1c: hemoglobina glicosilada; HDL: del inglés, *High density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidad); LDL: del inglés, *Low density lipoprotein* (lipoproteína de baja densidad).

En cuanto a los parámetros bioquímicos urinarios, se detectaron diferencias significativas en los valores de fósforo/creatinina y urea/creatinina, siendo más elevados en el grupo de progresores ( $p=0.012$  y  $p=0.025$ , respectivamente) (Tabla 12). La mediana de FGe basal fue similar entre ambos grupos ( $62 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ), pero la tasa de cambio de FGe fue menor en los no progresores que en los progresores ( $2.6 \pm 2.9$  vs.  $-2.8 \pm 2.3 \text{ ml/min/1.73m}^2/\text{año}$ ) como también se observa en la Tabla 12.

	<b>Todos (n=95)</b>	<b>No Prog (n=48)</b>	<b>Prog (n=47)</b>	<b>p</b>
Ratio sodio/Cr (mEq/mg)	1.3 ± 0.7	1.2 ± 0.8	1.3 ± 0.7	0.384
Ratio potasio/Cr (mEq/mg)	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.578
Ratio cloro/Cr (mEq/mg)	1.2 ± 0.7	1.1 ± 0.7	1.3 ± 0.8	0.239
Ratio calcio/Cr (mg/mg)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.342
Ratio proteína/Cr (mg/mg)	0.14 ± 0.12	0.13 ± 0.12	0.14 ± 0.13	0.732
Ratio albúmina/Cr (mg/mg)	0.05 ± 0.08	0.04 ± 0.06	0.07 ± 0.1	0.139
Ratio fósforo/Cr (mg/mg)	0.61 ± 0.18	0.57 ± 0.16	0.66 ± 0.18	0.012
Ratio urea/Cr (mg/mg)	16.8 ± 5.31	15.6 ± 4.74	18 ± 5.63	0.025
FG basal (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	62 ± 19	62 ± 18	62 ± 20	0.988
FG final (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	62 ± 22	68 ± 20	55 ± 22	0.004*
Tasa de cambio de FG por año (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	-0.5007 (-2.2-1.9)	2.6 ± 2.9	-2.8 ± 2.3	0



**Tabla 12. Parámetros bioquímicos en orina y filtrado glomerular (Estudio clínico 1).** Media  $\pm$  SD. \* Diferente debido a la definición de progresor y no progresor. Prog: progresores; FGe Filtrado glomerular estimado; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; Cr: creatinina.

En la Tabla 13 se muestran los resultados del análisis de correlación lineal simple en el que la variable dependiente es la tasa de cambio en el FG y las variables independientes son las variables continuas que presentaban un valor de  $p < 0.2$  al realizar la comparación entre grupos progresores y no progresores (datos correspondientes a variables de las Tablas 10, 11 y 12). La concentración sérica de glucosa, ácido úrico, ferritina, la presión arterial sistólica y los ratios urea/creatinina y albúmina/creatinina en orina no mostraron una correlación significativa. Sin embargo, el descenso del FGe se correlacionó inversamente y de forma significativa con el ratio fósforo/creatinina ( $r = -0.259$ ,  $p = 0.011$ ) sugiriendo que la fosfaturia podría afectar negativamente al FG.

Variable independiente	Coefficiente de correlación	p
Glucosa	-0.110	0.290
Ácido úrico	0.189	0.068
Ferritina	0.140	0.187
PA sistólica	-0.190	0.078
Ratio U/Cr en orina	-0.201	0.051
Ratio Alb/Cr en orina	-0.187	0.070
Ratio P/Cr en orina	-0.259	0.011

**Tabla 13. Análisis de correlación lineal simple (Estudio clínico 1).** Variable dependiente: tasa de cambio en el FGe. Variables independientes: glucosa, ácido úrico, ferritina, PA sistólica, ratio U/Cr en orina, ratio Alb/Cr en orina y ratio P/Cr en orina. FGe: filtrado glomerular estimado; PA: presión arterial; U: urea; Cr: creatinina; Alb: albúmina; P: fósforo.

A continuación se realizó un análisis de regresión lineal múltiple usando el cambio en el FG como variable dependiente y el ratio fósforo/creatinina en orina como variable independiente junto con otras variables que a priori tienen conocido potencial para acelerar el descenso del FG como son: edad, presión arterial sistólica, lipoproteína de baja densidad (LDL), ácido úrico, ratio albúmina/creatinina, IECA-ARAI, niveles de glucosa sérica, FG basal y enfermedad cardíaca isquémica. Los resultados de este análisis estadístico se muestran en la Tabla 14A, encontrando

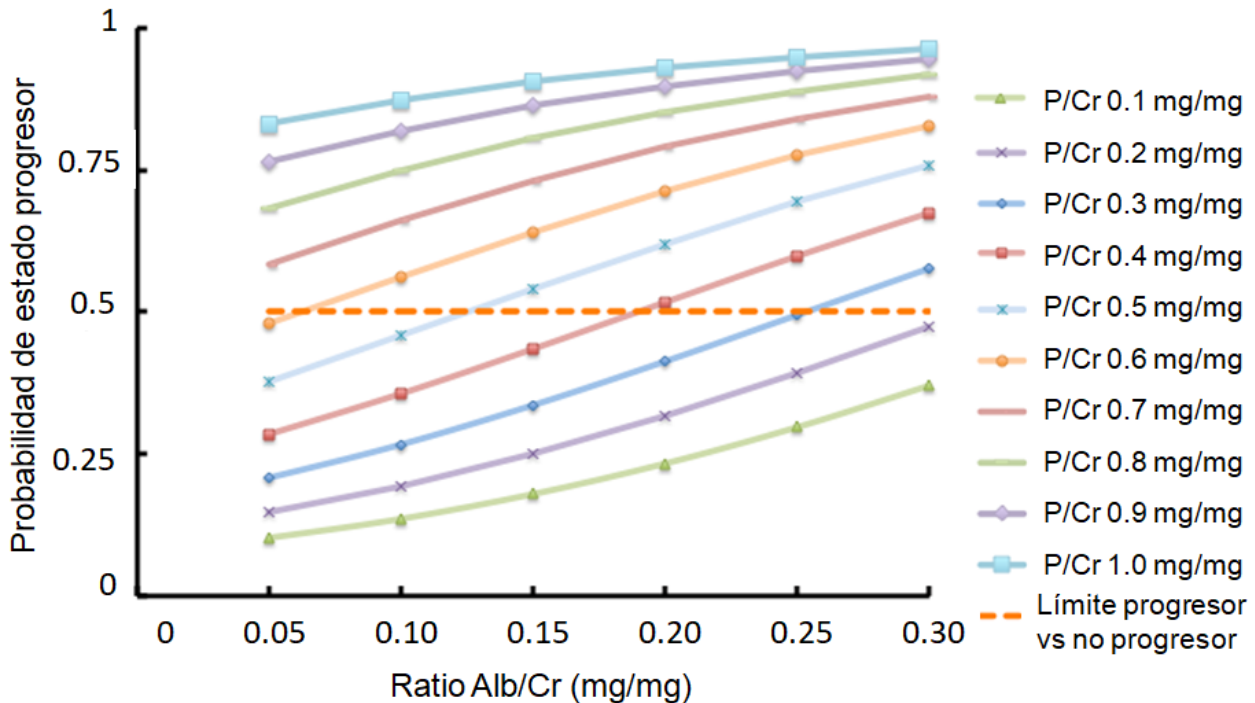
que las variables independientes que tienen un efecto significativo sobre el cambio del FG son el ratio fósforo/creatinina ( $p=0.004$ ), la presión arterial sistólica ( $p=0.01$ ) y el FG basal ( $p=0.011$ ). Finalmente se generó un modelo matemático, que incluía las mismas variables que en el análisis de regresión múltiple, empleando un análisis de regresión logística para identificar los factores que podrían potencialmente predecir la progresión en el deterioro de la función renal (progresores vs. no progresores). Este estudio identificó que únicamente los ratios fósforo/creatinina y albúmina/creatinina fueron significativamente predictores del cambio del FG ( $p=0.003$  y  $p=0.033$  respectivamente) (Tabla 14B).

<b>A) REGRESIÓN LINEAR MÚLTIPLE</b>				
<b>Variable independiente</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>ES</b>	<b>p</b>	
Constante	68	2.7	0.016	
Ratio P/Cr (mg/mg)	-6.3	2.1	0.004	
PA sistólica (mmHg)	-0.04	0.02	0.01	
FG basal (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	0.05	0.02	0.011	
<b>B) REGRESIÓN LOGÍSTICA</b>				
<b>Variable independiente</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>ES</b>	<b>p</b>	<b>OR ExpB</b>
Constante	-2.93	0.96	0.002	0.053
Ratio P/Cr (mg/mg)	4.197	1.4	0.003	66.45
Ratio Alb/Cr (mg/mg)	6.6	3.1	0.033	735.04

**Tabla 14. A) Regresión lineal múltiple.** Variable dependiente: tasa de cambio en el FG. Variables independientes: edad, ratio P/Cr, PA sistólica, lipoproteína de baja densidad, ácido úrico, ratio Alb/Cr, IECA-ARAI, niveles de glucosa sérica, FG basal y enfermedad cardíaca isquémica. **B) Regresión logística.** Variable dependiente: estado progresor. Variables independientes: edad, ratio P/Cr, PA sistólica, lipoproteína de baja densidad, ácido úrico, ratio Alb/Cr, IECA-ARAI, niveles de glucosa sérica, FG basal y enfermedad cardíaca isquémica. ES: error estándar; OR: Odds ratio; P: fósforo; Cr: creatinina; PA: presión arterial; FG: filtrado glomerular; Alb: albúmina; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II. **(Estudio clínico 1).**

La predicción del estado progresor en función de la excreción urinaria de fósforo y albúmina se refleja en la Figura 35. Las curvas son generadas por el modelo matemático derivado del análisis de regresión logística presentado en la Tabla 14B. Como se muestra en dicha ilustración, cada

estrato de ratio fósforo/creatinina se asocia con mayor tasa de progresión renal. De igual forma, a mayor ratio albúmina/creatinina se produce mayor incremento de la tasa de deterioro de función renal en cada estrato de fósforo/creatinina.



**Figura 35. Predicción de estado progresor en función del ratio albúmina/creatinina (Alb/Cr) y fósforo/creatinina (P/Cr) (mg/mg) (Estudio clínico 1).**  $P = 1 / (1 + \text{EXP}(2.093 - 4.197 \times \text{P/Cr} - 6.6 \times \text{Alb/Cr}))$ .

**EXPERIMENTO 6: Estudio experimental acerca de la relación entre la elevada fosfaturia y el deterioro de la función renal en ratas sanas y heminefrectomizadas con dieta alta en fósforo.**

Para estudiar los potenciales mecanismos involucrados en los resultados clínicos, se realizaron varios estudios en ratas y en células renales. En este bloque experimental, se utilizaron modelos animales para valorar el papel de la sobrecarga de fósforo sobre el daño renal. Para ello se utilizaron 41 ratas (24 heminefrectomizadas y 17 sham) que recibieron dietas con baja o alta concentración de fósforo dividiéndose por tanto en 4 grupos: Grupo I (n=9): Sham+LP; Grupo II (n=8): Sham+HP; Grupo III (n=12): 1/2Nx+LP; y Grupo IV (n=12): 1/2Nx+HP.

### Experimentos en Ratas: Resultados bioquímicos

Los parámetros bioquímicos en plasma y orina de las ratas sanas y heminefrectomizadas tanto con dieta baja (0.2%) como con dieta alta (1.2%) en fósforo se muestran en la Tabla 15.

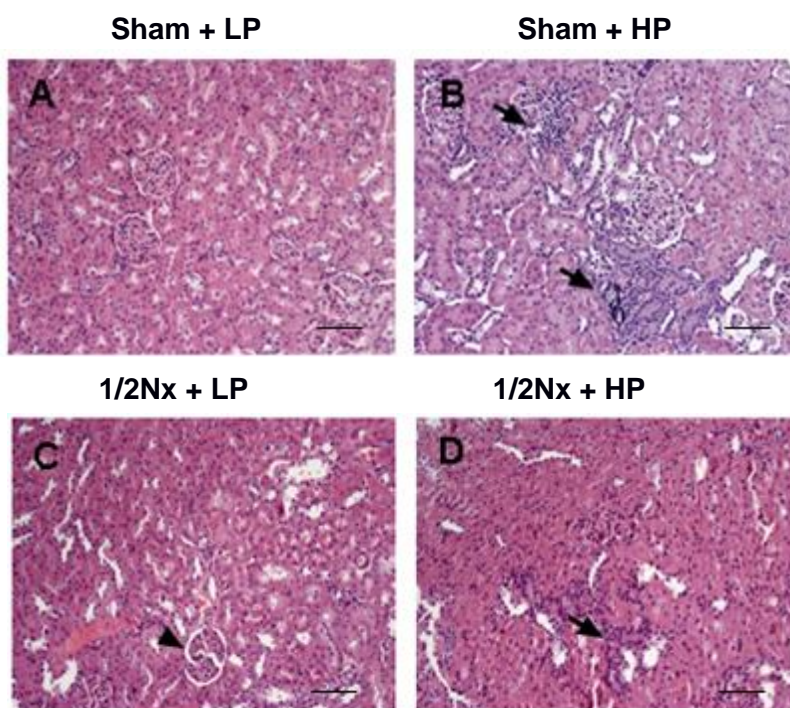
	Sham+LP	Sham+HP	1/2Nx+LP	1/2Nx+HP
P (mmol/L)	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.11	2.0 ± 0.13	2.1 ± 0.19
Ca <sup>2+</sup> (mM)	1.3 ± 0.02	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.02
Cr (μmol/L)	44.2 ± 2.65	44.2 ± 0.88	61.8 ± 0.88 <sup>ab</sup>	61.8 ± 1.76 <sup>ab</sup>
FeP (%)	0.4 ± 0.01	32.1 ± 7.49 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.08 <sup>b</sup>	50.2 ± 7.03 <sup>ac</sup>
PTH (pg/ml)	21.9 ± 0.20	72.1 ± 7.66 <sup>a</sup>	34.8 ± 4.26	65.9 ± 10.5 <sup>ac</sup>
FGF23 (pg/ml)	130 ± 33.9	272 ± 24.0 <sup>a</sup>	119 ± 11.0 <sup>b</sup>	454 ± 49.8 <sup>abc</sup>

**Tabla 15. Parámetros bioquímicos en plasma y orina de las ratas (Experimento 6).** <sup>a</sup>p<0.05 vs Sham+LP; <sup>b</sup>p<0.05 vs Sham+HP; <sup>c</sup>p<0.05 vs 1/2 Nx+LP. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); Nx: nefrectomía; P: fósforo; Ca<sup>2+</sup>: Calcio iónico; Cr: creatinina; FeP: fracción de excreción de fósforo; PTH: hormona paratiroidea; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23.

A pesar de la diferencia del contenido de fósforo en las dietas y de la presencia de heminefrectomía en algunos grupos de ratas, no hubo diferencias significativas en los niveles de fósforo y calcio iónico en plasma de ninguno de los cuatro grupos de ratas. La creatinina fue moderadamente mayor en las ratas heminefrectomizadas aunque los niveles obtenidos no alcanzaron valores excesivamente altos. La dieta alta en fósforo correspondió con un incremento en la FeP tanto en ratas sanas como heminefrectomizadas. Los niveles de PTH intacta incrementaron en las ratas con mayor contenido de fósforo en la dieta, sin embargo, sus valores igualmente tampoco fueron excesivamente elevados. Los niveles de FGF23 (iFGF23) si incrementaron en un mayor rango en aquellas ratas heminefrectomizadas o no que recibieron una dieta alta en fósforo.

## Experimentos en Ratas: Resultados del análisis histológico

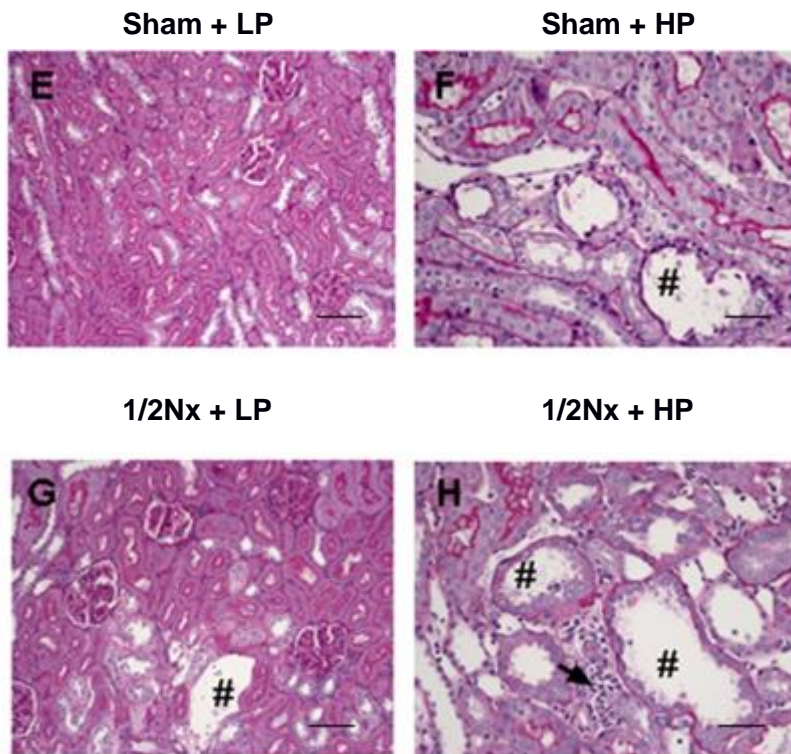
La evaluación anatomopatológica de las muestras renales mostró diferencias entre ratas sanas y ratas heminefrectomizadas; y dentro de cada grupo de ratas, además se evidenció afectación asociada a la mayor ingesta de fósforo en la dieta. El análisis histológico del tejido renal de las ratas sanas con dieta alta en fósforo (Sham-HP) reveló lesiones tubulares renales e incremento de la celularidad intersticial. Estas anomalías no se encontraron en el tejido renal de las ratas sanas con dieta baja en fósforo (Sham-LP). Los cortes histológicos de ratas heminefrectomizadas con dieta baja en fósforo presentaron lobulación de los glomérulos con hiper celularidad mesangial moderada. Sin embargo, en las ratas heminefrectomizadas con dieta alta en fósforo se observó mayor severidad de lesiones tubulares renales e hiper celularidad intersticial como se aprecia en la Figura 36.



**Figura 36. Elevada fosfaturia promueve daño renal: Tinción Hematoxilina-Eosina (Experimento 6).** Las muestras renales de los grupos de ratas (Sham+LP, Sham+HP, 1/2Nx+LP y 1/2Nx+HP) fueron analizados con tinción de hematoxilina-eosina (A-D). Las flechas indican la reacción inflamatoria y la hiper celularidad y las cabezas de flechas, lobulación glomerular. Aumento: x100, Escala: 50µm. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo).

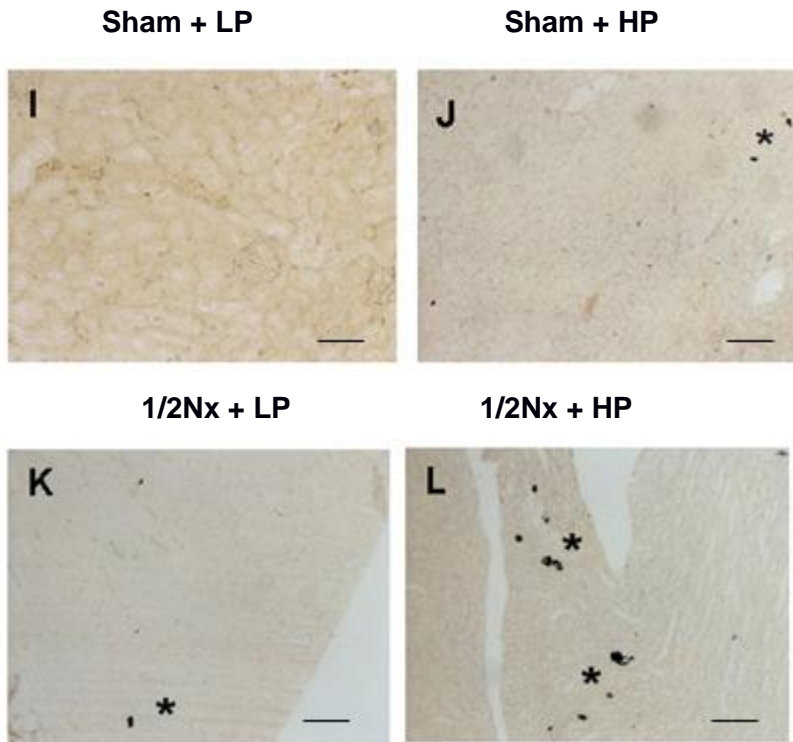


Además, en los grupos con elevada ingesta de fósforo, hubo pérdida de la integridad de la membrana del borde en cepillo e incluso necrosis de las células tubulares proximales presentando menos células epiteliales (tinción PAS) y cuerpos apoptóticos en la luz tubular. En las ratas heminefrectomizadas con dieta rica en fósforo fueron más prominentes la toxicidad de las células tubulares, la reacción inflamatoria y la hiper celularidad (Figura 37).



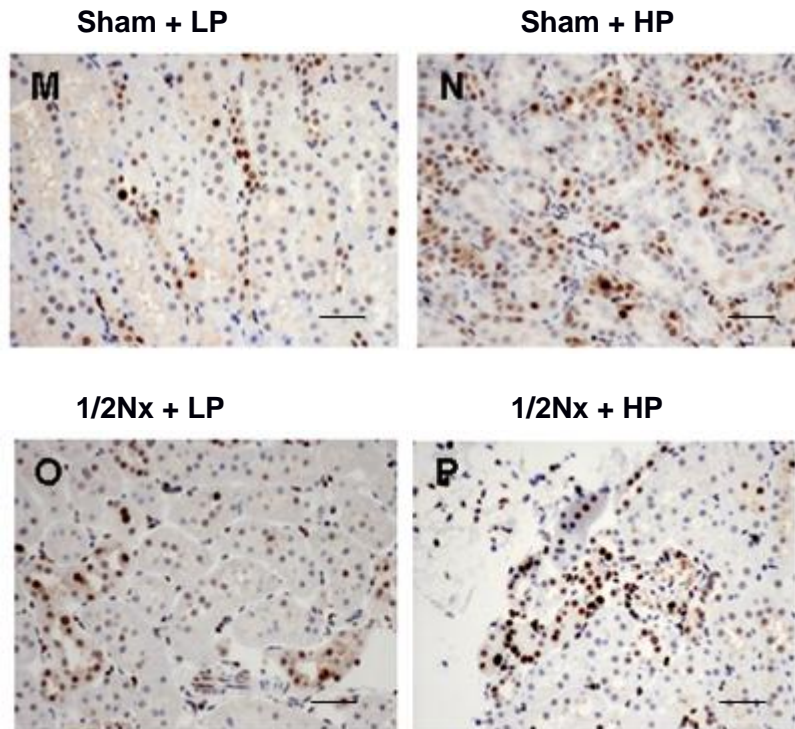
**Figura 37. Elevada fosfatúria promueve daño renal: Tinción PAS (Experimento 6).** Las muestras renales de los grupos de ratas (Sham+LP, Sham+HP, 1/2Nx+LP y 1/2Nx+HP) fueron analizados con tinción PAS (E-H). #: necrosis tubular aguda. Las flechas indican la reacción inflamatoria y la hiper celularidad y las cabezas de flechas, lobulación glomerular. Aumento: x100, Escala: 50µm. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); PAS: del inglés, *periodic acid staining* (tinción de ácido periódico).

La tinción de von kossa reveló la presencia de varios focos de nefrocalcinosis en las ratas con dieta alta en fósforo, siendo más evidente en las ratas heminefrectomizadas que en las ratas sanas (Figura 38).



**Figura 38. Elevada fosfaturia promueve daño renal: Tinción von Kossa (Experimento 6).** Las muestras renales de los grupos de ratas (Sham+LP, Sham+HP, 1/2Nx+LP y 1/2Nx+HP) fueron analizados con tinción de von Kossa (I-L). \*: presencia de depósitos de fósforo. Aumento: x100, Escala: 50µm. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo).

La tinción inmunohistoquímica PCNA reflejó mayor proliferación de células tubulares en un intento de reemplazar las células dañadas (Figura 39). Mientras que las ratas sanas con dieta alta en fósforo (Sham-HP) mostraron un aumento significativo de la proliferación celular con el PCNA, las ratas heminefrectomizadas con elevada ingesta de fósforo (1/2Nx -HP) presentaron un incremento paralelo más evidente del infiltrado inflamatorio con la tinción Hematoxilina-eosina (como se refleja en la Figura 36).

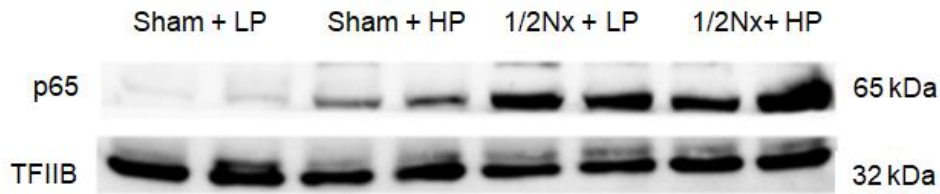


**Figura 39. Elevada fosfaturia promueve daño renal: Tinción PCNA (Experimento 6).** Las muestras renales de los grupos de ratas (Sham+LP, Sham+HP, 1/2Nx+LP y 1/2Nx+HP) fueron analizados con inmunohistoquímica para PCNA (M-P). Aumento: x100, Escala: 50 $\mu$ m. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación.

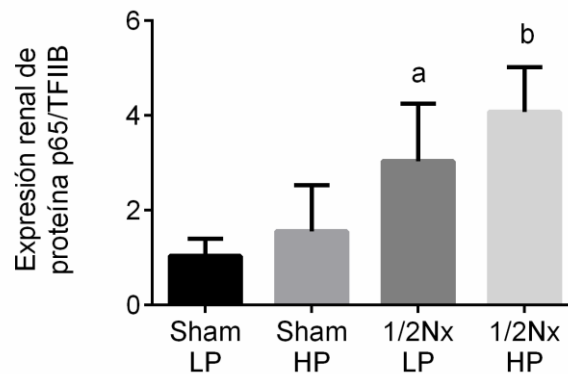
### Experimentos en Ratas: Resultados de la expresión renal de Klotho y p65

En el riñón de ratas con dieta alta en fósforo, y con el consiguiente aumento de la fosfaturia, se observó una tendencia a aumentar la expresión nuclear de p65, que es un fragmento inducible de NF- $\kappa$ B como se observa en la Figura 40. Estas diferencias fueron más significativas en ratas heminefrectomizadas en comparación con las ratas sanas (Figura 41). Es decir, la sobrecarga de fósforo promueve inflamación.



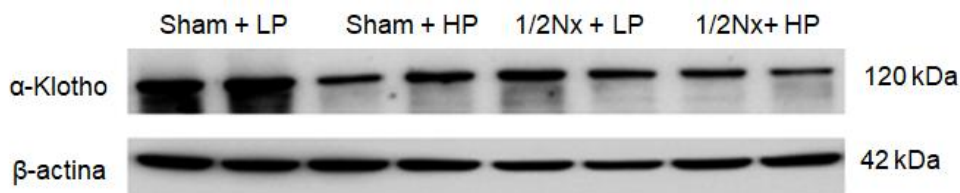


**Figura 40. La sobrecarga de fósforo promueve inflamación. Western blot de proteínas de tejido renal (Experimento 6).** Para la detección del fragmento p65 de NF- $\kappa$ B se empleó la fracción nuclear de la proteína y TFIIB como control. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); Nx: nefrectomía.

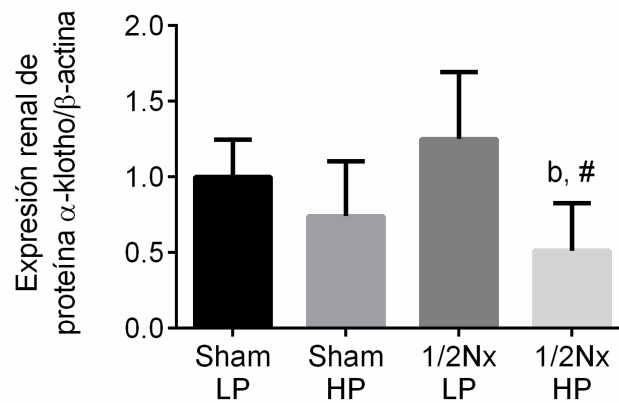


**Figura 41. La sobrecarga de fósforo promueve inflamación. Cuantificación de WB (Experimento 6).** La cuantificación de Western blot de p65 se realizó con la medida de la densidad relativa media y se normalizó con los niveles de  $\beta$ -actina. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs Sham+LP; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs Sham+HP. WB: Western blot; LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); Nx: nefrectomía.

Por otro lado, la expresión renal de Klotho se evaluó mediante Western blot y los resultados se muestran en las Figuras 42 y 43. En ratas con dieta rica en fósforo y, por tanto, con elevada fosfatúria, hubo una reducción significativa de la expresión renal de Klotho, la cual fue más acusada en las ratas heminefrectomizadas con respecto a las ratas sanas.



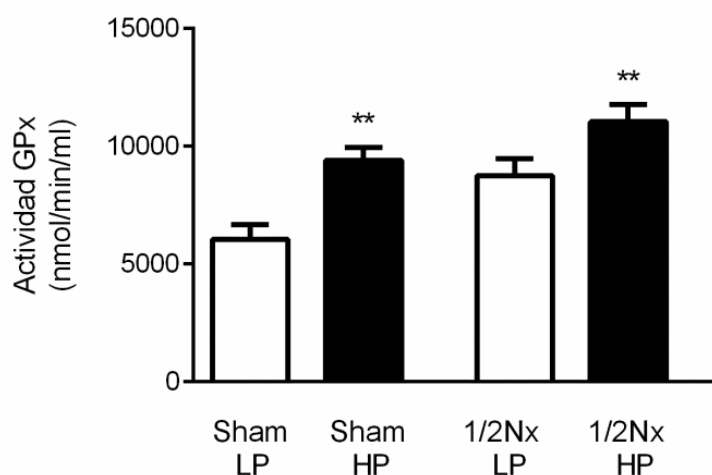
**Figura 42. La sobrecarga de fósforo disminuye la expresión renal de Klotho. Western blot de proteínas de tejido renal (Experimento 6).** Para la detección de klotho se usó la fracción citosólica y  $\beta$ -actina como control. LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); Nx: nefrectomía.



**Figura 43. La sobrecarga de fósforo disminuye la expresión renal de Klotho. Cuantificación de WB (Experimento 6).** La cuantificación de Western blot de Klotho se realizó con la medida de la densidad relativa media y se normalizó con los niveles de  $\beta$ -actina. <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs Sham+HP; <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs 1/2Nx+LP. WB: Western blot; LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); Nx: nefrectomía.

#### Experimentos en Ratas: Resultados de la medida de la actividad Glutation Peroxidasa (GPx)

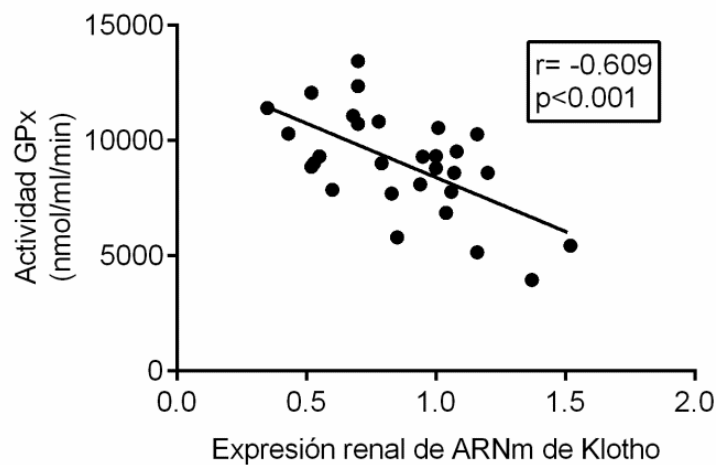
Como se muestra en la Figura 44, los riñones de las ratas con dieta alta en fósforo en comparación con las que tenían dieta baja en fósforo, mostraron un incremento de actividad de la enzima antioxidante GPx. Esto sugiere que un incremento en la carga de fósforo a nivel renal puede desencadenar un aumento de la producción de ROS y estrés oxidativo.



**Figura 44. Elevada fosfaturia genera estrés oxidativo renal. Actividad de la enzima Glutation peroxidasa (Experimento 6).** La actividad de la enzima GPx en el tejido renal se determinó en 20  $\mu$ g de proteína total extraída de las muestras renales por una reacción acoplada con glutation reductasa. Las unidades son expresadas en nanomoles de NADPH oxidada por minuto y mililitro.

Las barras blancas son grupos con LP (dieta 0.2% fósforo) y las barras negras son grupos con HP (dieta 1.2% fósforo). Análisis t-test  $**p < 0.01$ . GPx: Glutation peroxidasa; LP: del inglés, *Low phosphate* (dieta baja en fósforo); HP: del inglés, *High phosphate* (dieta alta en fósforo); Nx: nefrectomía.

El hallazgo de una correlación negativa significativa entre la actividad GPx y la expresión renal de klotho fue de gran interés (Figura 45) sugiriendo también una asociación entre el grado de estrés oxidativo y la pérdida de Klotho.

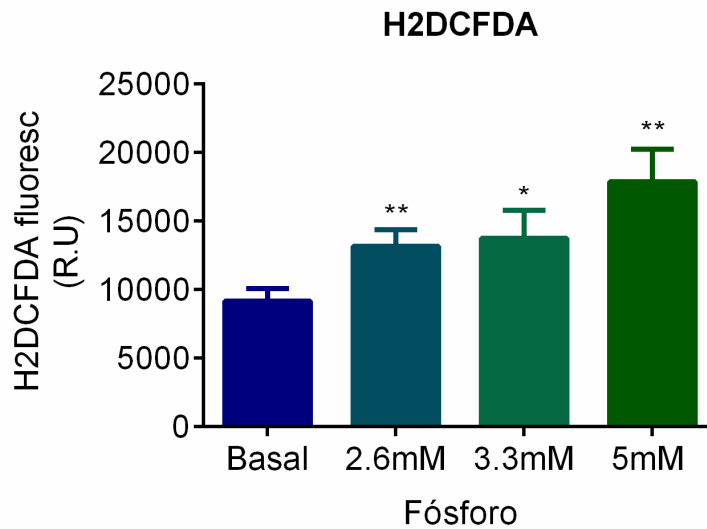


**Figura 45. Correlación negativa entre la expresión renal (ARNm) de Klotho y actividad GPx (Experimento 6).** GPx: Glutation peroxidasa.

**EXPERIMENTO 7: Estudio *in vitro* acerca del papel del fósforo sobre la generación de estrés oxidativo en células HEK-293.**

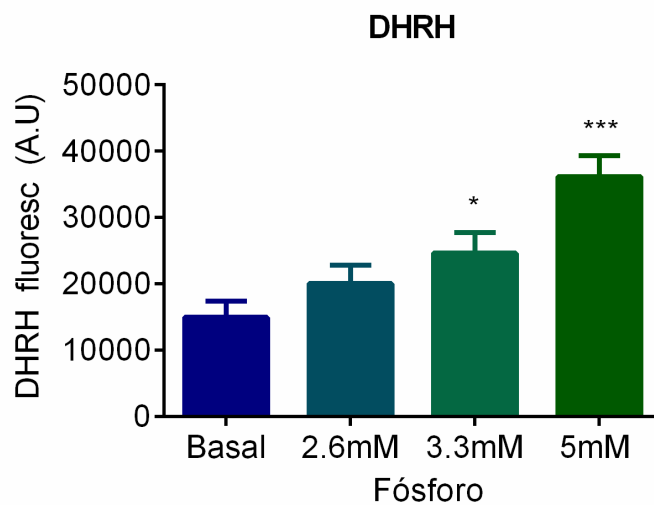
### **Células renales: Resultados de evaluación de estrés oxidativo inducido por fósforo**

Al evaluar el estrés oxidativo en las HEK-293 se observó un efecto directo de la elevada concentración de fósforo sobre la producción de ROS en estas células. Las células HEK-293 fueron cultivadas a concentraciones crecientes de fósforo: basal (0.9 mM), 2.6, 3.3 y 5 mM. Tras 24h de cultivo, la sonda fluorescente H2DCFA mostró la presencia de ROS. Este aumento fue más elevado con las dosis más altas de fósforo, sin embargo, no se observó un efecto dosis-dependiente con las concentraciones crecientes de fósforo (Figura 46).



**Figura 46. El fósforo incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en células HEK-293: usando sondas H2DCFDA (Experimento 7).** ROS intracelular fue determinado usando sondas H2DCFDA (detecta la presencia de ROS inespecíficamente) después de 24h de incubación con diferentes concentraciones de fósforo inorgánico. Análisis t-test. \* $p < 0.05$  vs fósforo basal, \*\* $p < 0.01$  vs fósforo basal. El fósforo basal es el contenido de fósforo en el medio de cultivo equivalente a 0.9 mM. ROS: especies reactivas de oxígeno; H2DCFDA: 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

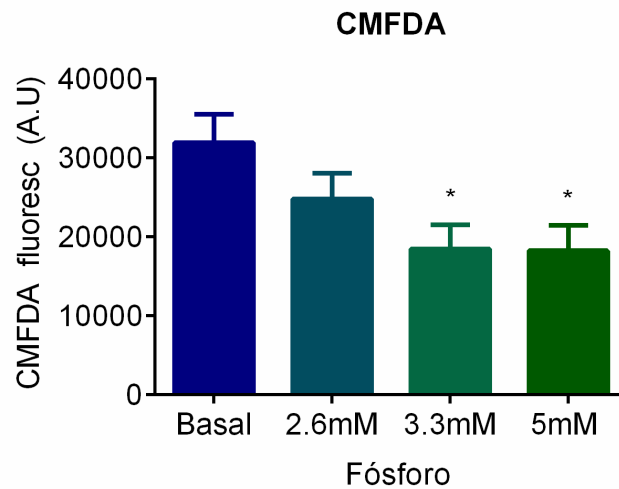
De igual modo en estas células HEK-293, la elevada concentración de fósforo favoreció el incremento de la producción endógena de peroxinitritos como refleja la mayor fluorescencia de la sonda DHRH en la Figura 47.



**Figura 47. El fósforo incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en células HEK-293: usando sondas DHRH (Experimento 7).** ROS intracelular fue determinado usando

sondas DHRH (determina peroxinitrito) después de 24h de incubación con diferentes concentraciones de fósforo inorgánico. Análisis t-test. \* $p < 0.05$  vs fósforo basal, \*\*\* $p < 0.001$  vs fósforo basal. ROS: especies reactivas de oxígeno; DHRH: dihidrorodamina.

Finalmente, como muestra la Figura 48, elevadas concentraciones de fósforo disminuyeron el contenido de glutatión reducido (CMFDA), uno de los principales antioxidantes endógenos.



**Figura 48. El fósforo incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno en células HEK-293: usando sondas CMFDA (Experimento 7).** ROS intracelular fue determinado usando sondas CMFDA (detecta niveles de glutatión reducido) después de 24h de incubación con diferentes concentraciones de fósforo inorgánico. Análisis t-test. \* $p < 0.05$  vs fósforo basal. ROS: especies reactivas de oxígeno; CMFDA: 5-clorometilfluoresceína diacetato.

### **BLOQUE 3: Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo.**

#### **ESTUDIO CLÍNICO 2: Estudio de la relación entre el tipo de ingesta de fósforo en la dieta y la fosfaturia en pacientes con enfermedad renal crónica estadios 2-3.**

Para este estudio se incluyeron 71 pacientes que fueron seleccionados secuencialmente conforme acudían a revisión en consulta externa de nefrología y que cumplían los criterios de selección descritos en los apartados 3.3.1, 3.3.2 y 3.6.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 16. La edad media de los pacientes fue de  $61 \pm 9$  años, con un rango de 38 a 77 años. Hubo un mayor número de pacientes varones (71.8%, n=51). El FG medio fue de  $68 \pm 21$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>. En cuanto a las comorbilidades, la hipertensión arterial estaba presente en el 100% (n=71) de los pacientes, la resistencia a la insulina en un 49.3% (n=35) y dislipemia en 77.5% (n=55). Los pacientes tenían un peso medio de  $90.6 \pm 13$  kg y un índice de masa corporal de  $32 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>.

	<b>Media <math>\pm</math> SD</b>
Edad (años)	61 $\pm$ 9
Género (n varón / % varón)	51 / 71.8
Diabetes mellitus tipo 2 (n/%)	35 / 49.3
Dislipemia (n/%)	55 / 77.5
Hiperuricemia (n/%)	43 / 60.6
Fumadores (n/%)	8 / 11.3
Cardiopatía isquémica (n/%)	8 / 11.3
Arteriopatía periférica (n/%)	9 / 12.7
Eventos cardiovasculares (n/%)	12 / 16.9
Hipertension (n/%)	71 / 100
IECA (n/%)	7 / 9.9
ARA II (n/%)	61 / 85.9
Diuréticos (n/%)	41 / 57.7
Calcio antagonistas (n/%)	45 / 63.4
Beta bloqueantes (n/%)	28 / 39.4
Alfa bloqueantes centrales (n/%)	31 / 43.7
Otros antihipertensivos (n/%)	4 / 5.6

Peso (kg)	90.6 ± 13
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	32 ± 4
Perímetro abdominal (cm) en varones	110 ± 10
Perímetro abdominal (cm) en mujeres	108 ± 10
Presión arterial sistólica (mmHg)	136 ± 25
Presión arterial diastólica (mmHg)	84 ± 16
Presión arterial media (mmHg)	108 ± 19
Frecuencia cardiaca (lpm)	64 ± 13

**Tabla 16. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio clínico 2 (n=71).** Las variables cuantitativas y cualitativas se expresan en media ± desviación estándar y número/porcentaje (n/%), respectivamente. IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAl: antagonistas de los receptores de angiotensina II.

Los parámetros bioquímicos en sangre y orina se muestran en las Tablas 17 y 18. Los pacientes presentaban niveles séricos de fósforo, calcio y magnesio dentro de los rangos de la normalidad, sin elevación de parámetros inflamatorios.

<b>Parámetros Suero</b>	<b>Media ± SD</b>
Creatinina (mg/dl)	1.19 ± 0.41
Urea (mg/dl)	47.8 ± 16
Glucosa (mg/dl)	128.6 ± 48.8
Sodio (mEq/L)	139.4 ± 2.4
Potasio (mEq/L)	4.4 ± 0.5
Cloro (mEq/L)	106.1 ± 3.3
Calcio (mg/dl)	9.5 ± 0.3
Fósforo (mg/dl)	3.09 ± 0.5
Magnesio (mg/dl)	1.89 ± 0.29
Triglicéridos (mg/dl)	150 ± 65
Colesterol (mg/dl)	178 ± 37
HDL- Colesterol (mg/dl)	39 ± 9
LDL- Colesterol	108 ± 32

(mg/dl)	
Albúmina (g/dl)	4.3 ± 0.2
PCR (mg/L)	8.01 ± 17.3
Hierro (µg/dl)	83 ± 33
Ferritina (ng/ml)	105 ± 112
PTH (pg/ml)	63 ± 38
iFGF23 (pg/ml)	124 ± 74
cFGF23 (RU/ml)	96 ± 73
<b>Parámetros Orina (24H)</b>	<b>Media ± SD</b>
Creatinina (mg/día)	1402 ± 618
Urea (mg/día)	26257 ± 9721
Sodio (mEq/día)	1833 ± 764
Potasio (mEq/día)	670 ± 280
Calcio (mg/día)	106 ± 79
Albúmina (mg/día)	483 ± 715

**Tabla 17. Hemograma y parámetros bioquímicos en sangre y en orina de 24h (Estudio clínico 2).** HDL: del inglés, *High density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidad); LDL: del inglés, *Low density lipoprotein* (lipoproteína de baja densidad); PCR: proteína C reactiva; PTH: hormona paratiroidea; iFGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23 intacto; cFGF23: FGF23 c-terminal.

La estimación de la ingesta media de fósforo total fue de 869 ± 289 mg/día. La distribución en función de las fuentes de fósforo fue la siguiente: proteína animal 64 ± 13% (542 ± 172 mg/día), proteína vegetal 22 ± 10% (189 ± 104 mg/día) y fósforo inorgánico 14 ± 13% (138 ± 165 mg/día). En base a esta ingesta, los datos de fosfaturia fueron los siguientes:

<b>Fosfaturia (24 h)</b>	<b>Media ± SD</b>
Fosfaturia (mg/día)	797 ± 324
Ratio P/urea (ratio P/U)	0.0311 ± 0.008
Ratio P/creatinine (ratio P/Cr)	0.60 ± 0.17
Fracción de excreción de fósforo (FeP) (%)	23.3 ± 10
Fosfaturia/CKD-EPI	13.1 ± 7.1



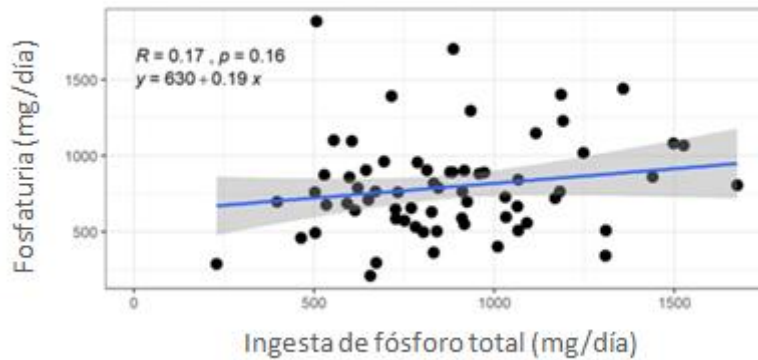
**Tabla 18. Parámetros de excreción urinaria de fósforo (Estudio clínico 2).** P: fósforo; U: urea; Cr: creatinina.

En la Tabla 19A se muestra el análisis de correlación linear simple entre la ingesta total de fósforo y los parámetros de excreción urinaria de fósforo.

		r	p		r	p
<b>A) Ingesta total de P (mg/día)</b>						
Fosfaturia (mg/día)		0.189	0.128			
Ratio P/Cr (mg/mg)		0.110	0.373			
Ratio P/U (mg/mg)		0.323	0.008			
FeP (%)		-0.088	0.484			
Fosfaturia/CKD-EPI		-0.032	0.797			
<b>B) Ratio P/U (mg/mg):</b>						
P Animal	%	-0.255	0.038	mg	0.189	0.126
P Vegetal	%	0.031	0.801	mg	0.232	0.059
P Inorgánico	%	0.313	0.01	mg	0.362	0.003
Ratio ((Pinorgánico + PAnimal)/P Animal)	%	0.316	0.009	mg	0.289	0.018

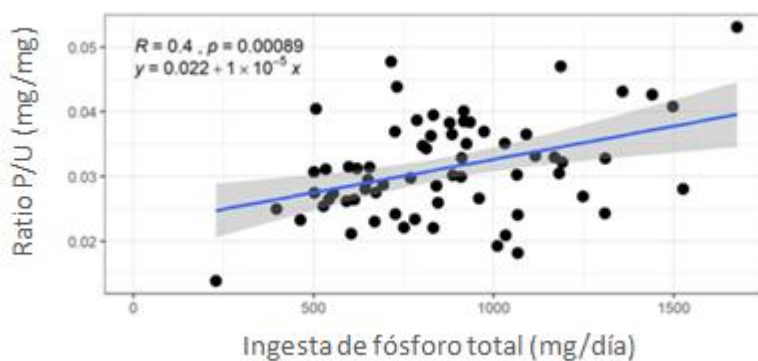
**Tabla 19. Análisis de correlación linear simple entre ingesta de fósforo y parámetros de excreción urinaria de fósforo (Estudio clínico 2).** A) Ingesta total de fósforo (mg/día) (variable dependiente) vs variables independientes: fosfaturia 24h (mg/día), ratio fósforo/creatinina (ratio P/Cr) (mg/mg), ratio fósforo/urea (ratio P/U) (mg/mg), fracción de excreción de fósforo (FeP) (%) y fosfaturia/CKD-EPI. B) Ratio fósforo/urea (ratio P/U) (mg/mg) (variable dependiente) vs variables independientes: fósforo de origen animal (%) (mg), de origen vegetal (%) (mg), fósforo inorgánico (%) (mg) y ratio (Fósforo inorgánico + Fósforo Animal)/ Fósforo Animal (%) (mg). r: coeficiente de Spearman; P: fósforo.

Como se refleja en la Tabla 19A, no se observó correlación significativa entre la ingesta total diaria de fósforo y la excreción urinaria de fósforo en 24h (Se representa gráficamente en la Figura 49), el ratio fósforo/creatinina, la FeP o el ratio fosfaturia/CKD-EPI (valores de p 0.128, 0.373, 0.484 y 0.797 respectivamente).



**Figura 49. Relación entre ingesta de fósforo total y excreción urinaria de fósforo en 24h (Fosfaturia) (Estudio clínico 2).**

Sin embargo, como se muestra en la Figura 50, sí hubo una correlación significativa entre la ingesta total de fósforo y el ratio P/U ( $p=0.008$ ) (Tabla 19A).



**Figura 50. Correlación entre ingesta de fósforo total y el ratio fósforo/urea (P/U) (Estudio clínico 2).**

Al existir correlación significativa únicamente con el ratio P/U, se procedió a analizar las diferentes fuentes de ingesta de fósforo en relación con dicho parámetro de excreción urinaria (Tabla 19B). Se observó una correlación positiva significativa del ratio P/U con la ingesta de fósforo inorgánico ( $p=0.01$  si es expresado en porcentaje y  $p=0.003$  si es expresado en valor absoluto en mg) (Tabla 19B). Sin embargo, el ratio P/U se correlacionó inversamente con el porcentaje de fósforo de origen animal. Este resultado es esperable y lógico ya que la urea es el denominador y es proporcional a la ingesta de proteínas. La ingesta conjunta de fósforo inorgánico y fósforo de origen animal dividido por el fósforo de origen animal fue también altamente correlacionada con el

ratio P/U en orina ( $p=0.009$  si es expresado en porcentaje y  $p=0.018$  si es expresado en valor absoluto en mg) (Tabla 19B).

Para determinar la posible relación entre los parámetros de excreción urinaria de fósforo (variable dependiente) y las hormonas fosfáticas FGF23 (intacto y c-terminal) y PTH se realizó un análisis de correlación lineal simple que se muestra en la Tabla 20. Los resultados muestran que ni la excreción urinaria de fósforo en 24h, ni el ratio P/Cr, ni el ratio P/U se correlacionaron significativamente con las potenciales hormonas fosfáticas iFGF23, cFGF23 o PTH. Sin embargo, la FeP si se correlacionó tanto con PTH ( $p=0.001$ ) como con cFGF23 ( $p=0.002$ ). También hubo correlación significativa entre el ratio fosfaturia/CKD-EPI y cFGF23 ( $p=0.005$ ), probablemente debido a la estrecha relación entre cFGF23 y FG (medido como CKD-EPI). El FG se correlacionó con cFGF23 ( $r=-0.534$ ,  $p<0.0001$ ) y PTH ( $r=-0.265$ ,  $p=0.026$ ) pero en ningún caso se encontró una correlación con iFGF23 ( $p=0.153$ ).

	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Fosfaturia (mg/día):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	-0.173	0.164
cFGF23 (RU/ml)	-0.029	0.813
PTH (pg/ml)	-0.184	0.134
<b>Ratio P/Cr (mg/mg):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	0.094	0.451
cFGF23 (RU/ml)	0.196	0.109
PTH (pg/ml)	0.188	0.123
<b>Ratio P/U (mg/mg):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	-0.095	0.445
cFGF23 (RU/ml)	-0.022	0.859
PTH (pg/ml)	0.147	0.228
<b>FeP (%):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	0.05	0.689
cFGF23 (RU/ml)	0.367	0.002
PTH (pg/ml)	0.395	0.001
<b>Fosfaturia/CKD-EPI:</b>		
iFGF23 (pg/ml)	0.033	0.794
cFGF23 (RU/ml)	0.342	0.005
PTH (pg/ml)	0.089	0.469

<b>CKD EPI:</b>		
iFGF23 (pg/ml)	-0.175	0.153
cFGF23 (RU/ml)	-0.534	0.0001
PTH (pg/ml)	-0.265	0.026

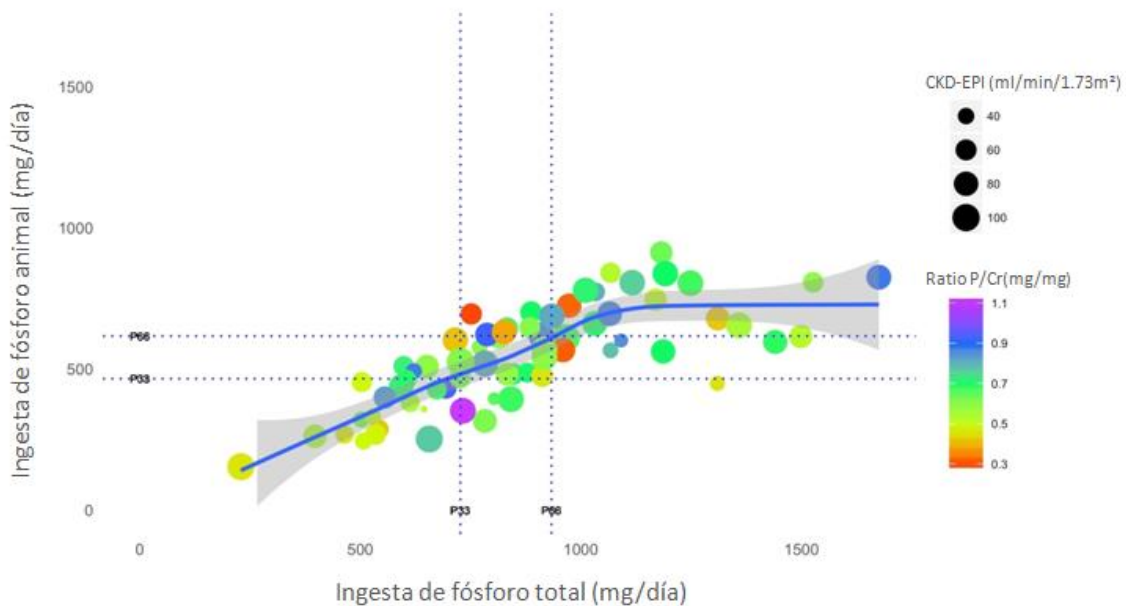
**Tabla 20. Análisis de correlación lineal simple entre parámetros de excreción urinaria de fósforo y hormonas fosfatúricas (Estudio clínico 2).** Variables dependientes: fosfaturia 24h (mg/día), ratio fósforo/creatinina (ratio P/Cr) (mg/mg), ratio fósforo/urea (ratio P/U) (mg/mg), fracción de excreción de fósforo (FeP) (%), fosfaturia/CKD-EPI y CKD-EPI (ml/min). Variables independientes: FGF23 intacto (iFGF23) (pg/ml), FGF23 c-terminal (cFGF23) (RU/ml) y hormona paratiroidea (PTH) (pg/ml). r: coeficiente de Spearman.

Es interesante señalar que la concentración sérica de cFGF23, pero no de iFGF23, fue inversamente correlacionada con la proporción de fósforo de origen animal y también positivamente correlacionada con el porcentaje de fósforo inorgánico (Tabla 21). La concentración sérica de calcio (corregido y sin corregir), fósforo, proteína C reactiva, albúmina e hierro no se correlacionaron con iFGF23, cFGF23 o PTH (datos no mostrados).

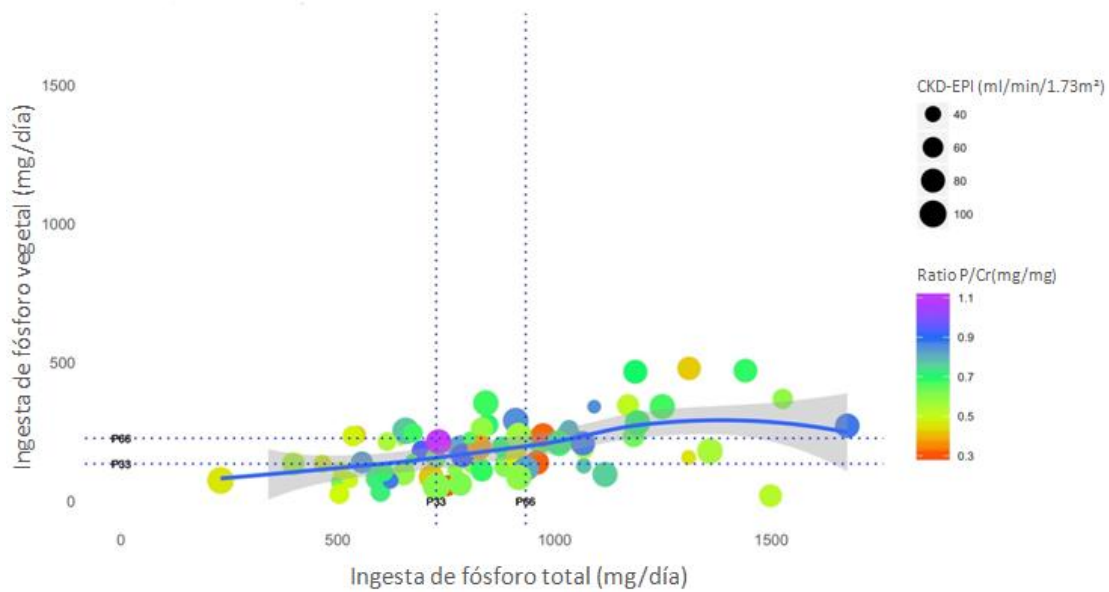
		<b>r</b>	<b>p</b>		<b>r</b>	<b>p</b>
<b>iFGF23 (pg/ml):</b>						
Ingesta total P (mg/día)		-0.099	0.431			
P Animal	%	-0.03	0.813	mg	-0.096	0.444
P Vegetal	%	-0.071	0.574	mg	-0.087	0.487
P Inorgánico	%	0.115	0.359	mg	0.075	0.551
<b>cFGF23 (RU/ml):</b>						
Ingesta total P (mg/día)		-0.149	0.225			
P Animal	%	-0.278	0.022	mg	-0.293	0.015
P Vegetal	%	0.015	0.904	mg	-0.04	0.747
P Inorgánico	%	0.283	0.019	mg	0.206	0.092
<b>PTH (pg/ml):</b>						
Ingesta total P (mg/día)		-0.1	0.415			
P Animal	%	-0.209	0.084	mg	-0.26	0.031
P Vegetal	%	0.063	0.605	mg	0.07	0.568
P Inorgánico	%	0.211	0.082	mg	0.178	0.144

**Tabla 21. Análisis de correlación lineal simple entre hormonas fosfatúricas e ingesta de fósforo (Estudio clínico 2).** Variables dependientes: FGF23 intacto (iFGF23) (pg/ml), FGF23 c-terminal (cFGF23) (RU/ml) y hormona paratiroidea (PTH) (pg/ml). Variables independientes: ingesta total de fósforo (mg/día), ingesta de fósforo de origen animal (%) (mg), ingesta de fósforo de origen vegetal (%) (mg) e ingesta de fósforo inorgánico (%) (mg). r: coeficiente de Spearman; P: fósforo.

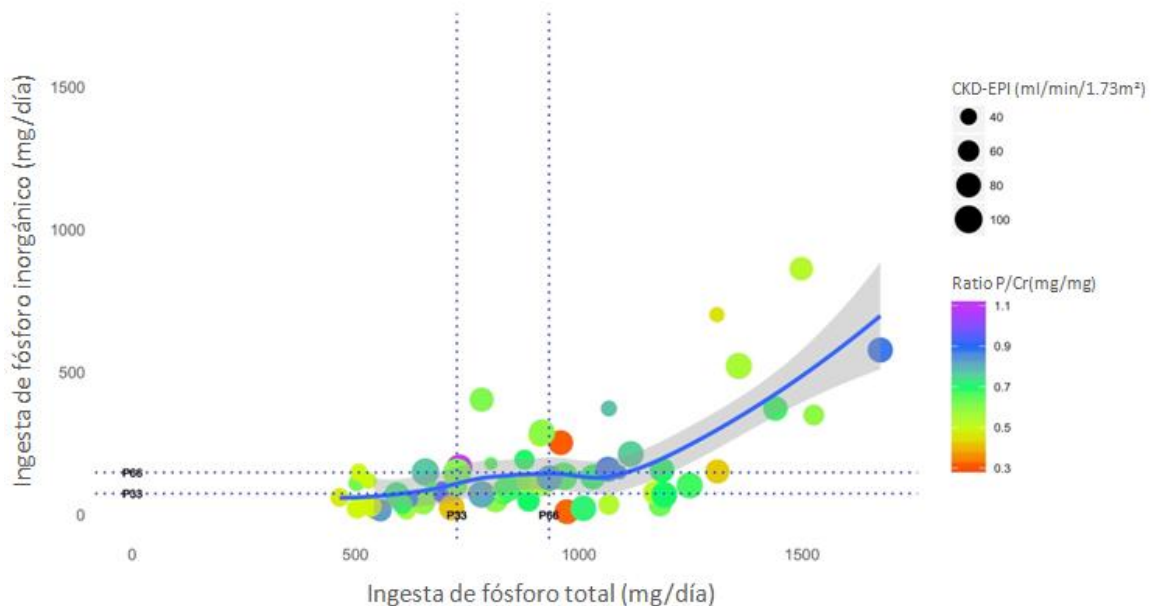
Como se refleja en las Figuras 51 y 52, los pacientes con el tercil más alto de ingesta de fósforo no ingieren una desproporcionada cantidad de fósforo de origen proteico (animal o vegetal), sino que tienen una elevada ingesta de fósforo inorgánico (Figura 53). Por el contrario, los pacientes que ingieren una cantidad discreta de fósforo (primer tercil) ingieren una cantidad relativamente baja de fósforo de origen proteico.



**Figura 51. Relación entre ingesta de fósforo de origen animal e ingesta de fósforo total (Estudio clínico 2).** El filtrado glomerular (CKD-EPI) se expresa en gradiente de tamaño de los círculos; de forma que, a mayor tamaño del círculo poseen mayor filtrado glomerular. El ratio fósforo/creatinina en orina de 24h (ratio P/Cr) se expresa en escala de colores; de manera que los colores más cálidos indican menor ratio P/Cr y los colores más fríos, mayor ratio P/Cr.



**Figura 52. Relación entre ingesta de fósforo de origen vegetal e ingesta de fósforo total (Estudio clínico 2).** El filtrado glomerular (CKD-EPI) se expresa en gradiente de tamaño de los círculos; de forma que, a mayor tamaño del círculo poseen mayor filtrado glomerular. El ratio fósforo/creatinina en orina de 24h (ratio P/Cr) se expresa en escala de colores; de manera que los colores más cálidos indican menor ratio P/Cr y los colores más fríos, mayor ratio P/Cr.



**Figura 53. Relación entre ingesta de fósforo inorgánico e ingesta de fósforo total (Estudio clínico 2).** El filtrado glomerular (CKD-EPI) se expresa en gradiente de tamaño de los círculos; de forma que, a mayor tamaño del círculo poseen mayor filtrado glomerular. El ratio fósforo/creatinina en orina de 24h (ratio P/Cr) se expresa en escala de colores; de manera que los colores más cálidos indican menor ratio P/Cr y los colores más fríos, mayor ratio P/Cr.

Los pacientes con mayor ratio P/U ingieren mayor proporción de fósforo inorgánico, tanto en valor absoluto ( $p=0.038$ ) como en porcentaje ( $p=0.049$ ) (Tabla 22). cFGF23 y PTH no muestran diferencias significativas entre terciles de P/U, aunque tienen tendencia a incrementar conforme aumenta el ratio P/U; presentando además proporcionalmente mayor fosfaturia. No obstante, este incremento a mayor ratio P/U solo es significativo en la fosfaturia expresada en mg/día ( $p=0.043$ ).

Ratio P/U	T1 (<0.027) n=23	T2 (0.027- 0.033) n=22	T3 (>0.033) n=24	p
Edad (años)	65	62.50	60.50	0.871
Ingesta P total (mg/día)	775	836	982	0.047
P animal (mg/día)	498	539	581	0.283
P vegetal (mg/día)	135	210	196	0.160
P inorgánico (mg/día)	71	72.5	141	0.038
P animal (%)	65	66	61	0.426
P vegetal (%)	21	24	21	0.540
P inorgánico (%)	14	10	18	0.049
CKD-EPI (ml/min)	62	66	81	0.265
iFGF23 (pg/ml)	107	100	104	0.654
cFGF23 (RU/ml)	76	77	82	0.906
PTH (pg/ml)	49	57	64	0.542
FeP (%)	19.56	20.41	20.75	0.653
P/Cr (mg/mg)	0.54	0.61	0.64	0.123
Fosfaturia/CKDEPI	11.14	11.53	12.79	0.662
Fosfaturia (mg/día)	663	739	890	0.043

**Tabla 22. Comparación de ingesta de fósforo, filtrado glomerular, hormonas fosfatúricas y variables de fosfaturia en función de los terciles de ratio fósforo/urea (ratio P/U) en los pacientes del estudio clínico 2.** T: Tercil; P: Fósforo; iFGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23 intacto; cFGF23: FGF23 c-terminal; PTH: hormona paratiroidea; FeP: fracción de excreción de fósforo; P/Cr: fósforo/creatinina.







# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

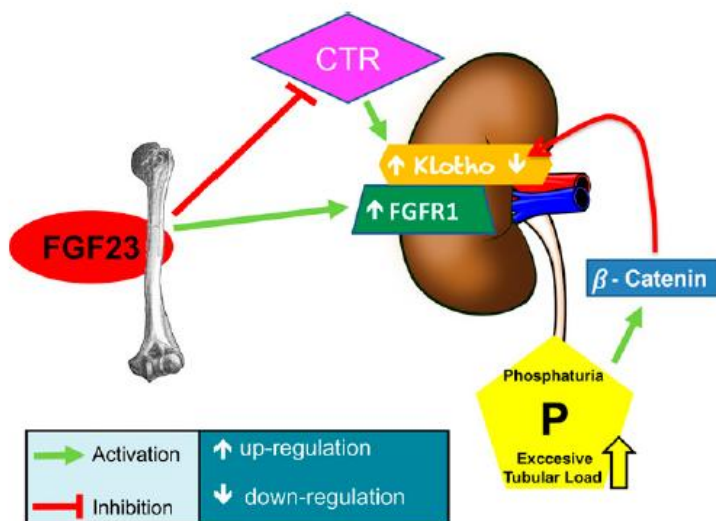
### **BLOQUE 1: Determinación de los mecanismos responsables de la resistencia a FGF23.**

Los resultados de esta tesis relativos a los modelos animales en ratas del Bloque 1 demuestran una asociación entre la elevada fosfaturia y el descenso en la expresión renal de Klotho. También muestran, que en ratas urémicas, la expresión renal de FGFR1 se ve incrementada por acción de altos niveles de FGF23. Los resultados *in vitro* corroboraron que altas concentraciones de fósforo reducen la expresión de Klotho a través de la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina.

Los niveles elevados de FGF23, ya sea primario por administración exógena de FGF23 o secundario debido a la insuficiencia renal y a una elevada ingesta de fósforo, se asoció con un incremento en la expresión renal de FGFR1. La neutralización de FGF23, por administración de anti-FGF23, redujo la expresión de FGFR1 en un 75%. Sin embargo, esta neutralización de FGF23 no produjo un incremento de la expresión de Klotho. Shalhoub et al. mostraron en un modelo de rata con ERC y alteración del metabolismo óseo-mineral que la neutralización con FGF23 produce disminución de PTH, aumento de vitamina D, aumento del calcio sérico y la normalización de marcadores óseos (53). Nuestros resultados sugieren que es la sobrecarga de fósforo y el incremento en la fosfaturia, y no un efecto directo del FGF23, el responsable de la reducción de la expresión renal de Klotho. Esto se sustenta con los resultados obtenidos con los estudios *in vitro* en los que la elevada concentración de fósforo redujo la expresión de Klotho a través de la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina.

Los resultados de este bloque también muestran que en ratas urémicas, la suplementación con calcitriol evita la reducción de Klotho a nivel renal a pesar de presentar una mayor fosfaturia. Además, observamos *in vitro* que el suplemento con calcitriol neutralizó la inhibición de Klotho inducida por fósforo. En este sentido se ha demostrado que el promotor de Klotho contiene elementos de respuesta del VDR, lo cual apoya la implicación del calcitriol en la regulación de la expresión de ARNm de Klotho (75,95).

Estos datos no son contradictorios con los de otros estudios que demuestran un incremento en la expresión de Klotho mediado por calcitriol (75,95,96). La Ilustración 15 recoge todos los resultados hallados en el Bloque 1 de la presente tesis.



**Ilustración 15. Regulación diferencial de Klotho y FGFR1.** FGF23 estimula la fosfaturia e inhibe la producción de calcitriol. Además, incentiva la expresión renal de FGFR1. Debido a la estimulación de la expresión renal de Klotho a través de calcitriol, un descenso de los niveles de calcitriol causados por la acción de FGF23 podría afectar negativamente la expresión renal de Klotho. La carga excesiva de fósforo por nefrona, como ocurre en la insuficiencia renal, produce una inhibición de la expresión renal de Klotho a través de la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina. FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23; FGFR1: receptor 1 del FGF23; CTR: calcitriol; P: fósforo.

Una pregunta importante es por qué el aumento de la carga de fosfato a nivel tubular podría reducir la expresión renal de Klotho, que es co-receptor de FGF23 y directamente promueve la fosfaturia (97). Si como sugiere Hu et al. (97), Klotho participa en el control de los niveles de fósforo sérico al inducir fosfaturia, una reducción en Klotho podría interpretarse como un mecanismo de respuesta para conservar el fósforo sérico, prevenir la hiperfosfatemia y evitar una fosfaturia excesiva. Nuestros experimentos no fueron diseñados para explorar esta posibilidad. Alternativamente, la reducción de Klotho a nivel renal podría ser resultado de una lesión celular inducida por un exceso de fósforo. Otros investigadores han demostrado que la expresión renal de Klotho parece ser sensible a la lesión renal asociada a inflamación (98), estrés oxidativo (99), dislipemia (100) o elevadas concentraciones de toxinas urémicas como el indoxilsulfato (101). Dos estudios realizados por Kuro-O et al y Sun et al, han evidenciado que una importante carga de fósforo puede producir daño renal e inflamación (102,103). Zhou et al.(78) mostraron en varios

modelos animales de nefropatía que la reducción de la expresión renal de Klotho está asociada con la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina. Klotho podría proteger contra la excesiva actividad de dicha ruta. En esta tesis se demuestra que una elevada concentración de fósforo en el medio causa activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina junto con una reducción en Klotho. En nuestros experimentos, la inhibición de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina a través de la adición de Dkk1 evitó la reducción de la expresión renal de Klotho promovida por fósforo. En estudios previos de nuestro grupo, demostramos ya una relación entre fósforo y la activación de la ruta WNT  $\beta$ -catenina canónica en otros tipos celulares como células musculares lisas vasculares (79) y células madres mesenquimales de médula ósea (80). Es importante tener en cuenta que el promotor de Klotho contiene también elementos de respuesta de  $\beta$ -catenina, sugiriendo que la expresión de Klotho podría estar controlada por esta ruta WNT/ $\beta$ -catenina canónica (104).

Según los resultados obtenidos en este bloque, podría explicarse porqué los niveles de FGF23 son tan elevados durante la ERC y porqué no ejercen el presumible efecto fosfático. Por tanto, la sobrecarga de fósforo, promoviendo primero la traslocación nuclear de  $\beta$ -catenina y posteriormente la disminución de los niveles renales de Klotho, sería responsable de la resistencia a FGF23. Este descenso de la fosfaturia llevaría asociado un incremento de la hiperfosfatemia y, por tanto, una promoción de las calcificaciones vasculares, por lo que la recuperación de los niveles renales de Klotho podría identificarse como una diana clave para mantener la homeostasis del fósforo.

Con respecto al calcitriol, se ha demostrado *in vitro* que en líneas celulares de riñón promueve la expresión de Klotho a través de elementos de respuesta de VDR presentes en el promotor de Klotho (101). Sin embargo, hay pocas evidencias *in vivo* acerca de un posible efecto directo de calcitriol sobre la expresión renal de Klotho. En nuestros experimentos *in vivo*, como consecuencia de la administración de calcitriol, hay un aumento de la fracción de excreción de fósforo la cual podría contribuir a disminuir la expresión renal de Klotho. Sin embargo, encontramos que, en presencia de calcitriol, la disminución de Klotho renal es menos acusada. Estos resultados *in vivo*, junto con los datos *in vitro* en las células HEK-293 donde se muestra que calcitriol restaura la expresión de Klotho en células expuestas a elevadas concentraciones de fósforo, sugieren que en una situación de sobrecarga de fósforo, calcitriol evita la reducción de Klotho inducida por la excesiva fosfaturia. Además de nuestro grupo, otros autores han demostrado que en presencia de hipocalcemia, la producción de calcitriol incrementa aunque sin estimular la producción de FGF23 (45,105). En este escenario, el incremento en la absorción de fósforo a nivel intestinal debe ser excretado en orina. Si FGF23 no aumenta, sería beneficioso mantener la expresión renal de Klotho para favorecer la fosfaturia. Además, elevados niveles de PTH inducidos por la

hipocalcemia podrían no ser suficientes para excretar el exceso de fósforo procedente de la absorción intestinal inducida por calcitriol y el flujo de salida de fósforo del hueso. Esta es otra de las posibles interpretaciones los resultados obtenidos en la presente tesis.

Respecto a FGFR1, se conoce que es el principal receptor involucrado en las acciones fosfatúricas de FGF23. La participación de otros receptores como FGFR3 ó FGFR4 sigue siendo controvertida (61,106). Se ha reportado que en los osteocitos, la activación de FGFR1 estimula la producción de FGF23 (60,62). Sin embargo, los efectos de FGF23 en FGFR1 a nivel renal no han sido aún explorados en profundidad. Nuestros resultados sugieren que la expresión renal de FGFR1 se estimula con niveles elevados de FGF23. Este mecanismo podría estar dirigido a asegurar o estimular la fosfaturia. Wu et al. mostraron que la activación de FGFR1 induce expresión de FGF23 estimulando la fosfaturia (60); con lo cual, FGFR1 y FGF23 están estrechamente interrelacionados de forma que se regulan entre sí promoviendo fosfaturia.

Otro elemento que debe ser estudiado en profundidad es si la carga de fósforo ejerce su efecto directamente sobre la expresión renal de Klotho a través de la activación de la ruta WNT o si estos efectos se subrogan o comparten con otros procesos fisiopatológicos como la inflamación, la supresión de vitamina D o la existencia de otros factores no considerados hasta ahora.

En resumen, en este bloque se postula que la sobrecarga de fósforo circulante en los túbulos renales produce una reducción en la expresión renal de Klotho a través de la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina. Como consecuencia, hay una resistencia a la acción fosfatúrica de FGF23 con el consecuente desarrollo de hiperfosfatemia. Otros autores ya han aludido a este concepto de resistencia de FGF23 (44,107,108), para referirse al hecho de que los altos niveles de FGF23 no siempre se corresponden con una mayor fosfaturia, existiendo elementos que dificultan la excreción de fósforo. Estos resultados por tanto subrayan y destacan el interés de determinar el impacto de la excreción renal de fósforo sobre la expresión renal de Klotho, el aumento de FGF23 y la fosfaturia en pacientes con ERC. De esta manera, la medición de la excreción urinaria de fósforo, podría ser un potencial biomarcador de progresión de la enfermedad renal. En un intento de dilucidar otros efectos perjudiciales del fósforo sobre el riñón, se procedió a estudiar el papel de la sobrecarga de éste en modelos animales, *in vitro* y en pacientes.

## **BLOQUE 2: Investigación del papel de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal.**

Profundizando en los efectos renales de la sobrecarga de fósforo, los resultados del segundo bloque de esta tesis revelan que la fosfaturia determina la progresión de la enfermedad renal en pacientes con moderada insuficiencia renal a pesar de tener niveles séricos de fósforo dentro de la normalidad. De esta manera, los resultados clínicos obtenidos, avalados por los estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* realizados, muestran que, tras un seguimiento de casi 3 años, el grado de fosfaturia predice la progresión de la ERC y la excesiva carga de fósforo produce daño renal.

Para la parte clínica de este bloque, se seleccionó un grupo de pacientes con síndrome metabólico sin proteinuria manifiesta para tener un grupo uniforme de pacientes con estadios tempranos de ERC (estadios 2-3). Es muy común encontrar pacientes con síndrome metabólico y ERC estadios 2-3 por lo que los hallazgos se pueden extrapolar a un gran número de pacientes. La presencia de proteinuria manifiesta podría haber enmascarado el hallazgo de la fosfaturia como factor independiente de progresión renal, ya que la albuminuria es un factor importante de progresión de enfermedad renal, de pronóstico renal y de mortalidad, independientemente del FG y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (109,110). Como hallazgo inesperado, fue interesante observar que incluso un grado menor de albuminuria ( $\text{Alb/Cr} < 0.4 \text{ mg/mg}$ ) afectó negativamente a la función renal si la fosfaturia estaba aumentada.

Los experimentos en animales se diseñaron para determinar los mecanismos por los que se producía el daño renal inducido por la fosfaturia que fue observado en los pacientes. El objetivo fue explorar si el daño renal podía ser inducido por un incremento en la fosfaturia incluso en estadios en los que no se muestra hiperfosfatemia.

En los modelos experimentales animales el análisis histológico de los riñones reveló que una dieta alta en fósforo, sobre todo en ratas heminefrectomizadas (con insuficiencia renal moderada), producía toxicidad celular tubular, infiltrados inflamatorios y proliferación celular, presumiblemente para reparar el daño causado. También hubo evidencia de calcificación focal aunque la respuesta inflamatoria no estaba circunscrita a la pequeña zona de calcificación. El incremento en la expresión de p65 en los riñones de ratas con alta ingesta de fósforo indicó que el exceso de fósforo favorece la inflamación. Además el aumento de la actividad antioxidante de la enzima GPx en dichas ratas sugiere una respuesta tisular al estrés oxidativo. Un efecto directo de la concentración elevada de fósforo en el estrés oxidativo (efecto pro-oxidante) fue demostrado en



las células HEK-293 que incrementaron la producción de ROS en respuesta a un aumento gradual en la concentración de fósforo extracelular. Finalmente, la expresión renal de Klotho resultó ser nuevamente descendida en aquellas ratas que recibieron una elevada ingesta de fósforo. Un hecho interesante fue el que demostró que el descenso de la expresión renal de Klotho es proporcional al aumento de GPx, sugiriendo una conexión entre estrés oxidativo y descenso renal de Klotho.

Una de las limitaciones de los resultados de este bloque de la tesis es que no es posible dilucidar si la generación de estrés oxidativo y la activación de NF- $\kappa$ B son procesos independientes o si están estrechamente interrelacionados entre sí. Lo que se demuestra con esta tesis es que en la enfermedad renal, una elevada fosfaturia promueve estrés oxidativo, activación del p65 y lesión renal. En trabajos previos de nuestro grupo se observó que en las células de músculo liso vascular tratadas con alto contenido en fósforo, el tratamiento con calcitriol disminuía la activación de p65 sugiriendo un papel central del estrés oxidativo en la activación de p65 (111). En conjunto, se podría postular que el aumento de fosfaturia genera daño renal a través de un incremento del estrés oxidativo y la inflamación que conduce a daño renal y a una reducción en los niveles de Klotho. En los modelos animales del Bloque 1 de esta tesis, se documentó que el exceso de fosfaturia a través de la activación de WNT/ $\beta$ -catenina disminuye la expresión renal de Klotho, que a su vez disminuye la acción fosfatúrica de FGF23, lo cual está en concordancia con los datos clínicos y básicos obtenidos en este segundo bloque. Otros autores han demostrado que la alta concentración de fósforo es tóxica e incluso pro-apoptótica para las células tubulares (102,112,113). Zhou et al. (78) publicaron que el descenso de Klotho promueve la activación de WNT y, por tanto, puede contribuir a lesión renal. Posteriormente, han mostrado que las células tubulares renales lesionadas estimulan la fibrosis renal a través de la activación del sistema de señalización WNT del fibroblasto, un mecanismo por el que el exceso de fosfaturia tiene el potencial de producir daño renal y acelerar la progresión de la ERC incluso en etapas tempranas de enfermedad renal (114).

Otros estudios han publicado previamente que los sujetos con elevado fósforo sérico tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal (115–117). En pacientes con enfermedad renal avanzada, la progresión renal puede estar predeterminada por otros factores que dificultan el aislamiento de la fosfaturia como factor independiente de predicción de la progresión de la enfermedad renal. Además, en la ERC avanzada, la FeP es ya muy alta, limitando la capacidad para forzar aún más la fosfaturia. Esa es la razón por la que se desarrolla la hiperfosfatemia. En la actualidad, no hay estudios en pacientes con ERC estadios 2-3 en los que se haya evaluado la relación entre fosfaturia y progresión renal. En estudios en pacientes con ERC avanzada debido a una variedad de enfermedades renales y con diferentes grados de proteinuria, no se ha demostrado el efecto de

la fosfaturia en la progresión de la enfermedad renal, pero la limitación de mejorar aún más la fosfaturia podría ser crucial y de especial relevancia (117,118). Isakova et al. encontraron en pacientes con función renal relativamente preservada (FGe entre 30 y 44 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) que los niveles elevados de FGF23 se asociaron con mayor riesgo de ERC terminal de forma significativa. Sin embargo, ni PTH ni FeP, a diferencia de FGF23, se asociaron con mortalidad en modelos ajustados que no incluían FGF23 (118). En comparación con nuestros pacientes, los pacientes del estudio de Isakova et al. tenían ERC más avanzada con mayores niveles de FGF23 y enfermedad cardiovascular más severa (118). En esta etapa de ERC, otros factores, además de la proteinuria y la FeP, pueden desempeñar un papel más relevante en la progresión de la enfermedad renal como son hipertensión arterial mal controlada, diabetes mellitus mal controlada, tabaquismo, dislipemia, anemia, obesidad o enfermedad cardiovascular asociada (110). Por todo ello, para valorar la fosfaturia como factor predictor de progresión renal se deben elegir pacientes con ERC estadios 2-3, donde se puede dilucidar el papel persé de la fosfaturia sin otros factores confusores.

Otro aspecto importante, es la relación entre el fósforo y la inflamación. El fósforo incrementa la activación de la proteína quinasa C de células endoteliales promoviendo la fosforilación que induce la actividad NADPH oxidasa e inactivando la enzima óxido nítrico sintasa. El incremento endotelial de las especies reactivas de oxígeno contribuye a la apoptosis y a la supresión de señalización de óxido nítrico. Existen ya otros trabajos en los que se demuestra que el fósforo posee efectos directos sobre la fosforilación oxidativa y el metabolismo celular, donde se promueve la aparición de estrés oxidativo y daño endotelial (119). En pacientes sanos, se ha demostrado que el recibir suplementos orales de fósforo incrementa el fósforo sérico al límite superior del rango de la normalidad y produce una reducción transitoria en la dilatación de la arteria braquial dependiente del endotelio; de forma que, los picos postprandiales en el fósforo sérico podrían causar lesiones endoteliales acumulativas (17). Incluso en pacientes con ERC en diálisis, los cuales sufren un estado inflamatorio crónico, el control del fósforo sérico se traduce tanto en una reducción de iFGF23 como en un descenso en los parámetros inflamatorios (120) subrayando por tanto el enlace entre el exceso de fósforo y los procesos inflamatorios.

En resumen, según los resultados de los estudios clínicos y experimentales de este bloque de la tesis, se infiere que una elevada ingesta de fósforo incrementa la carga de fósforo y con ello la fosfaturia, promoviendo la presencia de un daño del túbulo renal que genera inflamación y estrés oxidativo. Los esfuerzos para reducir la progresión de la enfermedad renal pueden tener un impacto social y económico significativo. Los mecanismos involucrados en el daño renal en la ERC son multifactoriales. Los resultados de esta tesis pueden servir como base a futuros estudios intervencionales, con restricción en la ingesta de fósforo o empleo de quelantes de fósforo, con el

objetivo de determinar si la reducción en la absorción intestinal de fósforo en ERC estadios 2-3 ayuda a preservar la función renal. Además, a parte del fósforo de origen proteico, las sales de fósforo presentes en aditivos y bebidas proporcionan una significativa carga de fósforo que se absorbe rápidamente (121,122) susceptible de ser reducida para prevenir la progresión de la ERC. Por lo que serían necesarios más estudios para ponderar correctamente los efectos deletéreos del exceso de fósforo y para aprender en qué momento es necesario intervenir desde el punto de vista terapéutico para evitar el inicio de la inflamación y el daño renal con la consiguiente alteración del metabolismo mineral.

### **BLOQUE 3: Identificación de biomarcadores de sobrecarga de fósforo.**

Tras valorar la relevancia de la sobrecarga de fósforo sobre la progresión del daño renal, se diseñó el siguiente estudio clínico de este último bloque para identificar biomarcadores de sobrecarga de fósforo buscando una posible asociación entre las diferentes fuentes de fósforo de la dieta y la excreción urinaria de fósforo y los valores de hormonas fosfatúricas. Los resultados que obtuvimos es que la fosfaturia, como excreción de fósforo en la orina de 24h, no se correlacionó con la cantidad de fósforo total ingerida. Sin embargo, si se observó una correlación significativa entre la ingesta total de fósforo y la ingesta de fósforo inorgánico medida a través del ratio fósforo/urea en orina de 24h. En cuanto a las hormonas fosfatúricas, no se encontró asociación entre cFGF23 y la ingesta de fósforo total pero sí hubo correlación con la proporción de fósforo inorgánico ingerido.

Uno de los principales resultados obtenidos en este bloque de la tesis es que el ratio P/U en orina refleja mejor la cantidad de fósforo excretada relativa a la ingesta de proteínas. De esta forma, si se ingiere gran cantidad de fósforo inorgánico y se mantiene la ingesta proteica, incrementa el ratio P/U. Es probable que la cantidad de fósforo ingerido en forma de aditivos (sales de fósforo fácilmente absorbibles) sea la causa de una gran cantidad de fósforo excretado en orina. La fosfaturia total no se correlacionó con los niveles de PTH, cFGF23 ni de iFGF23; sin embargo, estas hormonas fosfatúricas se correlacionaron con la FeP, lo que sugiere que es la carga de fósforo en relación con el FGe lo que determina la estimulación de PTH y FGF23. En nuestros pacientes con ERC moderada estadios 2-3, la FeP y el FGe se correlacionaron significativamente con cFGF23 pero no con iFGF23.

Hasta hace poco, se ha asumido que la excreción de fósforo en orina refleja la ingesta de fósforo, no obstante, esta suposición no se ha demostrado totalmente. La excreción de fósforo en orina de

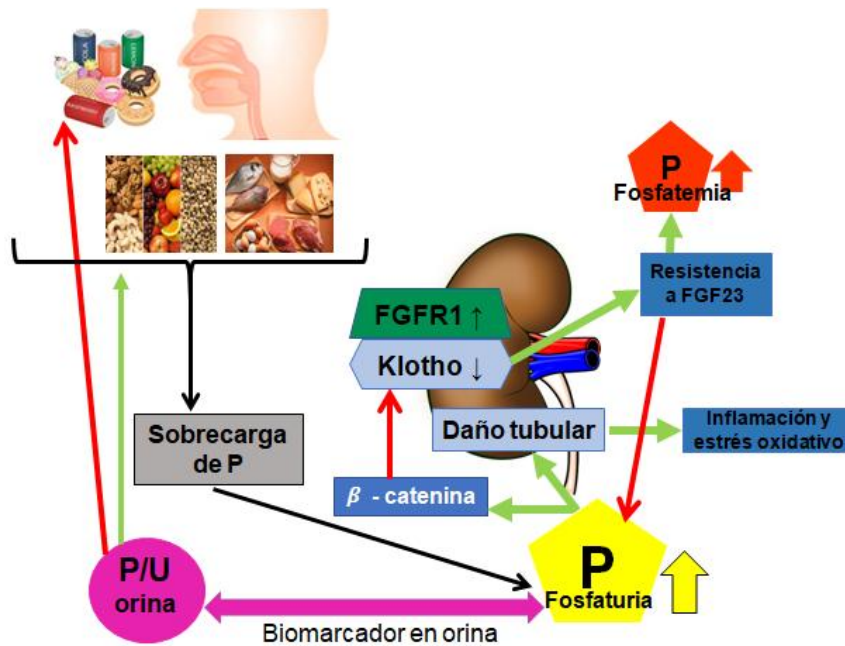
24h era considerada un parámetro que refleja la ingesta de fósforo en una situación de equilibrio de fósforo, suponiendo que la absorción neta de fósforo se correlaciona con la absorción y está relacionada linealmente con la ingesta. De igual modo, se ha asumido que esta relación se aplica también a los pacientes con ERC (123). Ix et al. (124) mostraron que el patrón circadiano del fósforo sérico es modificable por la ingesta de fósforo y que la ingesta no se correlaciona con la fosfatúria. Stremke et al. (125) han publicado recientemente que el fósforo en orina de 24h es altamente variable y no se relaciona con la ingesta de fósforo o la absorción de fósforo en pacientes con ERC moderada realizando un control exhaustivo y controlado de la ingesta.

En las dietas occidentales, el fósforo es ingerido principalmente como proteína. La cantidad diaria recomendada en nuestra zona es de 900-1000 mg/día en adultos sanos. La EFSA en Europa informa que los rangos de ingesta de fósforo deben estar entre 1000-1767 mg/día (30). En nuestro estudio observamos que nuestros pacientes tienen una ingesta media de  $869 \pm 289$  mg/día, y solo un 14% es de origen inorgánico. El fósforo ingerido como aditivo es fácilmente absorbible y se excreta en orina. Aunque la cantidad de fósforo inorgánico ingerido es baja, contribuye en gran medida a la excreción de fósforo en orina, enmascarando la relación con la ingesta total de fósforo. Caravaca et al. muestran que la reducción en la absorción intestinal de fósforo por los quelantes de fósforo se refleja en una disminución en el ratio P/BUN en orina (126). A pesar de su uso generalizado, las sales de fósforo (aditivos) generalmente no se tienen en cuenta en el contenido estimado de fósforo de los alimentos procesados. Estos aditivos representan una carga de fósforo importante y “oculta” en las dietas modernas (32,127).

Los estudios en pacientes sin ERC y con ERC que aún no requieren diálisis sugieren que los niveles séricos de fósforo más elevados, incluso dentro del rango de la normalidad ( $<4.5$  mg/dl), son un factor de riesgo para la calcificación vascular (25). Trautvetter et al. (29) realizaron un estudio paralelo, doble ciego, controlado con placebo (n=66) que muestra que la ingesta adicional de 1000 mg de fósforo al día no influye en las concentraciones de fósforo en plasma en ayunas después de 8 semanas de intervención. Estos hallazgos no deben extrapolarse a pacientes con ERC con carga de fósforo prolongada. La ingesta de fósforo proviene en su mayoría de alimentos con alto contenido de proteínas o aditivos alimentarios y es un determinante importante del equilibrio de fósforo en pacientes con ERC (32). Por tanto, el análisis de la relación P/U en orina es un método recomendable para conocer la fuente de ingesta de fósforo. Los resultados de esta tesis sugieren que reducir la ingesta de fósforo inorgánico, sin restricción de la ingesta de proteínas, puede ser una medida eficaz para controlar la carga de fósforo en pacientes con ERC moderada.

Con respecto a las hormonas fosfatúricas, PTH y cFGF23 solo se correlacionaron con FeP y no se correlacionaron con la cantidad total de fósforo en orina. Ambas hormonas son estimuladas por una mayor ingesta de fósforo (128), pero el grado de insuficiencia renal es determinante en la excreción de fósforo; por lo tanto, la carga de fósforo en relación al FG real es el estímulo para la producción de PTH y FGF23. El hecho de que la ingesta de fósforo inorgánico se asocie con un aumento de FGF23 apunta a la relevancia del fósforo inorgánico en la carga de fósforo en cada paciente. Debido a la asociación entre los elevados niveles de FGF23 y mortalidad, esta observación apoya la importancia de la restricción de fósforo inorgánico en la dieta. Los enfoques terapéuticos para reducir la absorción intestinal de fósforo, de acuerdo con el ratio P/U en orina que conlleva a niveles más bajos de fósforo y FGF23 séricos simultáneamente, podría tener como objetivo disminuir la cantidad de fósforo inorgánico y aumentar las proporciones de fósforo proteico de origen animal y el de origen vegetal (6,129). Algunos autores han demostrado que la restricción de fósforo en la dieta a corto plazo tiende a reducir los niveles de FGF23 en pacientes con función renal moderadamente disminuida (130).

Como resumen general de la tesis podemos concluir que la sobrecarga de fósforo a través de la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina promueve una reducción en la expresión renal de Klotho y, consecuentemente, causa una resistencia a la acción fosfatúrica de FGF23 y con ello hiperfosfatemia. Además, encontramos que la sobrecarga de fósforo es responsable de la generación de un daño tubular renal en donde se induce tanto inflamación como estrés oxidativo. Finalmente, derivado del último estudio clínico realizado, encontramos que el ratio P/U podría ser una herramienta útil para guiar el asesoramiento dietético de los pacientes con ERC con el objetivo de reducir la ingesta de fósforo inorgánico, sin restricción de la ingesta de proteínas. El empleo del ratio P/U puede ser una medida eficaz para controlar la carga de fósforo en pacientes con ERC moderada y prevenir la progresión de la ERC. De esta manera, los resultados de esta tesis pueden servir como base a futuros estudios intervencionales, donde la restricción en la ingesta de fósforo o el empleo de quelantes de fósforo en estadios tempranos de la ERC, puede contribuir a reducir la absorción intestinal de fósforo y, con ello, preservar la función renal.



**Ilustración 16. Resumen de los resultados de la tesis.** Hoy día es bastante frecuente encontrar pacientes con ERC y una alimentación no adecuada en donde el consumo de alimentos precocinados y la comida rápida representa un aporte excesivo de distintas fuentes de fósforo, en especial fósforo inorgánico. Esta sobrecarga constante de fósforo supone la generación de un daño tubular a nivel renal en donde se incrementa el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios. Estos procesos patológicos inducidos por la sobrecarga de fósforo representan también cambios sobre los receptores de FGF23. De esta manera, altas concentraciones de fósforo promueven el descenso renal de Klotho a través de la activación de la ruta WNT/β-catenina. Consecuentemente, se produce una resistencia a FGF23, disminuyendo la fosfaturia e incrementando la fosfatemia. Además, estudios clínicos en pacientes en estadios tempranos de ERC muestran una asociación entre el ratio P/Cr en orina con la progresión de la ERC. Son necesarios por tanto biomarcadores que nos permitan ponderar cuando hay una sobrecarga de fósforo y cómo va a progresar la ERC. Nuestros resultados muestran que el ratio P/U puede ser útil para guiar al nefrólogo y ofrecer un asesoramiento dietético que permita advertir de la sobrecarga y reducir la ingesta de fósforo inorgánico y preservando la ingesta proteica. De esta forma, se produciría menos sobrecarga de fósforo y con ello se enlentecería la progresión de la ERC. P: fósforo; P/U: ratio fósforo/urea; P/Cr: ratio fósforo/creatinina; ERC: enfermedad renal crónica; FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23; FGFR1: receptor 1 del FGF23.



# CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

1. La sobrecarga de fósforo reduce la expresión renal de Klotho a través de la activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina.
2. Los niveles elevados de FGF23 incrementan la expresión renal de FGFR1.
3. El calcitriol previene la reducción de la expresión renal de Klotho inducida por fósforo.
4. El exceso de fosfaturia, en relación con el número de nefronas funcionales, puede ser responsable de una resistencia renal de FGF23 mediante la inhibición de Klotho a nivel renal.
5. En pacientes con síndrome metabólico y ERC moderada estadios 2-3, la fosfaturia se asocia a deterioro de la función renal.
6. Los estudios experimentales han demostrado que el exceso de fosfaturia se asocia con lesión renal, inflamación, estrés oxidativo y disminución de klotho a nivel renal.
7. La proporción entre fósforo y urea excretada en orina aumenta con la cantidad relativa de fósforo inorgánico ingerido, por lo que el ratio P/U en orina de 24h es un marcador de ingesta de fósforo inorgánico.



# BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F, EPIRCE Study Group. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología*. 2010;30(1):78–86.
2. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, et al. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrología*. diciembre de 2018;38(6):606–615.
3. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int*. enero de 2014;85(1):49-61.
4. Tonelli M, Wiebe N, Culeton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol*. julio de 2006;17(7):2034-47.
5. Erben RG. Update on FGF23 and Klotho signaling. *Mol Cell Endocrinol*. septiembre de 2016;432:56-65.
6. Scialla JJ, Wolf M. Roles of phosphate and fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol*. mayo de 2014;10(5):268-78.
7. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB, Gaziano JM, et al. Relations of Serum Phosphorus and Calcium Levels to the Incidence of Cardiovascular Disease in the Community. *Arch Intern Med*. 14 de mayo de 2007;167(9):879.
8. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G, Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*. octubre de 2005;112(17):2627–2633.
9. Torregrosa JV, Bover J, Cannata J, Lorenzo V, de Francisco ALM, Martínez I, et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Nefrología para el manejo de las alteraciones del metabolismo óseo-mineral en los pacientes con enfermedad renal crónica (S.E.N.-M.M.). *Nefrología*. febrero de 2011;31(supl 1):3-32.
10. Wolf M. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int*. octubre de 2012;82(7):737-47.
11. Lu X, Hu MC. Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. *Kidney Dis*. 2017;3(1):15-23.

12. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *BoneKEy Rep.* 5 de febrero de 2014;3:497.
13. Block GA, Wheeler DC, Persky MS, Kestenbaum B, Ketteler M, Spiegel DM, et al. Effects of Phosphate Binders in Moderate CKD. *J Am Soc Nephrol.* agosto de 2012;23(8):1407-15.
14. Voormolen N, Noordzij M, Grootendorst DC, Beetz I, Sijkens YW, van Manen JG, et al. High plasma phosphate as a risk factor for decline in renal function and mortality in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 7 de julio de 2007;22(10):2909-16.
15. McGovern AP, de Lusignan S, van Vlymen J, Liyanage H, Tomson CR, Gallagher H, et al. Serum Phosphate as a Risk Factor for Cardiovascular Events in People with and without Chronic Kidney Disease: A Large Community Based Cohort Study. Kronenberg F, editor. *PLoS ONE.* 10 de septiembre de 2013;8(9):e74996.
16. Yoo KD, Kang S, Choi Y, Yang SH, Heo NJ, Chin HJ, et al. Sex, Age, and the Association of Serum Phosphorus With All-Cause Mortality in Adults With Normal Kidney Function. *Am J Kidney Dis.* enero de 2016;67(1):79-88.
17. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, et al. Dietary Phosphorus Acutely Impairs Endothelial Function. *J Am Soc Nephrol.* julio de 2009;20(7):1504-12.
18. de Oca AM, Madueño JA, Martínez-Moreno JM, Guerrero F, Muñoz-Castañeda J, Rodríguez-Ortiz ME, et al. High-phosphate-induced calcification is related to SM22 $\alpha$  promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res.* septiembre de 2010;25(9):1996-2005.
19. Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S, Hirohama D, Majtan B, Shimizu Y, et al. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int.* mayo de 2014;85(5):1103–1111.
20. Mendoza FJ, Lopez I, Montes de Oca A, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats. *Kidney Int.* febrero de 2008;73(4):407-14.
21. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* febrero de 2008;73(3):300–307.
22. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Min*

Res. julio de 1996;11(7):970–976.

23. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med.* febrero de 2010;61(1):91-104.
24. Pfister MF, Lederer E, Forgo J, Ziegler U, Lötscher M, Quabius ES, et al. Parathyroid Hormone-dependent Degradation of Type II Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> Cotransporters. *J Biol Chem.* 8 de agosto de 1997;272(32):20125-30.
25. Kendrick J, Kestenbaum B, Chonchol M. Phosphate and Cardiovascular Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* marzo de 2011;18(2):113-9.
26. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* diciembre de 2007;117(12):4003–4008.
27. Allon M, Rodriguez M, Llach F. Insulin in the acute renal adaptation to dietary phosphate restriction in the rat. *Kidney Int.* enero de 1990;37(1):14-20.
28. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Ren Physiol.* agosto de 2009;297(2):F282–291.
29. Trautvetter U, Jahreis G, Kiehntopf M, Gleit M. Consequences of a high phosphorus intake on mineral metabolism and bone remodeling in dependence of calcium intake in healthy subjects – a randomized placebo-controlled human intervention study. *Nutr J.* diciembre de 2015;15(1):7.
30. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for phosphorus. *EFSA J.* 2015;13:4185.
31. Chang AR, Lazo M, Appel LJ, Gutiérrez OM, Grams ME. High dietary phosphorus intake is associated with all-cause mortality: results from NHANES III. *Am J Clin Nutr.* 1 de febrero de 2014;99(2):320-7.
32. Kalantar-Zadeh K, Gutekunst L, Mehrotra R, Kovesdy CP, Bross R, Shinaberger CS, et al. Understanding sources of dietary phosphorus in the treatment of patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* marzo de 2010;5(3):519–530.



33. on behalf of the ERA–EDTA Working Group on Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorders and the European Renal Nutrition Working Group, Vervloet MG, Sezer S, Massy ZA, Johansson L, Cozzolino M, et al. The role of phosphate in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* enero de 2017;13(1):27-38.
34. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* julio de 2017;7(1):1-59.
35. Patel L, Bernard LM, Elder GJ. Sevelamer Versus Calcium-Based Binders for Treatment of Hyperphosphatemia in CKD: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5 de febrero de 2016;11(2):232-44.
36. Sekercioglu N, Thabane L, Díaz Martínez JP, Nesrallah G, Longo CJ, Busse JW, et al. Comparative Effectiveness of Phosphate Binders in Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. Barretti P, editor. *PLOS ONE.* 8 de junio de 2016;11(6):e0156891.
37. White KE, Evans WE, O’Riordan JLH, Speer MC, Econs MJ, Lorenz-Depiereux B, et al. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet.* noviembre de 2000;26(3):345-8.
38. Ito N, Wijenayaka AR, Prideaux M, Kogawa M, Ormsby RT, Evdokiou A, et al. Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli. *Mol Cell Endocrinol.* enero de 2015;399:208-18.
39. Andrukhova O, Bayer J, Schüler C, Zeitz U, Murali SK, Ada S, et al. Klotho Lacks an FGF23-Independent Role in Mineral Homeostasis. *J Bone Min Res.* junio de 2017;32(10):2049-2061.
40. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J Bone Miner Res.* 29 de diciembre de 2003;19(3):429-35.
41. Bourgeois S, Capuano P, Stange G, Mühlemann R, Murer H, Biber J, et al. The phosphate transporter NaPi-IIa determines the rapid renal adaptation to dietary phosphate intake in mouse irrespective of persistently high FGF23 levels. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* noviembre de 2013;465(11):1557-72.
42. Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on

renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2–SGK1 signaling pathway. *Bone*. septiembre de 2012;51(3):621-8.

43. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice With a Defect of *klotho* Gene Expression. *Circulation*. 13 de abril de 2004;109(14):1776-82.
44. Canalejo R, Canalejo A, Martínez-Moreno JM, Rodríguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol*. julio de 2010;21(7):1125–1135.
45. Rodríguez-Ortiz ME, López I, Muñoz-Castañeda JR, Martínez-Moreno JM, Ramírez AP, Pineda C, et al. Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol*. julio de 2012;23(7):1190–1197.
46. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, et al. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol*. septiembre de 2007;18(9):2600-8.
47. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Roberts WL, Smits G, et al. FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *J Am Soc Nephrol*. octubre de 2011;22(10):1913–1922.
48. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V, Lanske B, et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. junio de 2014;6(6):744-59.
49. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M-C, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. noviembre de 2011;121(11):4393–4408.
50. Silswal N, Touchberry CD, Daniel DR, McCarthy DL, Zhang S, Andresen J, et al. FGF23 directly impairs endothelium-dependent vasorelaxation by increasing superoxide levels and reducing nitric oxide bioavailability. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1 de septiembre de 2014;307(5):E426-36.
51. Ärnlöv J, Carlsson AC, Sundström J, Ingelsson E, Larsson A, Lind L, et al. Serum FGF23 and Risk of Cardiovascular Events in Relation to Mineral Metabolism and Cardiovascular Pathology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 7 de mayo de 2013;8(5):781-6.
52. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast

Growth Factor 23 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis. *N Engl J Med.* 7 de agosto de 2008;359(6):584-92.

53. Shalhoub V, Shatzen EM, Ward SC, Davis J, Stevens J, Bi V, et al. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease–associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J Clin Invest.* 2 de julio de 2012;122(7):2543-53.
54. Dhingra R, Gona P, Benjamin EJ, Wang TJ, Aragam J, D'Agostino RB, et al. Relations of serum phosphorus levels to echocardiographic left ventricular mass and incidence of heart failure in the community. *Eur J Heart Fail.* agosto de 2010;12(8):812-8.
55. Grabner A, Schramm K, Silswal N, Hendrix M, Yanucil C, Czaya B, et al. FGF23/FGFR4-mediated left ventricular hypertrophy is reversible. *Sci Rep.* diciembre de 2017;7(1):1993.
56. Antoine M, Wirz W, Tag CG, Mavituna M, Emans N, Korff T, et al. Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth Factors.* junio de 2005;23(2):87-95.
57. Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP, Isakova T, Yang H-Y, Crouthamel MH, et al. Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int.* junio de 2013;83(6):1159–1168.
58. Brunton, Hilal-Dandan,Knollmann. *The pharmacological basis of therapeutics.* 13th edition. McGraw-Hill Education; 2018.
59. Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* marzo de 2013;14(3):166-80.
60. Wu A-L, Feng B, Chen MZ, Kolumam G, Zavala-Solorio J, Wyatt SK, et al. Antibody-Mediated Activation of FGFR1 Induces FGF23 Production and Hypophosphatemia. Makishima M, editor. *PLoS ONE.* 22 de febrero de 2013;8(2):e57322.
61. Gattineni J, Alphonse P, Zhang Q, Mathews N, Bates CM, Baum M. Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 1 de febrero de 2014;306(3):F351-8.
62. Hassan A, Durlacher K, Silver J, Naveh-Many T, Levi R. The fibroblast growth factor receptor mediates the increased FGF23 expression in acute and chronic uremia. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 1 de febrero de 2016;310(3):F217-21.

63. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. noviembre de 1997;390(6655):45-51.
64. Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu M-C, et al.  $\alpha$ -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature*. enero de 2018;553(7689):461-466.
65. Xie J, Yoon J, An S-W, Kuro-o M, Huang C-L. Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate. *J Am Soc Nephrol*. mayo de 2015;26(5):1150-60.
66. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. enero de 2011;22(1):124-36.
67. Hu MC, Shi M, Cho HJ, Adams-Huet B, Paek J, Hill K, et al. Klotho and Phosphate Are Modulators of Pathologic Uremic Cardiac Remodeling. *J Am Soc Nephrol*. junio de 2015;26(6):1290-302.
68. Laina A, Stellos K, Stamatelopoulos K. Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Exp Gerontol*. agosto de 2018;109:16-30.
69. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. diciembre de 2006;444(7120):770–774.
70. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. *J Biol Chem*. 11 de noviembre de 2005;280(45):38029-34.
71. Kurosu H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science*. 16 de septiembre de 2005;309(5742):1829-33.
72. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, et al. Klotho suppresses TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- $\kappa$ B activation. *Endocrine*. junio de 2009;35(3):341-6.
73. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$  Klotho. *J Am Soc Nephrol*. enero de 2016;27(1):79-90.

74. Olauson H, Vervloet MG, Cozzolino M, Massy ZA, Ureña Torres P, Larsson TE. New insights into the FGF23-Klotho axis. *Semin Nephrol.* noviembre de 2014;34(6):586-97.
75. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh J-C, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* octubre de 2011;414(3):557-62.
76. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* enero de 2019;15(1):27-44.
77. Liu Z, Zhou H, Chen X, Chen H, Wang Y, Wang T, et al. Relationship between cFGF23/Klotho ratio and phosphate levels in patients with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol.* marzo de 2019;51(3):503-7.
78. Zhou L, Li Y, Zhou D, Tan RJ, Liu Y. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol.* abril de 2013;24(5):771–785.
79. Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Oca AM de, Estepa JC, Canalejo R, et al. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ $\beta$ -catenin activation. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 15 de octubre de 2012;303(8):F1136-44.
80. Guerrero F, Herencia C, Almadén Y, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodríguez-Ortiz ME, et al. TGF- $\beta$  Prevents Phosphate-Induced Osteogenesis through Inhibition of BMP and Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathways. *Chadjichristos C, editor. PLoS ONE.* 27 de febrero de 2014;9(2):e89179.
81. Nelson WJ. Convergence of Wnt, -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science.* 5 de marzo de 2004;303(5663):1483-7.
82. Katoh M, Katoh M. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clin Cancer Res.* 15 de julio de 2007;13(14):4042-5.
83. Anna CH, Iida M, Sills RC, Devereux TR. Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 de julio de 2003;190(2):135-45.
84. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene.* 15 de marzo de 2009;433(1-2):1-7.
85. Li Y, Lu W, King TD, Liu C-C, Bijur GN, Bu G. Dkk1 Stabilizes Wnt Co-Receptor LRP6:

Implication for Wnt Ligand-Induced LRP6 Down-Regulation. Gong C-X, editor. PLoS ONE. 8 de junio de 2010;5(6):e11014.

86. Cselenyi CS, Lee E. Context-dependent activation or inhibition of Wnt-beta-catenin signaling by Kremen. *Sci Signal*. 26 de febrero de 2008;1(8):pe10.
87. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. septiembre de 2002;24(9):811-20.
88. Shao J-S, Cheng S-L, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest*. 2 de mayo de 2005;115(5):1210-20.
89. Faverman L, Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M. Extracellular transglutaminase 2 activates  $\beta$ -catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 30 de abril de 2008;582(10):1552-7.
90. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. diciembre de 2001;25(4):402-8.
91. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 20 de octubre de 2009;120(16):1640-5.
92. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 5 de mayo de 2009;150(9):604.
93. Mataix Verdú J. Tabla de composición de alimentos. 5<sup>a</sup>. Universidad de Granada; 2009.
94. European Food Safety Authority. General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA Journal*. 2009;7:1435.
95. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Forster R, Saini R, Hsieh J-C, et al. The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. *Rev Endocr Metab Disord*. marzo de 2012;13(1):57-69.

96. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y-I. Klotho, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. *Mol Endocrinol*. 1 de diciembre de 2003;17(12):2393-403.
97. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J*. septiembre de 2010;24(9):3438-50.
98. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, et al. The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  Reduce Renal Klotho Expression through NF $\kappa$ B. *J Am Soc Nephrol*. julio de 2011;22(7):1315-25.
99. Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Yoshida S, Shiohira S, Nitta K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant*. 1 de enero de 2010;25(1):60-8.
100. Sastre C, Rubio-Navarro A, Buendía I, Gómez-Guerrero C, Blanco J, Mas S, et al. Hyperlipidemia-Associated Renal Damage Decreases Klotho Expression in Kidneys from ApoE Knockout Mice. Bussolati B, editor. *PLoS ONE*. 30 de diciembre de 2013;8(12):e83713.
101. Sun C-Y, Chang S-C, Wu M-S. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*. abril de 2012;81(7):640-50.
102. Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N. Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int*. junio de 1980;17(6):722-31.
103. Kuro-o M. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. diciembre de 2013;3(5):420-6.
104. Hiyama A, Arai F, Sakai D, Yokoyama K, Mochida J. The effects of oxygen tension and antiaging factor Klotho on the Wnt signaling in nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R105.
105. Quinn SJ, Thomsen ARB, Pang JL, Kantham L, Bräuner-Osborne H, Pollak M, et al. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1 de febrero de 2013;304(3):E310-20.
106. Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD. FGFR3 and FGFR4 Do not Mediate Renal



- Effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol.* diciembre de 2008;19(12):2342-50.
107. Erben RG.  $\alpha$ -Klotho's effects on mineral homeostasis are fibroblast growth factor-23 dependent: *Curr Opin Nephrol Hypertens.* julio de 2018;27(4):229-35.
108. Kaneko I, Segawa H, Ikuta K, Hanazaki A, Fujii T, Tatsumi S, et al. Eldecalcitol Causes FGF23 Resistance for Pi Reabsorption and Improves Rachitic Bone Phenotypes in the Male Hyp Mouse. *Endocrinology.* 1 de julio de 2018;159(7):2741-58.
109. Sarnak MJ, Astor BC. Implications of Proteinuria: CKD Progression and Cardiovascular Outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis.* julio de 2011;18(4):258-66.
110. Martínez-Castelao A, Górriz JL, Bover J, Segura-De la Morena J, Cebollada J, Escalada J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Nefrología.* marzo de 2014;34(2):243-62.
111. Martínez-Moreno JM, Herencia C, de Oca AM, Díaz-Tocados JM, Vergara N, Gómez-Luna MJ, et al. High phosphate induces a pro-inflammatory response by vascular smooth muscle cells and modulation by vitamin D derivatives. *Clin Sci.* julio de 2017;131(13):1449–1463.
112. Ohnishi M, Razzaque MS. Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. *FASEB J.* septiembre de 2010;24(9):3562-71.
113. Di Iorio BR, Bellizzi V, Bellasi A, Torraca S, D'Arrigo G, Tripepi G, et al. Phosphate attenuates the anti-proteinuric effect of very low-protein diet in CKD patients. *Nephrol Dial Transplant.* marzo de 2013;28(3):632-40.
114. Zhou D, Fu H, Zhang L, Zhang K, Min Y, Xiao L, et al. Tubule-Derived Wnts Are Required for Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* agosto de 2017;28(8):2322-36.
115. Uribarri J. Dietary phosphorus and kidney disease: Dietary phosphorus and kidney disease. *Ann N Y Acad Sci.* octubre de 2013;1301(1):11-9.
116. Sakaguchi Y, Iwatani H, Hamano T, Tomida K, Kawabata H, Kusunoki Y, et al. Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int.* octubre de 2015;88(4):833-42.
117. Selamet U, Tighiouart H, Sarnak MJ, Beck G, Levey AS, Block G, et al. Relationship of



dietary phosphate intake with risk of end-stage renal disease and mortality in chronic kidney disease stages 3–5: The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int.* enero de 2016;89(1):176-84.

118. Isakova T. Fibroblast Growth Factor 23 and Risks of Mortality and End-Stage Renal Disease in Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA.* 15 de junio de 2011;305(23):2432.
119. Ellam TJ, Chico TJA. Phosphate: The new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis.* febrero de 2012;220(2):310-8.
120. Rodelo-Haad C, Rodríguez-Ortiz ME, Martín-Malo A, Pendón-Ruiz de Mier MV, Agüera ML, Muñoz-Castañeda JR, et al. Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients. Cozzolino M, editor. *PLOS ONE.* 7 de agosto de 2018;13(8):e0201537.
121. Sherman RA. Dietary Phosphate Restriction and Protein Intake in Dialysis Patients: A Misdirected Focus: DIETARY PHOSPHATE RESTRICTION AND PROTEIN INTAKE. *Semin Dial.* 22 de enero de 2007;20(1):16-8.
122. Martín KJ, González EA. Prevention and Control of Phosphate Retention/Hyperphosphatemia in CKD-MBD: What Is Normal, When to Start, and How to Treat? *Clin J Am Soc Nephrol.* febrero de 2011;6(2):440-6.
123. Palomino HL, Rifkin DE, Anderson C, Criqui MH, Whooley MA, Ix JH. 24-Hour Urine Phosphorus Excretion and Mortality and Cardiovascular Events. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3 de julio de 2013;8(7):1202-10.
124. Ix JH, Anderson CA, Smits G, Persky MS, Block GA. Effect of dietary phosphate intake on the circadian rhythm of serum phosphate concentrations in chronic kidney disease: a crossover study. *Am J Clin Nutr.* 1 de noviembre de 2014;100(5):1392-7.
125. Stremke ER, McCabe LD, McCabe GP, Martín BR, Moe SM, Weaver CM, et al. Twenty-Four-Hour Urine Phosphorus as a Biomarker of Dietary Phosphorus Intake and Absorption in CKD: A Secondary Analysis from a Controlled Diet Balance Study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 6 de julio de 2018;13(7):1002-12.
126. Caravaca F, Caravaca-Fontán F, Azevedo L, Luna E. Cómo estimar la eficacia de un captor del fósforo. *Nefrología.* mayo de 2017;37(3):311-9.
127. Gutiérrez OM. Sodium- and Phosphorus-Based Food Additives: Persistent but Surmountable Hurdles in the Management of Nutrition in Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic*

Kidney Dis. marzo de 2013;20(2):150-6.

128. Chang AR, Anderson C. Dietary Phosphorus Intake and the Kidney. *Annu Rev Nutr.* 21 de agosto de 2017;37(1):321-46.
129. Moe SM, Zidehsarai MP, Chambers MA, Jackman LA, Radcliffe JS, Trevino LL, et al. Vegetarian Compared with Meat Dietary Protein Source and Phosphorus Homeostasis in Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* febrero de 2011;6(2):257-64.
130. Tsai W-C, Wu H-Y, Peng Y-S, Hsu S-P, Chiu Y-L, Chen H-Y, et al. Effects of lower versus higher phosphate diets on fibroblast growth factor-23 levels in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1 de noviembre de 2018;33(11):1977-83.



## **8. ANEXOS**

**8.1 Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. FASEB J. 2017; 31 (9): 3858-3867. (Bloque 1)**

**8.2 Increased phosphaturia accelerates the decline in renal function: a search for mechanisms. Sci Rep. 2018; 8: 13701-13714. (Bloque 2)**

**8.3 Phosphaturia and the source of dietary phosphate in patients with chronic kidney disease (En revision). (Bloque 3)**

## Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats

Juan R. Muñoz-Castañeda,<sup>\*,†,‡,§,1</sup> Carmen Herencia,<sup>\*,†,¶,1</sup> Maria Victoria Pendón-Ruiz de Mier,<sup>\*,†,¶</sup> Maria Encarnación Rodríguez-Ortiz,<sup>||</sup> Juan M. Diaz-Tocados,<sup>\*,†,¶</sup> Noemi Vergara,<sup>\*,†,¶</sup> Julio M. Martínez-Moreno,<sup>\*,†,¶</sup> Maria Dolores Salmerón,<sup>\*,†,¶</sup> William G. Richards,<sup>#</sup> Arnold Felsenfeld,<sup>\*\*</sup> Makoto Kuro-O,<sup>††</sup> Yolanda Almadén,<sup>\*,†,‡,§,2</sup> and Mariano Rodríguez,<sup>\*,†,‡,§,2,3</sup>

<sup>\*</sup>Instituto Maimónides para la Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain; <sup>†</sup>Unidad de Gestión Clínica (UGC) Nefrología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain; <sup>‡</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; <sup>§</sup>Red Nacional de Investigación en Nefrología (REDinREN) and <sup>§§</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain; <sup>¶</sup>Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain; <sup>||</sup>Laboratorio de Nefrología, REDinREN, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; <sup>#</sup>Amgen Inc., Thousand Oaks, California, USA; <sup>\*\*</sup>Department of Medicine, Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System and the David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California, USA; <sup>††</sup>Division of Anti-Aging Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Japan; and <sup>‡‡</sup>UGC Medicina Interna, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

**ABSTRACT:** In renal failure, hyperphosphatemia occurs despite a marked elevation in serum fibroblast growth factor (FGF)-23. Abnormal regulation of the FGFR1-Klotho receptor complex may cause a resistance to the phosphaturic action of FGF23. The purpose of the present study was to investigate the regulation of renal Klotho and FGF receptor (FEFR)-1 in healthy and uremic rats induced by 5/6 nephrectomy. In normal rats, the infusion of rat recombinant FGF23 enhanced phosphaturia and increased renal FGFR1 expression; however, Klotho expression was reduced. Uremic rats on a high-phosphate (HP) diet presented hyperphosphatemia with marked elevation of FGF23 and an increased fractional excretion of phosphate (P) that was associated with a marked reduction of Klotho expression and an increase in FGFR1. After neutralization of FGF23 by anti-FGF23 administration, phosphaturia was still abundant, Klotho expression remained low, and the FGFR1 level was reduced. These results suggest that the expression of renal Klotho is modulated by phosphaturia, whereas the FGFR1 expression is regulated by FGF23. Calcitriol (CTR) administration prevented a decrease in renal Klotho expression. In HEK293 cells HP produced nuclear translocation of  $\beta$ -catenin, together with a reduction in Klotho. Wnt/ $\beta$ -catenin inhibition with Dkk-1 prevented the P-induced down-regulation of Klotho. The addition of CTR to HP medium was able to recover Klotho expression. In summary, high FGF23 levels increase FGFR1, whereas phosphaturia decreases Klotho expression through the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.—Muñoz-Castañeda, J. R., Herencia, C., Pendón-Ruiz de Mier, M. V., Rodríguez-Ortiz, M. E., Diaz-Tocados, J. M., Vergara, N., Martínez-Moreno, J. M., Salmerón, M. D., Richards, W. G., Felsenfeld, A., Kuro-O, M., Almadén, Y., Rodríguez, M. Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. *FASEB J.* 31, 000–000 (2017). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

**KEY WORDS:** phosphaturia · FGF23 · mineral metabolism · chronic kidney disease

Fibroblast growth factor (FGF)-23 is produced by osteocytes and acts on a kidney-specific receptor, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1-Klotho, to decrease both tubular reabsorption of phosphate (P) and synthesis of

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol, or CTR) (1). Lack of FGF23 causes hyperphosphatemia, increased production of CTR, and vascular calcification (2). FGF23 also inhibits parathyroid hormone (PTH) secretion by acting on its specific receptor, which is also expressed on parathyroid cells (3, 4). The serum level of FGF23 increases during the early development of renal failure and contributes to the control of P by enhancing phosphaturia, but it also causes a reduction in CTR production that is commonly observed even at early stages of renal failure (5). It is widely accepted that FGF23 plays an essential role in the development of chronic kidney disease (CKD) and mineral and bone disorders. A high concentration of FGF23 is also associated with mortality (6), left ventricular hypertrophy (7), and progressive deterioration of renal function (8).

**ABBREVIATIONS:** CKD, chronic kidney disease; CTR, calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>); Fe P, fractional excretion of phosphate; FGF, fibroblast growth factor 3; FGFR, fibroblast growth factor receptor, HEK293, human embryonic kidney 293 cell; HP, high phosphate; LP, low phosphate; NP, normal phosphate; Nx, nephrectomized; P, phosphate; PTH, parathyroid hormone

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup> Correspondence: Servicio de Nefrología (REDinREN), Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Avd. Menéndez-Pidal s/n., 14004 Córdoba, Spain. E-mail: [marianorodriguezportillo@gmail.com](mailto:marianorodriguezportillo@gmail.com)

doi: 10.1096/fj.201700006R

FGF23 interacts with its cell membrane receptor FGFR1, which is coexpressed with the Klotho molecule that acts as coreceptor by increasing the affinity of FGF23 to its specific receptor FGFR1 (9). It is well known that the renal expression of Klotho is reduced in renal failure (10); however, the underlying mechanisms are not well defined. The reduction in Klotho may impair the ability of FGF23 to induce phosphaturia. It would be helpful to identify mechanisms whereby kidney Klotho expression is modulated, because the effectiveness of FGF23 in controlling P balance may be conditioned to the expression of renal Klotho.

We hypothesize that some of the factors that are modified by a reduction in renal function, such as high FGF23 levels, high serum P, tubular load of P, and low CTR, may affect renal Klotho expression. It is not known whether the reduction in Klotho in renal failure is accompanied by changes in FGFR1 expression. In fact, the regulation of FGFR1 in the setting of renal failure is not well characterized. Better understanding of the regulation of renal expression of Klotho and FGFR1 in renal failure could help to design new targets and strategies to enhance FGF23-induced phosphaturia in CKD.

It has been demonstrated (11, 12) that canonical Wnt signaling activation is essential for the commitment of pluripotent mesenchymal cells. Its activation mediates osteogenic transdifferentiation and is a key mechanism for the development of vascular calcification. Within the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, there are a large family of ligands (Wnt) able to bind to the complex formed by the Frizzled receptor protein family and the lipoprotein receptor-related 5/6 proteins. The activation of this canonical pathway prevents the phosphorylation and degradation of  $\beta$ -catenin; thus, non-phosphorylated  $\beta$ -catenin is translocated into the nucleus to regulate the expression of target genes (13, 14). In the present study, it is postulated that high phosphate (HP) concentration may affect Wnt pathway activity of renal tubular cells.

The purpose of the present study was to identify the factors involved in the regulation of renal expression of Klotho and FGFR1 in healthy and uremic rats and to investigate mechanisms involved in Klotho regulation *in vitro* in cultured human embryonic kidney (HEK) 293 cells. Specifically, we wanted to assess whether P intake, FGF23 levels, and CTR play independent roles in the regulation of kidney Klotho and FGFR1.

## MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats, 9–10 wk old (230–260 g), were housed in a 12/12 h light–dark cycle and given *ad libitum* access to a standard diet containing 0.6% Ca and 0.6% P. Appropriate measures were taken to ensure animal welfare and to address basic behavior and physiologic needs. At the end of the experiment, euthanasia was performed by aortic puncture and exsanguination under general anesthesia (20 mg/kg thiopental sodium, *i.p.*). Procedures were performed according to the following experiments.

### Experiment 1: analysis of recombinant FGF23 administration on renal Klotho and FGFR expression in normal rats

Rats with normal renal function were separated into 2 groups. Group I ( $n = 6$ ) received vehicle (Veh) of rFGF23 *via* miniosmotic

pump during a 14-d period. Group II ( $n = 6$ ) received rFGF23 15  $\mu\text{g}/\text{d}$  *via* miniosmotic pump. This dose of rFGF23 was used in previous studies by us and others (3, 4). To avoid rFGF23 induced hypophosphatemia, dietary P was moderately increased (0.9%) in all rats; likewise, to prevent a decline in CTR caused by FGF23 excess, all rats received CTR supplementation (8 ng/rat, *i.p.*, 3 $\times$ /wk).

### Experiment 2: study of the effects of high serum FGF23, secondary to renal failure with a HP diet, on renal Klotho and FGFR1 expression

The objective was to analyze renal Klotho and FGFR1 expression in a condition where the increase in serum FGF23 was secondary to a P overload, as commonly observed in renal failure, with no restriction in P intake. The rats were separated into 2 groups. Group III were 5/6 nephrectomized rats fed a low P (LP) diet (Nx-LP) containing 0.6% Ca and 0.2% P ( $n = 7$ ). Group IV were 5/6 Nx rats ( $n = 10$ ) on an unrestricted HP diet (Nx-HP) containing 0.6% Ca and 1.2% HP.

To separate the effects of high FGF23 levels from an HP load, another group of 5/6 Nx rats received an anti-FGF23 neutralizing antibody and were maintained with the same HP diet (1.2%). Group V 5/6 Nx rats ( $n = 10$ ) fed a normal phosphate (NP) diet received anti-FGF23 (Nx-HP+anti-FGF23), administered at 0.75 mg/kg weight, *i.p.*, 3 $\times$ /wk. All rats were maintained for 14 d after 5/6 Nx.

### Experiment 3: effect of CTR on renal Klotho and FGFR1 expression in rats with renal failure

The 2 following groups were included to evaluate the effect of CTR. Group VI Nx rats received vehicle (normal saline) intraperitoneally and were fed a standard diet (0.6% Ca, 0.6% P) for 5 d ( $n = 7$ ). Group VII were 5/6 Nx rats receiving CTR (Nx-CTR). These Nx rats ( $n = 7$ ) were fed the same diet as the Group VI rats but received CTR 20 ng, *i.p.*, 3 $\times$ /wk.

### Experiment 4: *in vitro* effect of P on Klotho expression: role of the Wnt pathway

The goal of this experiment was to investigate *in vitro* whether HP concentration modifies the expression of Klotho and FGFR1 in renal cells. HEK-293 (Lonza, Walkersville, MD, USA) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Bio Whittaker; Verviers, Belgium), sodium pyruvate (1 mM), glutamine (4.5 g/L), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), and HEPES (20 mM) (all reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were seeded at 20,000 cell/cm<sup>2</sup>, and treatments were started once 90% confluence was achieved. Cells of passage 5–10 were used in the experiments. Klotho and FGFR1 expressions were evaluated in control cells (control) and in HP, which was added in the form of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1:2 proportion (Sigma-Aldrich) to obtain a final P concentration of 3.3 mM. The medium was replaced daily with fresh medium. Real-time PCR of human Klotho and FGFR1 (primer sequences listed in Table 1) and Western blot of Klotho were performed after 5 d of treatment.

Additional experiments were designed to evaluate a potential effect of P on Wnt pathway activity in HEK-293 cells. Human recombinant Dickkopf-related protein-1 (Dkk1) 100 ng/ml (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), an inhibitor of the Wnt pathway, was added to the HP medium (P+Dkk1). Nuclear colocalization of  $\beta$ -catenin was analyzed by confocal microscopy. ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used to analyze confocal immunofluorescence staining. Mander's coefficient M2 plug-in [percentage of above-background blue pixels (DAPI) that overlap above-background



TABLE 1. Sequences of primers for membrane Klotho and GAPDH

Variable	Primer, 5'–3'	
	Forward	Reverse
Rat GAPDH	AGGGCTGCCTTCTCTTGTGAC	TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG
Rat membrane Klotho	CTCTGAAAGCCTACGTGTTGG	TAGAAACGAGATGAAGGCCAG
Human GAPDH	TGATGACATCAAGAAGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT
Human membrane Klotho	CCACTCGAAACCATCCATGAG	GACCACCAAGAGAGATGATGC

green pixels ( $\beta$ -catenin)] was used to quantify nuclear colocalization. This software was also used to quantify the average relative density of bands normalized to loading controls. *In vitro* experiments were performed 3 times.

### Experiment 5: *in vitro* effect of CTR on Klotho

HEK-293 cells were cultured with high levels of P (3.3 mM, in the form of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in 1:2 proportion; Sigma-Aldrich), with or without CTR ( $10^{-9}$  M). After 5 d of culture, mRNA expression of transmembrane Klotho and Western blot was evaluated. *In vitro* experiments were performed 3 times.

### Experimental procedures

#### 5/6 Nephrectomy

Renal failure was induced by 5/6 Nx, a 2-step procedure. Rats were anesthetized with xylazine (5 mg/kg i.p.) and ketamine (80 mg/kg, i.p.), and a 5- to 8-mm incision was made on the left mediolateral surface of the abdomen. The left kidney was exposed, and the 2 poles (two-thirds of the renal mass) were ablated. After 1 wk, rats were reanesthetized, and the complete right kidney was removed. Adrenal glands were left in place. The rats were fed the corresponding diet 2 d after the second surgery. All diets were obtained from Altromin, Lage, Germany.

#### Continuous infusion of rFGF23 or anti-FGF23 antibody

High levels of FGF23 in normal rats were achieved by the infusion of rat rFGF23 (15  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) for 14 d. In brief, with the rat under general anesthesia (Sevoflurane; Abbott, Madrid, Spain), a miniosmotic Alzet pump (model 2002; Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) was implanted subcutaneously between the shoulders. The osmotic pump was filled under aseptic conditions with rat rFGF23 (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, USA) diluted in A5Su pH 5.0 buffer acetic acid and sucrose. The pump provided continuous infusion and ensured a constant delivery of 0.5  $\mu\text{l}/\text{h}$  during a 2-wk period.

To neutralize the effect of FGF23, rats received anti-FGF23 antibody, i.p., 0.75 mg/kg weight  $3\times/\text{wk}$ . The rat anti-FGF23 antibody was donated by Amgen, Inc. The information regarding generation and dosage of the antibody was previously published by Shalhoub *et al.* (2). The efficiency of rFGF23 or anti-FGF23 infusion was assessed by measuring fractional excretion of phosphate (Fe P). Rats were placed in metabolic cages to collect 24 h urine at d 13. The volume of urine collected over 24 h was measured, and aliquots were stored for measurement of P and creatinine.

#### Biochemical determinations

Blood was collected from the abdominal aorta at death, and the plasma and serum obtained were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until the

measurement of biochemical parameters. In rats receiving CTR, blood was collected 48 h after the last CTR intraperitoneal injection. Serum and plasma were separated by centrifugation. Serum ionized Ca level was determined using a Spotlyte  $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}$  Analyzer (Menarini Diagnostics, Barcelona, Spain). Intact rat PTH level was quantified by ELISA (Immutopics, San Clemente, CA, USA). Serum creatinine and P concentrations were measured by spectrophotometry (Sigma Diagnostics, Livonia MI, USA). Serum CTR concentration was quantified by radioimmunoassay (ImmunoDiagnostic Systems, Boldon, United Kingdom). FGF23 levels were determined with a rat FGF23 kit (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan).

#### Processing of renal tissue

After it was washed with cold saline solution, the remnant kidney was rapidly removed for biochemical examination. Kidney specimens were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for Western blot or mRNA analyses (FGFR1 and Klotho). For Western blot analyses, renal lysates were obtained by mechanical disruption of kidney in lysis solution [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM Neocuproine, 1% Triton X-100, and 1 mM PMSF plus aprotinin and leupeptin], incubating on ice for 15 min and centrifugation at 10,000 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Supernatants were collected, and proteins were quantified with Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples from each group were pooled for Western blot analysis of FGFR1 and renal Klotho expression.

#### RT-PCR analyses

Analyses of FGFR1 and Klotho mRNA were performed by quantitative PCR. Total RNA from renal samples was extracted with Trizol reagent and a total RNA extraction kit from Intron Biotechnology, Seongnam, South Korea) according to the manufacturer's recommendations. The expression of mRNA was examined with the Light Cycler thermal cycler system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). RT-PCR was performed in 1 step, with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Human and rat FGFR1 primers were purchased from Qiagen. Human and rat primers for Klotho were designed with the free Oligo 7 software (<http://www.oligo.net/>), and the sequence is listed in Table 1. Results were normalized to that of GAPDH. Quantification of relative expression was determined by the  $2^{(-\Delta\text{Ct})}$  method.

#### Western blot analysis for FGFR1 and Klotho

The expressions of FGFR1 and Klotho were determined by Western blot. Protein (50  $\mu\text{g}$ ) from renal lysates or HEK cells were separated in 7% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were incubated in blocking solution. Anti-FGFR1 antibody (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Genetex, Irvine, CA, USA) and rat anti-Klotho antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Transgenic, Kobe, Japan) were used as primary antibodies

diluted in Tween Tris buffered saline (Sigma-Aldrich) containing 5% bovine serum albumin.  $\beta$ -Actin (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) or  $\alpha$ -tubulin (1:10,000; Abcam, Cambridge, United Kingdom), which were used as a house-keeping protein to ensure the equal loading of the gels. Blots were immunolabeled using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and revealed using the ECL Advance Western blot detection system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

All experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Córdoba and Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), and all rats received humane care in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research.

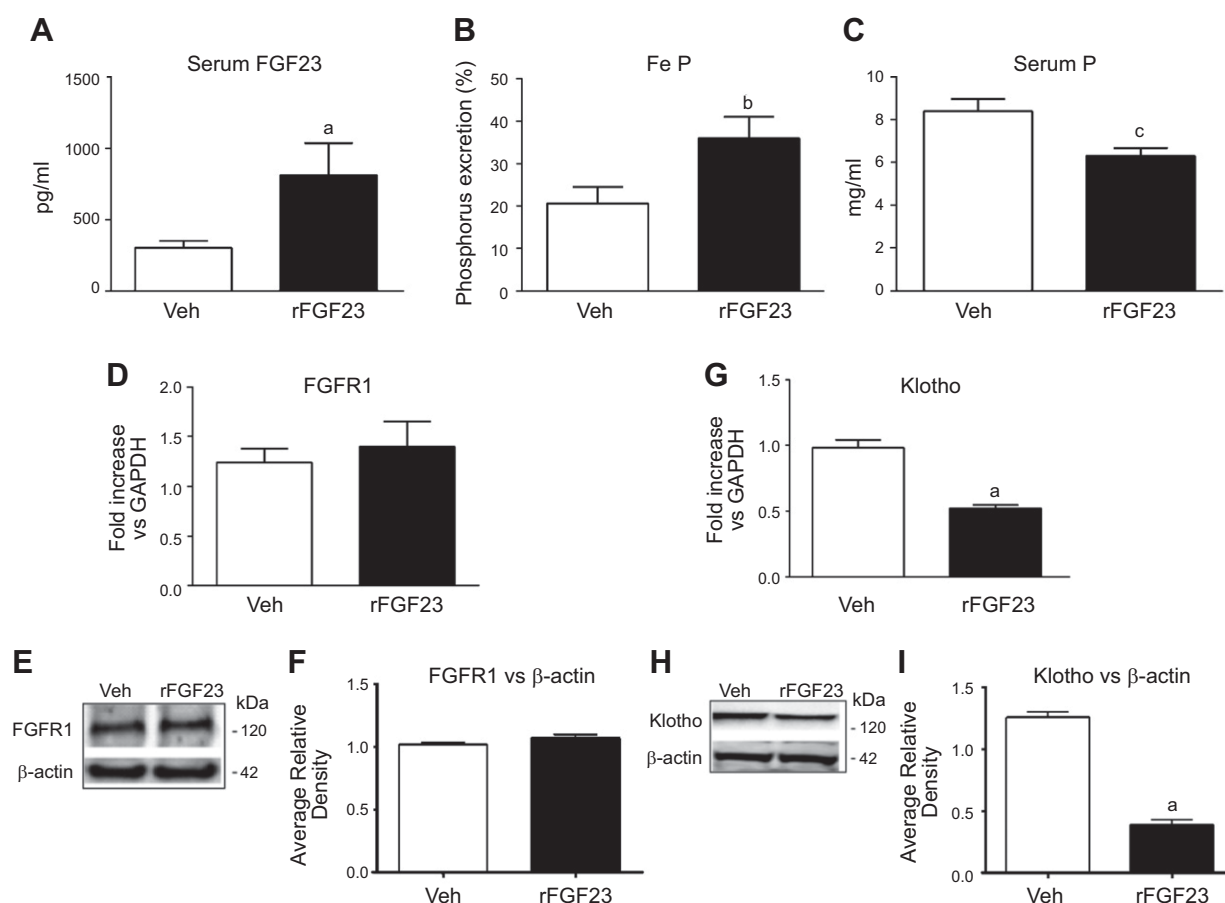
## Statistics

Values are expressed as the means  $\pm$  SD. The difference between means of more than 2 groups was assessed by ANOVA followed by Duncan *post hoc* analysis. Comparison of means from 2 different groups was evaluated by unpaired Student's *t* test. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine whether data were normally distributed.

## RESULTS

The continuous infusion of rFGF23 *via* Alzet pump for 14 d increased the serum concentration of FGF23 by 3-fold (Fig. 1A). The elevation in serum FGF23 concentration was associated with an increase in fractional Fe P (Fig. 1B) and a moderate reduction in serum P concentration (Fig. 1C). In normal adult rats fed a normal P diet (0.6%) the mean serum FGF23 concentration was  $134 \pm 17$  pg/ml. At 14 d, there were no significant differences between Veh and rFGF23 rats in serum levels of PTH and CTR (Table 2). Gene and protein expression of FGFR1 were similar in rats receiving rFGF23 and vehicle (Fig. 1D–F). However, the administration of rFGF23 was associated with a significant reduction in renal expression of Klotho (Fig. 1G–I).

Serum FGF23 concentration was markedly elevated in uremic rats fed an HP diet (Nx-HP), as compared with uremic rats consuming an LP diet (Nx-LP) ( $6932 \pm 1688$  vs.  $190 \pm 76.1$  pg/ml; mean  $\pm$  SD) (Fig. 2A). Fe P and serum P were increased in Nx-HP vs. Nx-LP (Fig. 2B, C respectively). In the Nx-HP group, hyperparathyroidism was evident, and rats had low CTR levels (Table 2). In Nx-HP rats, the high FGF23 level was associated with an



**Figure 1.** Effects of high FGF23 on renal FGFR1 and Klotho in healthy rats. A–C) Serum levels of FGF23 (A), Fe P (B), and serum levels of P (C) after infusion of recombinant (r)FGF23 or vehicle (Veh). D) mRNA expression and (E) protein of renal FGFR1. F) Quantification was performed by measurement of average relative density and normalized to  $\beta$ -actin levels. G, H) Renal Klotho mRNA (G) and Klotho protein (H). I) Quantification was performed by measurement of average relative density and normalized to  $\beta$ -actin levels. Image is representative of a pool from animals in each group. Values are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 6$  per group). Significant differences between treatments with rFGF23 and vehicle. <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> $P < 0.01$ .



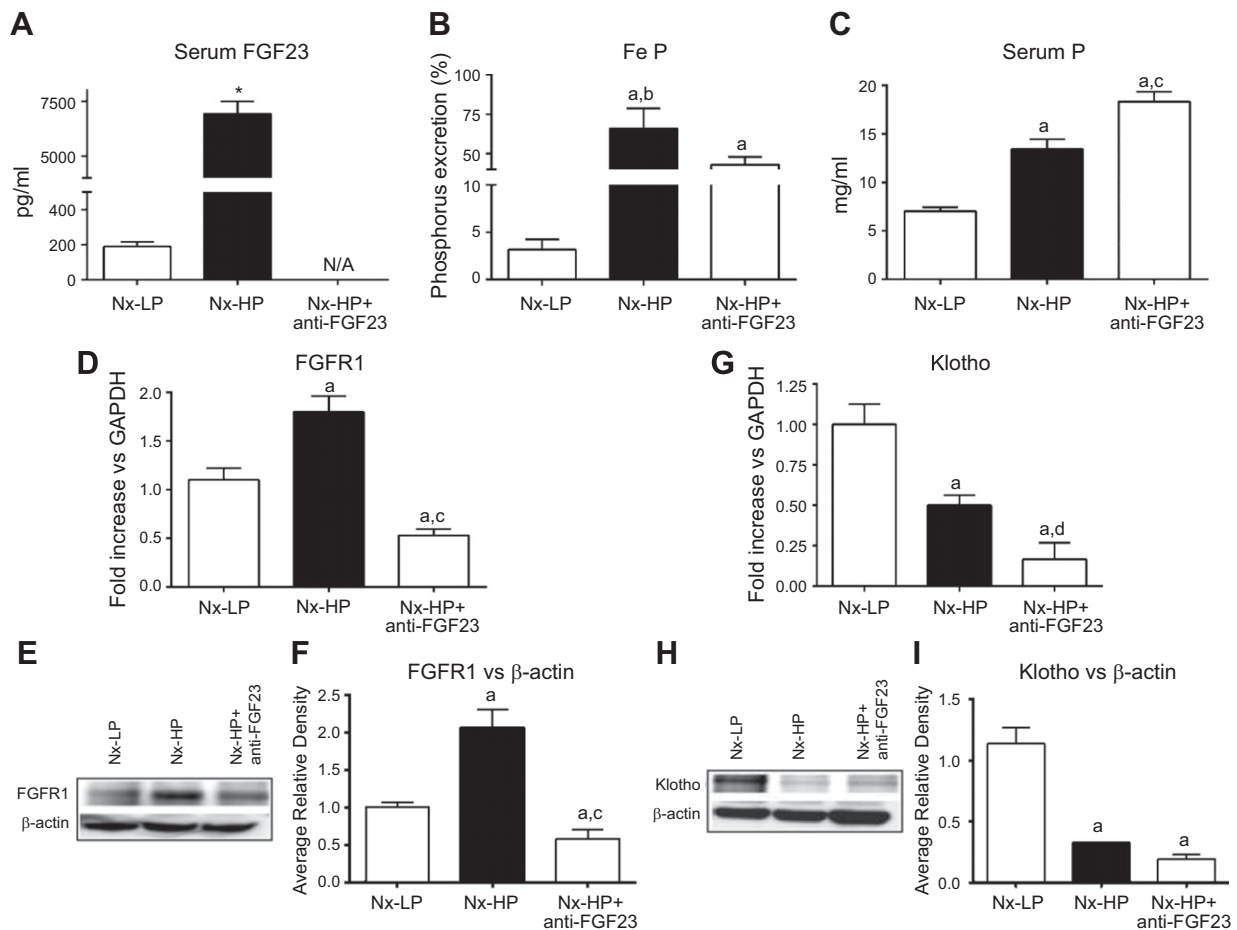
TABLE 2. Biochemical parameters related to renal function and mineral metabolism

Experiment	Treatment	Serum creatinine (mg/dl)	Ca <sup>2+</sup> (mM)	PTH (pg/ml)	CTR (pg/ml)
1	Veh	0.52 ± 0.22	1.24 ± 0.03	52 ± 18.2	215 ± 32
	rFGF23	0.48 ± 0.14	1.23 ± 0.03	50 ± 10.9	183 ± 45
2	Nx - LP	0.91 ± 0.11	1.22 ± 0.03	59 ± 15	193 ± 26
	Nx - HP	1.05 ± 0.24	1.04 ± 0.06*	1111 ± 306*	82 ± 27*
	Nx-HP-Anti-FGF23	1.5 ± 0.6*	1.18 ± 0.07†	896 ± 531*	171 ± 20††
3	Nx + NP	0.92 ± 0.20	1.19 ± 0.04	181 ± 23†††	173 ± 22
	Nx + NP + CTR	1.18 ± 0.29	1.38 ± 0.09††	80 ± 2†††	214 ± 31‡

\**P* < 0.001 vs. Nx-LP; †*P* < 0.05 vs. Nx-HP; ††*P* < 0.001; ‡*P* < 0.05 vs. Nx+NP; †††*P* < 0.01; ††††*P* < 0.001.

increase in FGFR1 protein and gene expression (Fig. 2D–F); by contrast, gene and protein expression of renal Klotho were markedly reduced (Fig. 2G–I). Thus, the very high levels of FGF23 observed in Nx-HP produced divergent effects on FGFR1 and Klotho. To separate the effects of high

serum FGF23 from that of P overload, an additional group of Nx-HP rats received anti-FGF23 (Nx-HP+anti-FGF23) to neutralize the effect of the high FGF23 levels. The administration of anti-FGF23 resulted in a reduction in Fe P (Fig. 2B) and a further increase in serum P (Fig. 2C), showing the



**Figure 2.** Effects of high FGF23 on renal FGFR1 and Klotho in uremic rats. *A*) Serum levels of FGF23 in uremic rats consuming an LP diet (Nx-LP group; *n* = 7) or an HP diet (Nx-HP group; *n* = 10). FGF23 could not be measured after anti-FGF23 administration because of interference in the measure. *B*) Fe P in the Nx-LP, Nx-HP, and Nx-HP+anti-FGF23 (*n* = 10) groups. *C*) Serum levels of P in Nx-LP and Nx-HP vs. Nx-LP group. *D*) Levels of mRNA expression of FGFR1 in the Nx-LP, Nx-HP, and Nx-HP+anti-FGF23 groups. *E*) Renal protein expression of FGFR1. *F*) Quantification of FGFR1 Western blot was performed by measurement of average relative density and normalized to β-actin levels. *G*) mRNA expression of renal Klotho in Nx-LP, Nx-HP, and Nx-HP+anti-FGF23 groups. *H*) Renal protein expression of Klotho. β-Actin was used as a loading control. *I*) Quantification of renal Klotho was performed by measurement of average relative density and normalized to β-actin levels. Image is representative of a pool of animals in each group. Values are expressed as means ± SD. <sup>a</sup>*P* < 0.001; <sup>b</sup>*P* < 0.001 vs. all groups; <sup>c</sup>*P* < 0.01 vs. Nx-LP group; <sup>d</sup>*P* < 0.001 vs. Nx-HP; <sup>e</sup>*P* < 0.01 vs. Nx-HP.

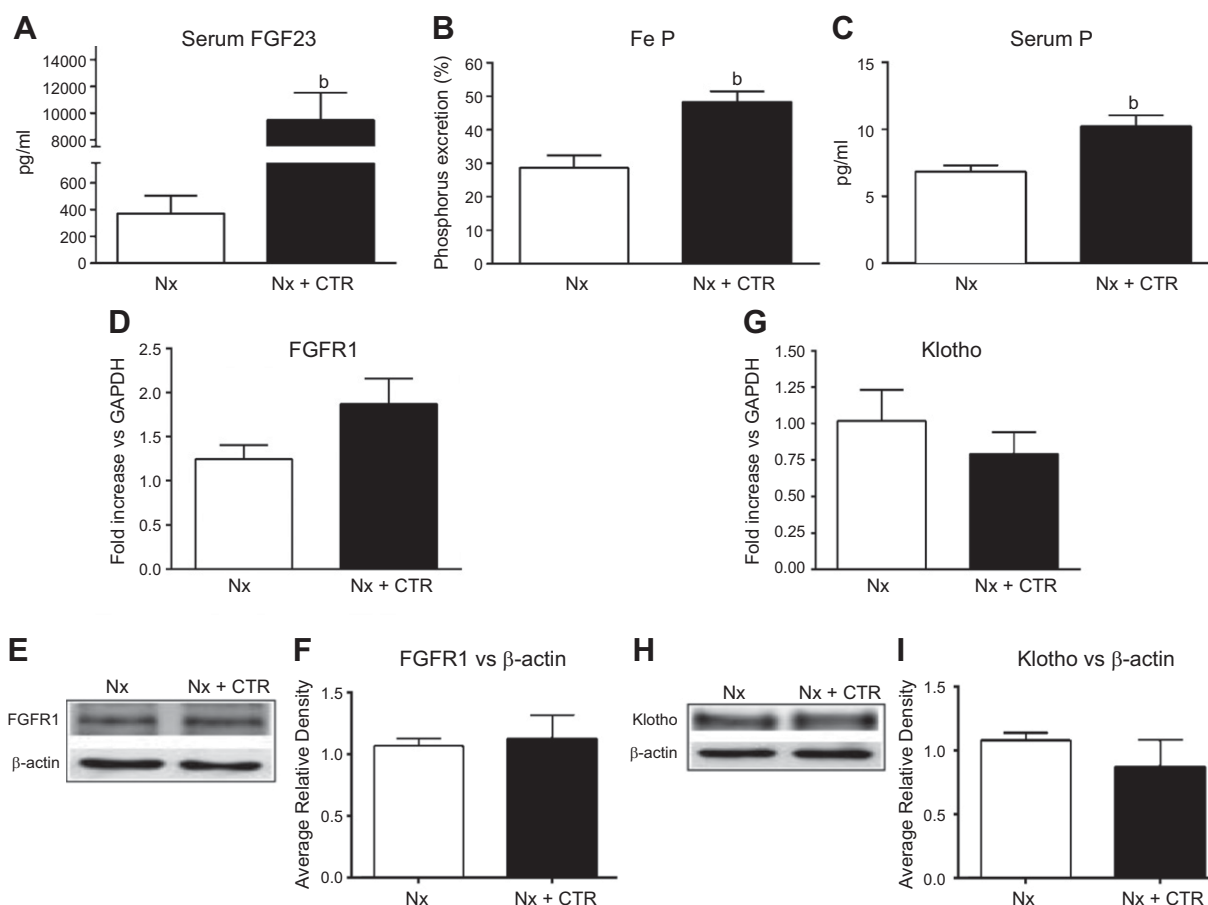
effect of a decrease in FGF23 activity. Regrettably, serum FGF23 could not be measured in this group of rats because the addition of anti-FGF23 interferes with the quantification of serum FGF23. As compared with Nx-HP, the neutralization of FGF23 reduced FGFR1 expression by 75% (Fig. 2D–F), and it further reduced Klotho expression to less than 30% (Fig. 2G–I). As compared to the Nx-HP rats, the administration of anti-FGF23 resulted in an increase in serum concentration of CTR and Ca (Table 2). In fact, values of serum Ca and CTR in rats receiving anti-FGF23 were similar to Nx rats fed the LP diet (Nx-LP). Therefore, in uremic rats, the increase in Fe P was associated with a reduction in renal Klotho, whereas high levels of FGF23 induced upregulation of renal FGFR1.

The administration of CTR to Nx rats produced an elevation in serum levels of FGF23 and P and an increase in Fe P (Fig. 3A–C). CTR administration also increased serum Ca concentration and reduced PTH levels (Table 2). The renal expression of FGFR1 did not increase significantly (Fig. 3D–F). Moreover, renal Klotho expression was not reduced after CTR supplementation, despite the significant increase in serum P and Fe P (Fig. 3G–I).

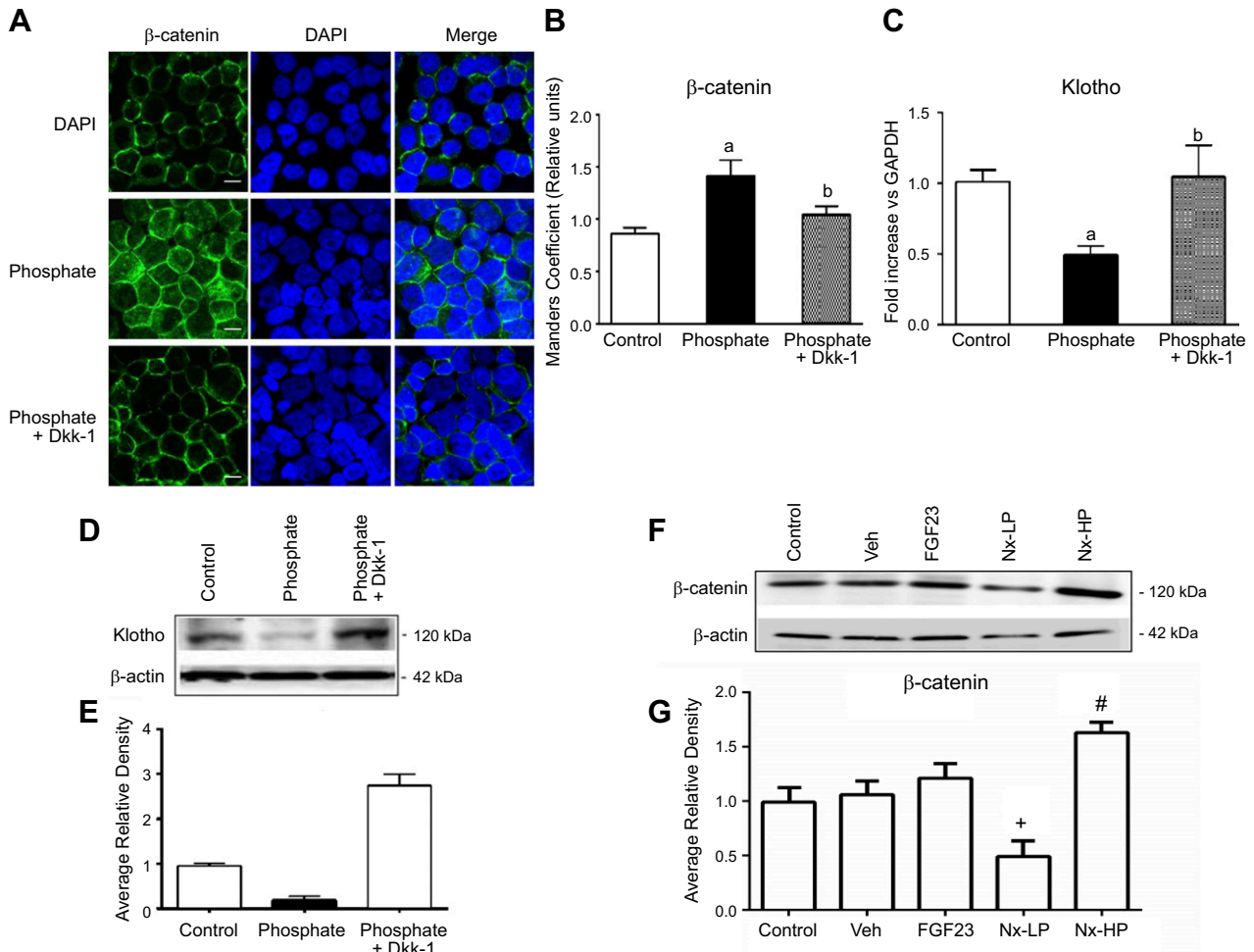
To study the mechanisms whereby P decreases Klotho expression, we analyzed the potential involvement of the

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. In HEK-293 cells, a high concentration of P (3.3 mM) induced nuclear translocation of  $\beta$ -catenin, together with a reduction in Klotho expression (Fig. 4A). The nuclear localization of  $\beta$ -catenin was quantified by ImageJ, which revealed significant differences between treatments (Fig. 4B). The effect on Klotho was observed both at the mRNA (Fig. 4C) and protein (Fig. 4D, E) level. An HP concentration did not modify the FGFR1 expression (data not shown). The addition of Dkk1 to the HP medium prevented Wnt activation and the nuclear translocation of  $\beta$ -catenin (Fig. 4A, B). This effect was also associated with a normalization of Klotho expression (Fig. 4C–E). The *in vivo* effect of P on nuclear  $\beta$ -catenin protein expression was analyzed by Western blot in rat kidney tissue from the different experimental groups. Increased nuclear translocation of  $\beta$ -catenin was observed in 5/6Nx rats fed an HP diet (Nx-HP; Fig. 4F, G). Therefore, an HP concentration induces downregulation of Klotho through the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.

The addition of CTR ( $10^{-9}$  M) to HEK-293 cells cultured in an HP medium prevented the decrease in Klotho expression. CTR alone in normal medium at  $10^{-9}$  M had no effect on Klotho expression in HEK-293 cells (Fig. 5A).



**Figure 3.** Effect of CTR administration on renal Klotho expression. A–C) Values of serum FGF23 (A), serum P (B), and Fe P (C) in 5/6 Nx rats fed a normal diet (Ca 0.6%, P 0.6%) or Nx+CTR ( $n = 7$ ). D, E) Renal mRNA expression of FGFR1 (D) and protein FGFR1 (E). F) Western blot quantification was performed by measurement of average relative density and normalized to  $\beta$ -actin levels. G) Renal mRNA expression of Klotho (E) and protein Klotho. I) Quantification of Klotho protein was performed by measurement of average relative density and normalized to  $\beta$ -actin levels. Values are expressed as the means  $\pm$  SD. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs. Nx+CTR.



**Figure 4.** Relationship between HP,  $\beta$ -catenin, and Klotho in HEK-293 cells. *A*) Analysis of nuclear translocation of  $\beta$ -catenin in Control, P, and P+Dkk-1. Green  $\beta$ -catenin, blue DAPI staining for nuclei, and a merged image of green and blue are shown. Original magnification,  $\times 400$ . Scale bars, 20  $\mu$ m. *B*) Nuclear colocalization was calculated with ImageJ software through Mander coefficient plug-in, showing the percentage of green pixels that overloads with blue pixels. *C, D*) Klotho mRNA (*C*) and Western blot of Klotho (*D*). *E*) Quantification of Klotho normalized to  $\beta$ -actin levels was performed by measurement of average relative density in ImageJ. *F*) Levels of nuclear  $\beta$ -catenin were analyzed by Western blot from all experimental groups. *G*) Quantification of nuclear  $\beta$ -catenin respect to  $\beta$ -actin levels was performed by measurement of average relative density in ImageJ. The image is representative of a pool from animals in each group. *In vitro* experiments were performed 3 times. Values are expressed as the means  $\pm$  SD. ANOVA was used to compare means. <sup>a</sup> $P < 0.001$  vs. control; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs. P; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. Nx-LP group; <sup>+</sup> $P < 0.05$  vs. all groups.

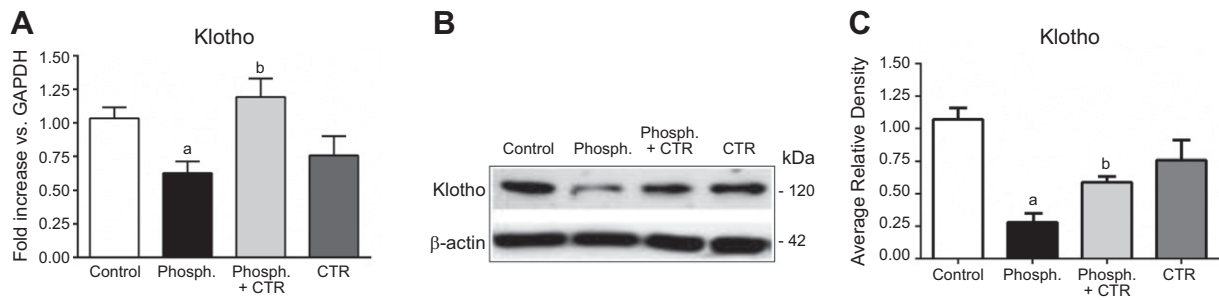
These results were also confirmed at a protein level by Western blot (Fig. 5B, C).

## DISCUSSION

In the present study, the renal expression of Klotho was reduced in rats with enhanced phosphaturia, whereas the expression of FGFR1 was up-regulated by FGF23 in uremic rats. *In vitro* results from the present study show that HP concentration reduced Klotho expression through activation of canonical Wnt pathway. In uremic rats, CTR supplementation prevented a reduction in renal Klotho, despite the enhanced phosphaturia. Furthermore, CTR neutralizes the inhibition of Klotho induced by P *in vitro*. The Klotho promoter contains vitamin D receptor (VDR) response elements supporting a role for CTR in the regulation of Klotho mRNA expression (15, 16). **Figure 6** summarizes the findings obtained in the present experiments.

The increase in FGF23, either by exogenous administration of FGF23 or as a result of renal failure plus an HP intake, was associated with a reduction in renal Klotho expression. These findings could be interpreted as a negative effect of FGF23 on Klotho expression. However neutralization of FGF23 by anti-FGF23 did not result in an increase in Klotho expression, suggesting that serum FGF23 *per se* did not influence renal Klotho expression. These results suggest that the increase in phosphaturia, rather than a direct effect of FGF23, was responsible for the reduction in renal Klotho expression. This notion is supported by the results obtained by *in vitro* studies in which a high concentration of P reduced Klotho expression *via* activation of Wnt signaling pathway.

The administration of CTR to rats with renal failure prevented the phosphaturia-induced reduction in renal Klotho expression. These data are not contradictory to those in other studies that demonstrated a CTR-mediated



**Figure 5.** CTR recovers Klotho expression *in vitro*. *A, B*) Effect of CTR ( $10^{-9}$  M) on expression of Klotho mRNA (*A*) and Klotho protein (*B*) in HEK-293 cells in an HP (3.3 mM) medium for 5 d. *C*) Quantification of Klotho normalized to  $\beta$ -actin levels was performed by measurement of average relative density in Image J. *In vitro* experiments were performed 3 times. <sup>a</sup> $P < 0.001$  vs. control; <sup>b</sup> $P < 0.001$  vs. P (phosp.).

increase in Klotho expression (15–17). Our *in vitro* experiments show that CTR prevented the reduction in Klotho induced by HP concentration.

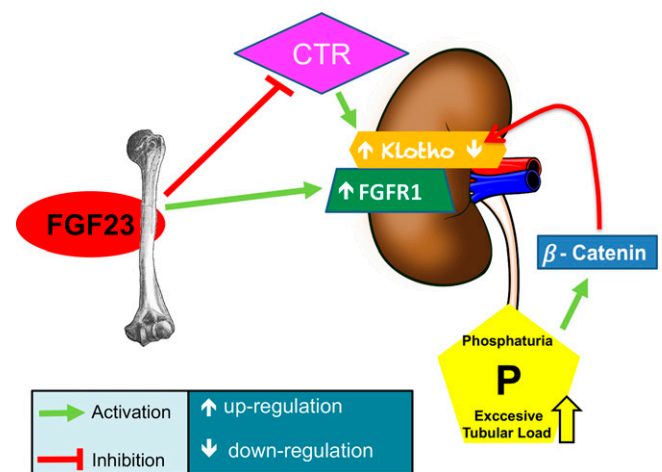
An important question is why an increase in the tubular load of P could reduce the expression of renal Klotho, a protein that facilitates phosphaturia directly (18), by serving a coreceptor for FGF23. If as suggested by Hu *et al.* (18), Klotho itself participates in the control of serum P level by inducing phosphaturia, a reduction in Klotho could be interpreted as a response mechanism to conserve serum P, prevent hypophosphatemia, and avoid excessive phosphaturia. Our experiments were not designed to explore this possibility. Alternatively, the reduction in renal Klotho may be a result of cell injury induced by an excess of P. Other investigators have shown that renal Klotho expression appears to be sensitive to renal injury associated with inflammation (19), oxidative stress (20), hyperlipidemia (21), or high concentrations of uremic toxins, such as indoxylsulfate (22). Two studies indicated that a large tubular load of P may produce renal damage and inflammation (23, 24). Zhou *et al.* (25) showed that various animal models of nephropathy produce a marked reduction in renal Klotho that is associated with Wnt/ $\beta$ -catenin activation. Klotho may protect against excessive activity of the Wnt pathway. The present study shows that high concentration of P in the medium caused Wnt/ $\beta$ -catenin activation, together with an associated reduction in Klotho. In our experiments, the inhibition of the Wnt pathway by its natural inhibitor Dkk-1 prevented the reduction in Klotho expression induced by P.

In previous studies, we demonstrated a relationship between P and Wnt activity in other cell types, such as vascular smooth muscle cells (26) and bone marrow mesenchymal stem cells (27). It is important to note that the Klotho promoter contains  $\beta$ -catenin response elements, suggesting that Klotho expression is controlled by canonical Wnt signaling (28).

With respect to CTR, it has been shown that *in vitro*, CTR induces Klotho expression through VDR response elements contained in the Klotho promoter (22). However, there is a paucity of *in vivo* evidence of a direct effect of CTR on renal Klotho expression. In our *in vivo* experiments the increased fractional excretion of P resulting from CTR administration may neutralize the stimulatory effect of CTR on renal Klotho expression.

These *in vivo* results, along with our *in vitro* data in HEK-293 cells showing that CTR restores Klotho expression in cells exposed to HP concentration, suggest that in a situation of P overload, CTR avoids the reduction in Klotho induced by phosphaturia. We and others have shown that if hypocalcemia is present, CTR production increases, but it fails to stimulate FGF23 production (29, 30). In this scenario the increase in intestinal P absorption must be excreted in the urine. If FGF23 is not increased, it may be beneficial to maintain renal Klotho expression to favor phosphaturia. The elevated PTH induced by hypocalcemia may not be enough to excrete the excess of P coming from CTR-induced gastrointestinal absorption and the bone efflux of P. This is one of the possible interpretations of the results of the present study. Additional research is needed to prove this hypothesis.

Renal FGFR1 is the main receptor involved in the phosphaturic actions of FGF23. The participation of other receptors such as FGFR3 or -4 is still controversial (31, 32). It has been reported that in osteocytes,



**Figure 6.** Differential regulation of Klotho and FGFR1. FGF23 stimulates phosphaturia and inhibits CTR production. In addition, FGF23 up-regulates renal expression of FGFR1. Because CTR stimulates renal Klotho expression, a reduction of CTR by the action of FGF23 should negatively affect the renal expression of Klotho. Excessive P load per nephron, as occurs in renal failure, produces down regulation of renal Klotho expression through the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.



FGFR1 activation stimulates the production of FGF23 (33, 34). However, the effects of FGF23 on renal FGFR1 have not been formally evaluated. Our results suggest that FGFR1 expression is stimulated by high FGF23; this upregulation of FGFR1 by FGF23 may be a mechanism to ensure phosphaturia.

If P loading exerts its effects directly on renal Klotho and Wnt signaling or if these effects are subrogated to other mechanisms such as inflammation, vitamin D suppression or other factors should be studied.

This study suggests that an excessive amount of P circulating through the renal tubules causes the reduction of Klotho expression through the activation of Wnt signaling pathway. As a result, there is a resistance to the phosphaturic action of FGF23 with the subsequent development of hyperphosphatemia. These results highlight the interest to determine, in patients with CKD, the impact of renal P excretion on renal Klotho expression that might be assessed by the measurement urinary Klotho excretion, a potential biomarker for progression of renal disease.

In summary, excessive phosphaturia produces down-regulation of renal Klotho *via* Wnt activation, whereas high levels of FGF23 increase renal FGFR1. CTR prevents the reduction of renal Klotho expression induced by P. Therefore, excessive phosphaturia, relative to the number of functioning nephrons, may be responsible for a renal resistance to FGF23 through a down-regulation of renal Klotho. FJ

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ignacio Lopez (Universidad de Córdoba) for criticism of the study and participation in the correction of the manuscript. This work was partially supported by a Spanish government grant from the Programa Nacional I+D+I 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Grants PI14/00638 and PI14/00467, cofinancing from European Funds (FEDER), Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (Grant CVI-7925) from the Junta de Andalucía, Framework Programme 7 Syskid UE Grant FP7-241544, and EUTOX and REDinREN from the ISCIII. N.V. and J.M.D.-T. were supported by Consejería de Economía, Innovación Grant CVI-7925 Ciencia y Empleo from the Junta de Andalucía. M.E.R.-O. is the recipient of a “Sara Borrell” research contract from the ISCIII. Y.A. and J.R.M.-C. are senior researchers supported by the Nicolás Monardes Programme, Consejería de Salud-SAS (Junta de Andalucía). M.D.S. is supported by a Laboratorios Rubió SA research award. W.G.R. is employed by Amgen, Inc., and M.R. has received honorarium for lectures from Abbott, Amgen, Inc., Fresenius, and Shire. The remaining authors declare no conflicts of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. R. Muñoz-Castañeda, C. Herencia, Y. Almadén, and M. Rodríguez conceived and performed the study, researched the data, analyzed the results, and wrote the manuscript; M. V. Pendón-Ruiz de Mier, M. E. Rodríguez-Ortiz, J. M. Diaz-Tocados, N. Vergara, J. M. Martínez-Moreno, and M. D. Salmerón performed the study, researched the data, and analyzed the results; W. G. Richards, A. Felsenfeld, and M. Kuro-O. wrote and reviewed the manuscript; J. R. Muñoz-Castañeda and

M. Rodríguez are the guarantors of this work and, as such, take full responsibility for it.

## REFERENCES

1. Wolf, M. (2012) Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **82**, 737–747
2. Shalhoub, V., Shatzken, E. M., Ward, S. C., Davis, J., Stevens, J., Bi, V., Renshaw, L., Hawkins, N., Wang, W., Chen, C., Tsai, M.-M., Cattley, R. C., Wronski, T. J., Xia, X., Li, X., Henley, C., Eschenberg, M., and Richards, W. G. (2012) FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J. Clin. Invest.* **122**, 2543–2553
3. Ben-Dov, I. Z., Galitzer, H., Lavi-Moshayoff, V., Goetz, R., Kuro-o, M., Mohammadi, M., Sirkis, R., Naveh-Manly, T., and Silver, J. (2007) The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J. Clin. Invest.* **117**, 4003–4008
4. Canalejo, R., Canalejo, A., Martínez-Moreno, J. M., Rodríguez-Ortiz, M. E., Estepa, J. C., Mendoza, F. J., Muñoz-Castañeda, J. R., Shalhoub, V., Almaden, Y., and Rodríguez, M. (2010) FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1125–1135
5. Isakova, T., and Wolf, M. S. (2010) FGF23 or PTH: which comes first in CKD? *Kidney Int.* **78**, 947–949
6. Wolf, M., Molnar, M. Z., Amaral, A. P., Czira, M. E., Rudas, A., Ujszaszi, A., Kiss, I., Rosivall, L., Kosa, J., Lakatos, P., Kovesdy, C. P., and Mucsi, I. (2011) Elevated fibroblast growth factor 23 is a risk factor for kidney transplant loss and mortality. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 956–966
7. Faul, C., Amaral, A. P., Oskouei, B., Hu, M.-C., Sloan, A., Isakova, T., Gutiérrez, O. M., Aguillon-Prada, R., Lincoln, J., Hare, J. M., Mundel, P., Morales, A., Scialla, J., Fischer, M., Soliman, E. Z., Chen, J., Go, A. S., Rosas, S. E., Nessel, L., Townsend, R. R., Feldman, H. I., St John Sutton, M., Ojo, A., Gadegbeku, C., Di Marco, G. S., Reuter, S., Kentrup, D., Tiemann, K., Brand, M., Hill, J. A., Moe, O. W., Kuro-O, M., Kusek, J. W., Keane, M. G., and Wolf, M. (2011) FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **121**, 4393–4408
8. Fliser, D., Kollerits, B., Neyer, U., Ankerst, D. P., Lhotta, K., Lingenhel, A., Ritz, E., Kronenberg, F.; MMKD Study Group, Kuen, E., König, P., Kraatz, G., Mann, J. F., Müller, G. A., Köhler, H., and Riegler, P. (2007) Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2600–2608
9. Goetz, R., and Mohammadi, M. (2013) Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 166–180
10. Olsson, H., and Larsson, T. E. (2013) FGF23 and Klotho in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **22**, 397–404
11. Montes de Oca, A., Guerrero, F., Martínez-Moreno, J. M., Madueño, J. A., Herencia, C., Peralta, A., Almaden, Y., Lopez, I., Aguilera-Tejero, E., Gundlach, K., Büchel, J., Peter, M. E., Passlick-Deetjen, J., Rodríguez, M., and Muñoz-Castañeda, J. R. (2014) Magnesium inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin activity and reverses the osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells. *PLoS One* **9**, e89525
12. Liu, J., Zhang, L., Zhou, Y., Zhu, D., Wang, Q., and Hao, L. (2016) Aberrant activation of Wnt pathways in arteries associates with vascular calcification in chronic kidney disease. *Int. Urol. Nephrol.* **48**, 1313–1319
13. Faverman, L., Mikhaylova, L., Malmquist, J., and Nurminskaya, M. (2008) Extracellular transglutaminase 2 activates beta-catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **582**, 1552–1557
14. Shao, J. S., Cheng, S. L., Pingsterhaus, J. M., Charlton-Kachigian, N., Loewy, A. P., and Towler, D. A. (2005) Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J. Clin. Invest.* **115**, 1210–1220
15. Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Forster, R., Saini, R., Hsieh, J.-C., Haussler, C. A., and Jurutka, P. W. (2012) The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **13**, 57–69
16. Forster, R. E., Jurutka, P. W., Hsieh, J.-C., Haussler, C. A., Lowmiller, C. L., Kaneko, I., Haussler, M. R., and Kerr Whitfield, G. (2011) Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 557–562
17. Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K., and Nabeshima, Y. (2003) Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2393–2403

18. Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Pastor, J., Nakatani, T., Lanske, B., Razzaque, M. S., Rosenblatt, K. P., Baum, M. G., Kuro-o, M., and Moe, O. W. (2010) Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* **24**, 3438–3450
19. Moreno, J. A., Izquierdo, M. C., Sanchez-Niño, M. D., Suárez-Alvarez, B., Lopez-Larrea, C., Jakubowski, A., Blanco, J., Ramirez, R., Selgas, R., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A., and Sanz, A. B. (2011) The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1315–1325
20. Sugiura, H., Yoshida, T., Mitobe, M., Yoshida, S., Shiohira, S., Nitta, K., and Tsuchiya, K. (2010) Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 60–68
21. Sastre, C., Rubio-Navarro, A., Buendía, I., Gómez-Guerrero, C., Blanco, J., Mas, S., Egido, J., Blanco-Colio, L. M., Ortiz, A., and Moreno, J. A. (2013) Hyperlipidemia-associated renal damage decreases Klotho expression in kidneys from ApoE knockout mice. *PLoS One* **8**, e83713
22. Sun, C.-Y., Chang, S.-C., and Wu, M.-S. (2012) Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int.* **81**, 640–650
23. Kuro-O, M. (2013) A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* (2011) **3**, 420–426
24. Haut, L. L., Alfrey, A. C., Guggenheim, S., Buddington, B., and Schrier, N. (1980) Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int.* **17**, 722–731
25. Zhou, L., Li, Y., Zhou, D., Tan, R. J., and Liu, Y. (2013) Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 771–785
26. Martínez-Moreno, J. M., Muñoz-Castañeda, J. R., Herencia, C., Oca, A. M., Estepa, J. C., Canalejo, R., Rodríguez-Ortiz, M. E., Perez-Martinez, P., Aguilera-Tejero, E., Canalejo, A., Rodríguez, M., and Almadén, Y. (2012) In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ $\beta$ -catenin activation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**, F1136–F1144
27. Guerrero, F., Herencia, C., Almadén, Y., Martínez-Moreno, J. M., Montes de Oca, A., Rodríguez-Ortiz, M. E., Díaz-Tocados, J. M., Canalejo, A., Florio, M., López, I., Richards, W. G., Rodríguez, M., Aguilera-Tejero, E., and Muñoz-Castañeda, J. R. (2014) TGF $\beta$  prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways. *PLoS One* **9**, e89179
28. Hiyama, A., Arai, F., Sakai, D., Yokoyama, K., and Mochida, J. (2012) The effects of oxygen tension and antiangiogenic factor Klotho on Wnt signaling in nucleus pulposus cells. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R105
29. Rodríguez-Ortiz, M. E., Lopez, I., Muñoz-Castañeda, J. R., Martínez-Moreno, J. M., Ramírez, A. P., Pineda, C., Canalejo, A., Jaeger, P., Aguilera-Tejero, E., Rodríguez, M., Felsenfeld, A., and Almadén, Y. (2012) Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1190–1197
30. Quinn, S. J., Thomsen, A. R. B., Pang, J. L., Kantham, L., Jaeger, P., Vierthaler, L., Tang, W., Zhou, J., and Quarles, L. D. (2013) Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E310–E320
31. Liu, S., Vierthaler, L., Tang, W., Zhou, J., and Quarles, L. D. (2008) FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 2342–2350
32. Gattineni, J., Alphonse, P., Zhang, Q., Mathews, N., Bates, C. M., and Baum, M. (2014) Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **306**, F351–F358
33. Hassan, A., Durlacher, K., Silver, J., Naveh-Many, T., and Levi, R. (2016) The fibroblast growth factor receptor mediates the increased FGF23 expression in acute and chronic uremia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **310**, F217–F221
34. Wu, A.-L., Feng, B., Chen, M. Z., Kolumam, G., Zavala-Solorio, J., Wyatt, S. K., Gandham, V. D., Carano, R. A. D., and Sonoda, J. (2013) Antibody-mediated activation of FGFR1 induces FGF23 production and hypophosphatemia. *PLoS One* **8**, e57322

Received for publication January 4, 2017.

Accepted for publication April 24, 2017.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Increased Phosphaturia Accelerates The Decline in Renal Function: A Search for Mechanisms

Rafael Santamaría<sup>1,2,3,6</sup>, Juan M. Díaz-Tocados<sup>2,3</sup>, M. Victoria Pendón-Ruiz de Mier<sup>1,2,3</sup>, Ana Robles<sup>1</sup>, M. Dolores Salmerón-Rodríguez<sup>1,2,3</sup>, Erena Ruiz<sup>1,2,3</sup>, Noemi Vergara<sup>1,2,3</sup>, Escolástico Aguilera-Tejero<sup>2,3</sup>, Ana Raya<sup>2,3</sup>, Rosa Ortega<sup>4</sup>, Arnold Felsenfeld<sup>5</sup>, Juan R. Muñoz-Castañeda<sup>1,2,3</sup>, Alejandro Martín-Malo<sup>1,2,3,6</sup>, Pedro Aljama<sup>1,2,3,6</sup> & Mariano Rodríguez<sup>1,2,3,6</sup>

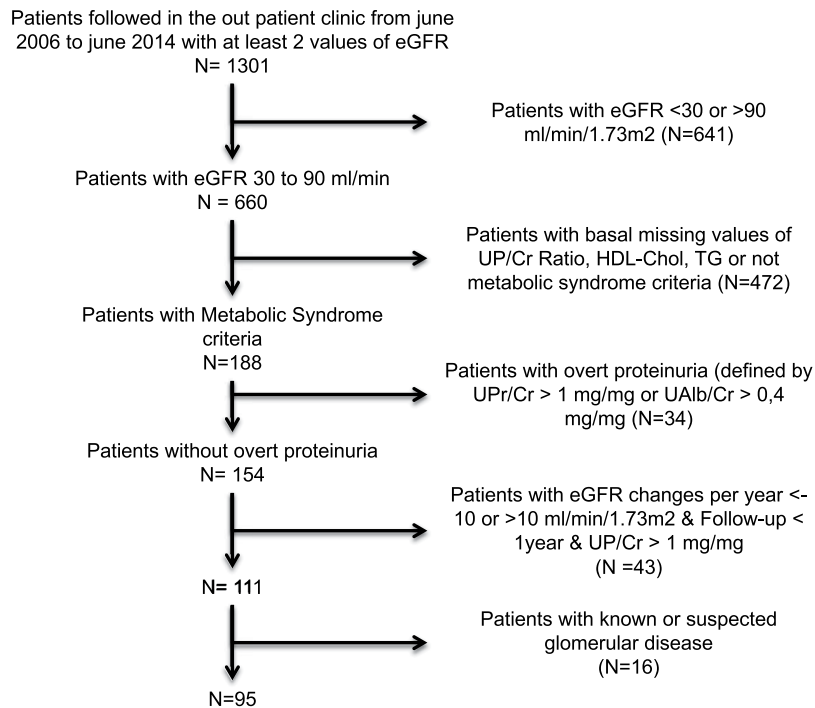
In chronic kidney disease (CKD), high serum phosphate concentration is associated with cardiovascular disease and deterioration in renal function. In early CKD, the serum phosphate concentration is normal due to increased fractional excretion of phosphate. Our premise was that high phosphate intake even in patients with early CKD would result in an excessive load of phosphate causing tubular injury and accelerating renal function deterioration. In CKD 2–3 patients, we evaluated whether increased phosphaturia accelerates CKD progression. To have a uniform group of patients with early CKD, 95 patients with metabolic syndrome without overt proteinuria were followed for  $2.7 \pm 1.6$  years. The median decline in eGFR was  $0.50 \text{ ml/min/1.73 m}^2/\text{year}$ . Patients with a more rapid decrease in eGFR had greater phosphaturia. Moreover, the rate of decrease in eGFR inversely correlated with the degree of phosphaturia. Additionally, phosphaturia independently predicted renal function deterioration. In heminephrectomized rats, a high phosphate diet increased phosphaturia resulting in renal tubular damage associated with inflammation, oxidative stress and low klotho expression. Moreover, in rats with hyperphosphatemia and metabolic syndrome antioxidant treatment resulted in attenuation of renal lesions. In HEK-293 cells, high phosphate promoted oxidative stress while melatonin administration reduced ROS generation. Our findings suggest that phosphate loading in early CKD, results in renal damage and a more rapid decrease in renal function due to renal tubular injury.

It is generally accepted that in dialysis patients, high serum phosphate concentration is associated with cardiovascular disease and mortality<sup>1,2</sup>. Similarly, in patients with advanced chronic kidney disease (CKD), hyperphosphatemia predicts mortality and is associated with more rapid progression to end-stage renal disease<sup>3</sup>. Even in the general population, serum phosphate concentration in the high normal range predicts mortality<sup>1–4</sup>. Thus, in CKD stage 4 and 5 patients, there is general agreement that the elevated serum phosphate concentration should be reduced toward a normal level<sup>5</sup>. In CKD stages 2 and 3 patients, serum phosphate is not usually increased. However, it is uncertain whether increased phosphaturia resulting from high dietary phosphate intake has a deleterious effect on renal function<sup>6</sup>.

In CKD stages 3 to 5 patients, the magnitude of phosphaturia and the high serum phosphate levels have been reported to attenuate the anti-proteinuric effect of a very low protein diet<sup>7</sup>. However, an independent effect of increased phosphaturia on the progression of renal disease in early CKD patients has not been evaluated. Experimental work has shown that a high phosphate concentration produces tubular cell damage<sup>8</sup>, promotes apoptosis of proximal tubular cells and induces the expression of profibrotic and proinflammatory cytokines<sup>9</sup>.

In moderate CKD, the serum concentration of phosphate is maintained within normal levels because of an increase in fractional excretion of phosphate. In essence, total urinary excretion of phosphate should reflect intestinal absorption of phosphate<sup>6</sup>. Our premise was that even in the absence of hyperphosphatemia, a high

<sup>1</sup>Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. <sup>2</sup>Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Research Unit, Cordoba, Spain. <sup>3</sup>University of Cordoba, Cordoba, Spain. <sup>4</sup>Pathology Department, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. <sup>5</sup>Nephrology Service, West Los Angeles VA, UCLA Los Angeles, Los Angeles, USA. <sup>6</sup>Red de Investigación Renal (RedInRen), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and EUTOX, Madrid, Spain. Rafael Santamaría and Juan M. Díaz-Tocados contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.R.M.-C. (email: [juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es](mailto:juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es))



**Figure 1.** Flow chart showing details of how patients were selected. UP/Cr: Urinary Phosphate/creatinine; HDL-chol: High Density Lipoprotein Cholesterol; TG: Triglycerides, UPr/Cr: Urinary Protein/Creatinine; UAlb/Cr: Urinary Albumin/creatinine.

phosphate intake in early CKD patients with their decreased number of nephrons would result in an excessive tubular load of phosphate, which in turn, would cause tubular injury and accelerate the deterioration in renal function. To date, this important clinical issue has not been properly studied in patients with early CKD.

In the present study, we evaluated whether the magnitude of phosphaturia was associated with the progression of CKD in a homogenous group of stages 2 and 3 CKD patients with metabolic syndrome without overt proteinuria. To evaluate potential mechanisms, additional studies were performed in rats to assess the changes in kidney structure, function and protein expression induced by excessive phosphaturia. Finally, a direct effect of a high phosphate concentration on kidney cells in culture was also studied.

## Results

**Patients.** The flow chart for patient selection is summarized in Fig. 1. Of the patients included in the study, the median decline in eGFR was 0.5007 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> per year. Patients were classified as progressors if the decline in eGFR was greater than 0.5007 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>/year and non-progressors when the decline in eGFR was less than 0.5007 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>/year. Demographics and clinical characteristics of the study patients are shown in Table 1. Age, body mass index and abdominal circumference were similar in progressors and non-progressors. Control of blood pressure was also similar in both groups. Most patients required blood pressure medications and the type of medication prescribed, particularly renin angiotensin system inhibitors or blockers, was similar in progressors and non-progressors. However ischemic heart disease was more frequent among progressors than non-progressors. The use of anti-platelet aggregation therapy was similar in both groups. The frequency of diabetes, the prescription of oral hypoglycemic agents and the use of insulin were not different in progressors and non-progressors. Likewise, treatment of dyslipidemia was similar in both groups.

Biochemical parameters for serum and urine are shown in Tables 2 and 3. Serum phosphate levels were within normal limits in both progressors and non-progressors. There were no differences between the two groups in any serum value (Table 2). In urine, the values of phosphate/creatinine and urea/creatinine were increased in progressors as compared with non progressors ( $p = 0.012$  and  $p = 0.025$ , respectively) (Table 3). The mean baseline eGFR was similar in both groups (Table 3). As defined by the study criteria, the rate of change in eGFR was less in non-progressors,  $2.6 \pm 2.9$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> per year than in the progressors,  $-2.8 \pm 2.3$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> per year.

The results of simple linear correlation analysis between the rate of decline in eGFR (dependent variable) and the continuous variables that in the comparison of progressors vs non-progressors with a  $P$  value < 0.2 in Tables 2 and 3, are shown in Table 4. The serum concentration of uric acid, systolic blood pressure and urinary urea/creatinine and albumin/creatinine (Alb/Cr) ratios did not show significant correlation. However, the decrease in eGFR did correlate significantly with P/Cr ( $r = -0.259$ ,  $p = 0.011$ ) suggesting that phosphaturia may negatively affect the eGFR.

Next a multiple linear regression analysis was performed using the change in eGFR as dependent variable and urine P/Cr as independent variable together with other variables that a priori were known to have the potential to accelerate the decline in eGFR: age, systolic blood pressure, low-density lipoprotein, uric acid, Alb/Cr ratio, ACE



	All (n = 95)	Non-Progressors (n = 48)	Progressors (n = 47)	P Value
Age (years)	63.1 ± 11.5	62.5 ± 11.7	63.7 ± 11.4	0.519
Gender				
Male	57 (60%)	29 (60.4%)	28 (59.6%)	0.933
Female	38 (40%)	19 (39.6%)	19 (40.4%)	
Abd. Circum (cm)	107.3 ± 9.4	105.4 ± 5.5	109.0 ± 12.1	0.466
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.5 ± 4.0	30.5 ± 3.6	30.5 ± 4.4	0.655
Systolic BP (mmHg)	148 ± 23	145 ± 23	152 ± 24	0.200
Diastolic BP (mmHg)	85 ± 14	87 ± 15	85 ± 12	0.478
HTN (%)	97.9	97.9	97.9	0.988
T2DM (%)	40.0	35.4	44.7	0.357
OSA (%)	22.1	22.9	21.3	0.847
CHF (%)	9.5	10.4	8.5	0.751
CHD (%)	13.7	6.2	21.3	0.033
PA (%)	12.6	6.2	19.1	0.580
CVD (%)	9.5	10.4	8.5	0.751
ACE-i (%)	28.4	31.2	25.5	0.537
ARB (%)	70.5	64.6	76.6	0.199
Diuretics (%)	65.3	62.5	68.1	0.568
CCB (D) (%)	52.6	45.8	59.6	0.180
BB (%)	43.2	47.9	38.3	0.344
CAB (%)	33.7	33.3	34.0	0.942
Other antihyper drugs. (%)	12.6	16.7	8.5	0.232
OH (%)	25.3	18.8	31.9	0.140
Insulin (%)	17.9	20.8	14.9	0.450
Statins (%)	47.4	47.9	46.8	0.914
Fibrate/Omega3 (%)	17.9	16.7	19.1	0.752
Antiplatelet (%)	45.3	41.7	48.9	0.477

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of patients classified as progressors and non-progressors based on the decline in renal function. Mean ± SD. Progressors (decline in eGFR >0.5 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>/year) and non-progressors (decline in eGFR <0.5 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>/year). Abbreviations: Abd. Circum: Abdominal Circumference. BMI: Body Mass Index; HTN: Arterial Hypertension; T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus; OSA: Obstructive Sleep Apnea Syndrome; CHF: Congestive Heart Failure; CHD: Coronary Heart Disease; PA: Peripheral Arteriosclerosis; CVD: Cerebrovascular Disease; ACE-i: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor; ARB: Angiotensin Receptor Blocker; CCB (D): Calcium Channels Blocker (Dihydropyridine); BB: Beta-blocker; CAB: Central Alfa-Blocker; OH: Oral Hypoglycemic Agent.

inhibitors-ARBs, glucose level, baseline CKD-EPI and ischemic heart disease. The results are shown in Table 5A. In addition to the P/Cr ratio in urine ( $p = 0.004$ ), only systolic blood pressure ( $p = 0.01$ ) and baseline eGFR ( $p = 0.011$ ) had a significant effect on the change in eGFR. Finally, a mathematical model including the same variables that in the multiple regression model was generated using logistic regression to identify factors that could potentially predict the progression in renal function deterioration (progressors vs non-progressors) and only the urine P/Cr and Alb/Cr ratios were significant predictors of the change in eGFR (Table 5B).

Prediction of progression status as a function of urinary P and albumin excretion is shown in Fig. 2. The curves were generated by the mathematical model derived from the logistic regression analysis presented in Table 5B. As shown in Fig. 2, each stratum of the urine P/Cr ratio was associated with a higher rate of eGFR progression and a higher Alb/Cr ratio further increased the rate of eGFR progression in each stratum of the P/Cr ratio.

**Animal studies with heminephrectomized rats.** To study potential mechanisms for our clinical results, studies were performed in rats and with kidney cells. Plasma and urine biochemistry from sham and 1/2Nx rats on different phosphate diets is shown in Table 6. Serum phosphate and ionized calcium concentrations were similar in sham and 1/2 Nx rats in both the LPD and HPD groups. The plasma creatinine level was moderately increased in 1/2 Nx rats. The HPD was associated with an increase in the fractional excretion of phosphate in both the sham and 1/2 Nx groups. Plasma intact PTH levels were increased in rats fed a HPD as compared with LPD. The plasma concentration of intact FGF23 increased with the dietary content of phosphate in sham and 1/2 Nx rats and also was greater in the 1/2 Nx HPD rats than the sham HPD rats.

**Renal histology.** Microscopic evaluation of the kidney from sham rats on a HPD showed both renal tubular lesions and increased interstitial cellularity. These abnormalities were not observed in sham rats on a LPD. In the 1/2 Nx + LPD rats, lobulation of glomeruli with moderate mesangial hypercellularity was seen. The severity of tubular lesions and interstitial hypercellularity was accentuated in 1/2 Nx rats on a HPD (Fig. 3A–D). Moreover, in the two HPD groups, there was a loss of the integrity of the brush border membrane and even necrosis of

	All (n = 95)	Non-Progressors (n = 48)	Progressors (n = 47)	P value
Glucose (mmol/L)	6.7 ± 2.65	6.8 ± 3.34	6.8 ± 1.71	0.164
Hb1Ac (%)	6.9 ± 1.46	6.9 ± 1.80	6.9 ± 0.96	0.288
Urea (mmol/L)	8.4 ± 3.41	8.3 ± 3.35	8.6 ± 3.50	0.602
Creatinine (μmol/L)	108 ± 35.1	108 ± 35.9	108 ± 34.6	0.979
Sodium (mmol/L)	141 ± 3.0	141 ± 3.5	141 ± 2.4	0.498
Bicarbonate (mmol/L)	25 ± 4.0	25 ± 4.1	25 ± 3.4	0.701
Potassium (mmol/L)	4.4 ± 0.64	4.4 ± 0.76	4.3 ± 0.51	0.548
Magnesium (mmol/L)	0.91 ± 0.121	0.92 ± 0.121	0.90 ± 0.122	0.238
Calcium (mmol/L)	2.44 ± 0.09	2.43 ± 0.09	2.45 ± 0.108	0.609
Phosphate (mmol/L)	1.09 ± 0.169	1.10 ± 0.172	1.09 ± 0.166	0.748
Uric Acid (μmol/L)	377 ± 103	390 ± 94.3	363 ± 110	0.156
Albumin (g/L)	4.5 ± 0.5	4.6 ± 0.48	4.5 ± 0.43	0.328
Triglycerides (mmol/L)	2.3 ± 1.37	2.3 ± 1.6	2.3 ± 1.17	0.772
HDL Cholesterol (mmol/L)	1.1 ± 0.30	1.0 ± 0.20	1.1 ± 0.38	0.495
LDL Cholesterol (mmol/L)	3.1 ± 0.87	3.1 ± 0.88	3.02 ± 0.87	0.555
Total Cholesterol (mmol/L)	5.1 ± 1.01	5.1 ± 1.05	5.06 ± 0.98	0.757
Hemoglobin (mmol/L)	8.5 ± 1.04	8.6 ± 1.02	8.4 ± 1.06	0.285
Ferritin (μg/L)	128 ± 177	147 ± 170	111 ± 183	0.065
C Reactive Protein (mmol/L)	53 ± 88.6	57 ± 109.4	50 ± 61.5	0.685

**Table 2.** Serum biochemical values.

	All (n = 95)	Non-Progressors (n = 48)	Progressors (n = 47)	P value
Sodium/Creatinine ratio (mEq/mg)	1.3 ± 0.7	1.2 ± 0.8	1.3 ± 0.7	0.384
Potassium/Creatinine ratio (mEq/mg)	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.578
Chloride/creatinine ratio (mEq/mg)	1.2 ± 0.7	1.1 ± 0.7	1.3 ± 0.8	0.239
Calcium/creatinine ratio (mg/mg)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.342
Protein/creatinine ratio (mg/mg)	0.14 ± 0.12	0.13 ± 0.12	0.14 ± 0.13	0.732
Albumin/creatinine ratio (mg/mg)	0.05 ± 0.08	0.04 ± 0.06	0.07 ± 0.1	0.139
Phosphate/creatinine ratio (mg/mg)	0.61 ± 0.18	0.57 ± 0.16	0.66 ± 0.18	0.012
Urea/creatinine (mg/mg)	16,8 ± 5,31	15,6 ± 4,74	18 ± 5,63	0.025
Baseline eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	62 ± 19	62 ± 18	62 ± 20	0.988
Final eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	62 ± 22	68 ± 20	55 ± 22	0.004 <sup>†</sup>
Follow-up (years)	2.7 ± 1.6	2.6 ± 1.5	2.8 ± 1.8	0.929
Rate of change in eGFR per year (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	-0.5007 (-2.2-1.9)	2.6 ± 2.9	-2.8 ± 2.3	0

**Table 3.** Urine values and eGFR in Non-progressors and Progressors. Mean ± SD. <sup>†</sup>Different by definition because of division to non-progressors and progressors. Abbreviations: eGFR: Estimated Glomerular Filtration Rate; Hb1Ac: glycosylated hemoglobin.

Independent Variable	Correlation coefficient	Significance
Glucose	-0.110	0.290
Uric acid	0.189	0.068
Ferritin	0.140	0.187
Systolic BP	-0.190	0.078
Urinary Urea/Cr	-0.201	0.051
Urinary Alb/Cr	-0.187	0.070
Urinary P/Cr	-0.259	0.011

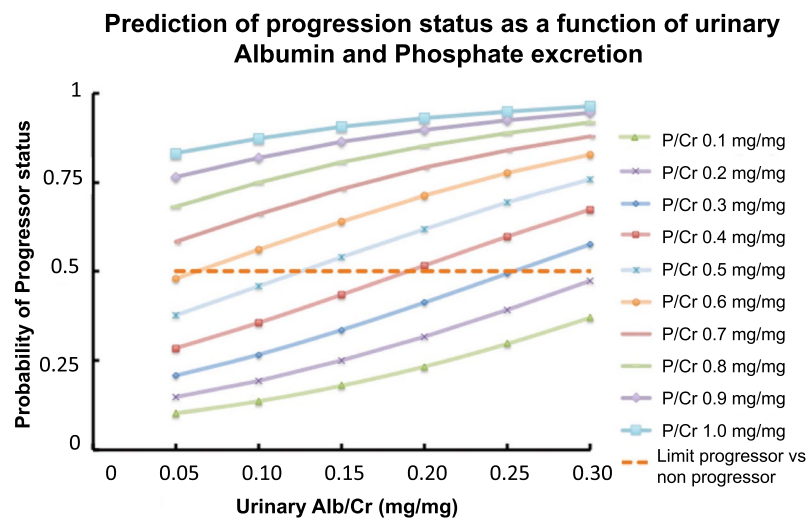
**Table 4.** Simple Linear Correlation analysis. Dependent variable: Rate of change in eGFR. eGFR: Estimated Glomerular Filtration Rate; BP: blood pressure; Cr: creatinine; Alb: albumin; P: phosphate.

Multiple Linear Regression				
Independent Variable	Coefficient	Standard Error	Significance	
Constant	6.8	2.7	0.016	
Urine Phosphate/Creatinine (mg/mg)	-6.3	2.1	0.004	
Systolic Blood Pressure (mmHg)	-0.04	0.02	0.01	
Baseline eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.05	0.02	0.011	
Logistic Regression				
Independent Variable	Coefficient	Standard Error	Significance	Odds ratio Exp (B)
Constant	-2.93	0.96	0.002	0.053
Urine Phosphate/Creatinine (mg/mg)	4.197	1.4	0.003	66.45
Urine Albumin/Creatinine (mg/mg)	6.6	3.1	0.033	735.04

**Table 5.** A. Forward stepwise Multiple Linear Regression, dependent variable: Change in estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) and B. Logistic Regression, dependent variable: Progressor status.

	Sham LPD	Sham HPD	1/2Nx LPD	1/2Nx HPD
Plasma phosphate (mmol/L)	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.11	2.0 ± 0.13	2.1 ± 0.19
Plasma ionized calcium (mM)	1.3 ± 0.02	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.02
Plasma creatinine (μmol/L)	44.2 ± 2.65	44.2 ± 0.88	61.8 ± 0.88 <sup>ab</sup>	61.8 ± 1.76 <sup>ab</sup>
FEPi (%)	0.4 ± 0.01	32.1 ± 7.49 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.08 <sup>b</sup>	50.2 ± 7.03 <sup>ac</sup>
Plasma PTH (pg/ml)	21.9 ± 0.20	72.1 ± 7.66 <sup>a</sup>	34.8 ± 4.26	65.9 ± 10.5 <sup>ac</sup>
Plasma FGF23 (pg/ml)	130 ± 33.9	272 ± 24.0 <sup>a</sup>	119 ± 11.0 <sup>b</sup>	454 ± 49.8 <sup>abc</sup>

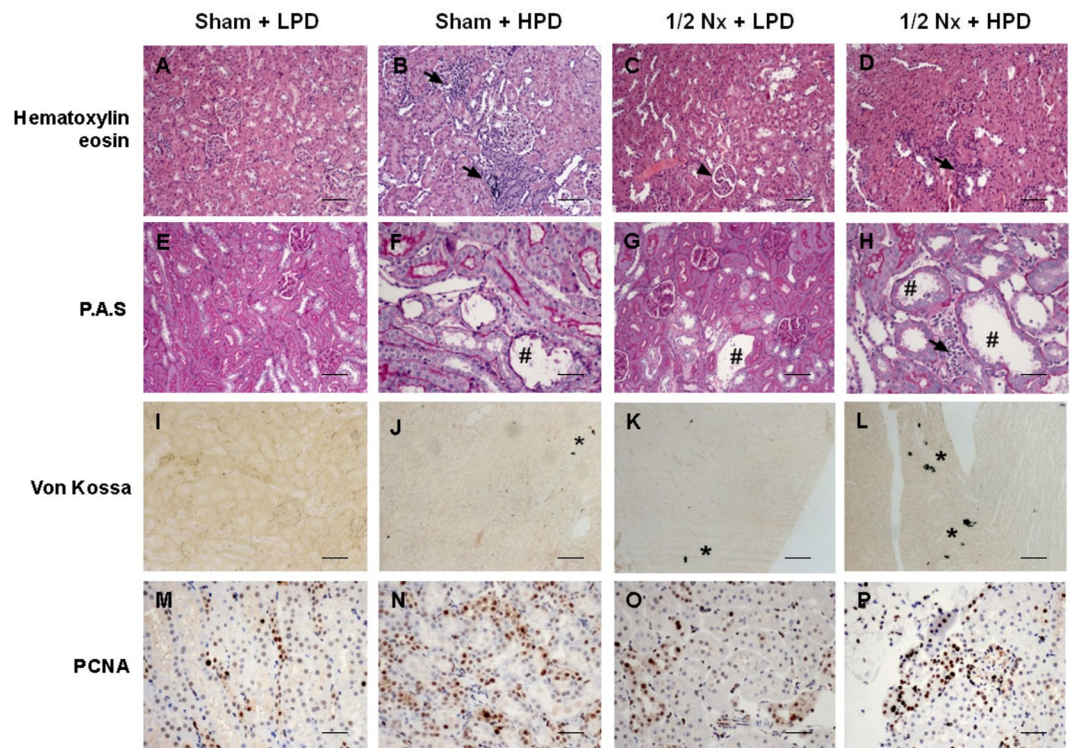
**Table 6.** Plasma and urine biochemical parameters. <sup>a</sup>p < 0.05 vs Sham LPD; <sup>b</sup>p < 0.05 vs Sham HPD; <sup>c</sup>p < 0.05 vs 1/2Nx LPD. LPD: Low Phosphate Diet; HPD: High Phosphate Diet. FEPi: Fractional excretion of phosphate. PTH: Parathyroid hormone. FGF23: Fibroblast Growth Factor 23.



**Figure 2.** Prediction of progression status depending on urinary albumin/creatinine (Alb/Cr) and phosphate/creatinine (P/Cr) (mg/mg).  $P = 1/(1 + \text{EXP}(2.093 - 4.197 \times \text{P/Cr} - 6.6 \times \text{Alb/Cr}))$ .

proximal tubular cells with less epithelial cells and apoptotic bodies in the tubular lumen. Tubular cell toxicity, inflammatory reaction and hypercellularity were most prominent in the 1/2 Nx HPD rats (Fig. 3E–H). Von kossa staining documented the presence of several foci of calcification in kidneys from sham rats on a HPD. The calcification was much more evident in 1/2Nx rats on a HPD (Fig. 3I–L). PCNA immunohistochemical staining illustrated enhanced tubular cells proliferation in an attempt to replace damaged cells. While sham rats on a HPD had a significant increase in cell proliferation, PCNA staining with a parallel increase in inflammatory cell infiltrate was most evident observed in 1/2 Nx rats on a HPD (Fig. 3M–P).

**Renal expression of p65 and  $\alpha$ -Klotho.** There was a tendency to increase the nuclear expression of p65 (inducible fragment of NF $\kappa$ B, a pro-inflammatory transcription factor) in rats with increased phosphaturia



**Figure 3.** Excessive phosphaturia promotes renal injury. Renal samples from Sham + LPD, Sham HPD, 1/2Nx + LPD and 1/2Nx + HPD groups of rats were analyzed with hematoxylin-eosin staining (A–D), periodic acid staining (E–H), von Kossa (I–L) and PCNA immunostaining (M–P). Arrows: inflammatory reaction and hypercellularity; Arrowhead: glomerulus lobulation; # Acute tubular necrosis; \*presence of phosphate deposits. Magnification: x100. Scale Bar: 50  $\mu$ m.

(Fig. 4A). These differences were significant in Nx1/2 rats as compared to their respective Sham groups (Fig. 4C). Renal Klotho expression was also evaluated by western blot and the results are shown in Fig. 4B and D. In rats on a HPD with the accompanying increase in phosphaturia, there was a decrease of renal Klotho that was remarkable in 1/2 Nx rats on the HPD as compared to Sham HPD ( $^b p < 0.05$ ) or Nx1/2 LPD ( $^* p < 0.05$ ).

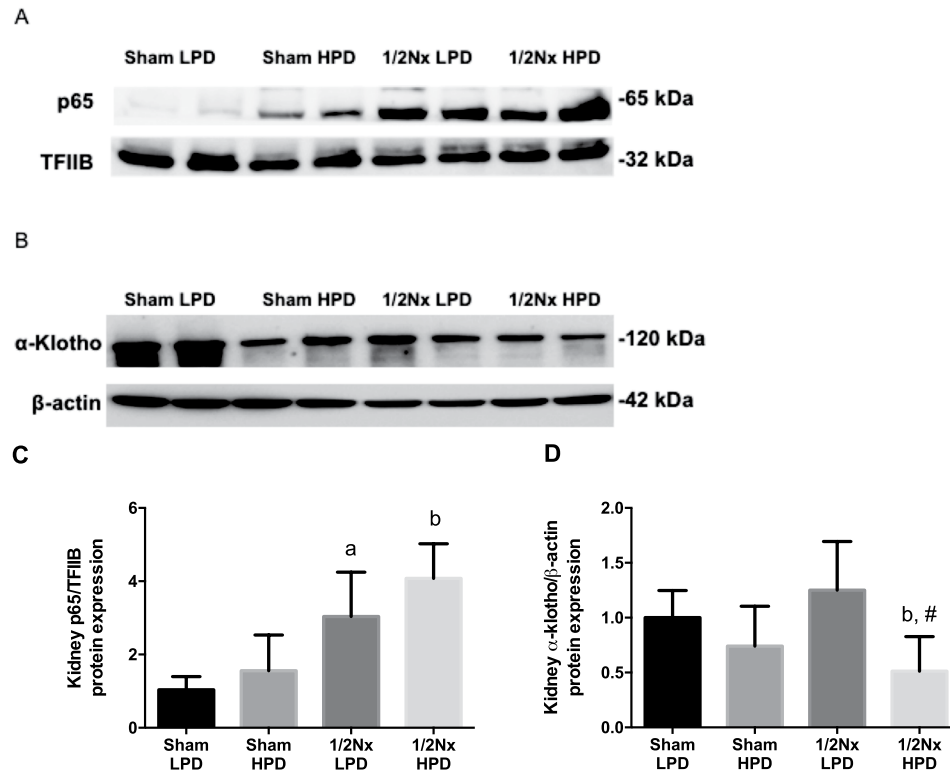
**Oxidative stress.** Kidneys from rats fed a HPD, as compared to their sham or 1/2 Nx LPD controls, had increased activity of the critical antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) (Fig. 5A) suggesting that an increased renal load of phosphate may trigger an antioxidant response through an increased production of reactive oxygen species (ROS). Of interest was the finding of a significant negative correlation between GPx activity and renal  $\alpha$ -Klotho expression (Fig. 5B).

**Animal studies with Zucker rats and antioxidant.** The role of oxidative stress in the progression of renal injury was evaluated in Zucker rats, a model of metabolic syndrome, by treatment with the antioxidant Mangiferin or placebo during 8 weeks. Table 7, shows that at 16 weeks of age Zucker rats developed metabolic syndrome and dietary phosphate overload (secondary to increased food intake). Renal histology is shown in Fig. 6, control lean animals show normal histology; kidneys from obese Zucker rats receiving placebo presented tubulointerstitial lesions including focal areas of tubular atrophy with dilation, tubular hyperplasia and thickening of the tubular basement membrane, a moderate degree of interstitial fibrosis and inflammatory infiltrate surrounding the damaged tubules, with minor calcification. Antioxidant treatment with Mangiferin resulted in attenuation of renal lesions, mainly manifested by a reduction in tubular damage and interstitial fibrosis; the improvement of inflammatory infiltrate and the calcification was less remarkable (Fig. 6).

**In vitro studies with HEK-293.** A direct effect of high phosphate concentration on the production of ROS by kidney cells was evaluated *in vitro*. HEK-293 cells were cultured in increasing concentrations of inorganic phosphate: basal (0.9 mM), 2.6, 3.3 and 5 mM. After 24 hours, the H2DCFDA fluorescent probe showed the presence of ROS that increased in a phosphate concentration-dependent manner (Fig. 7A). Likewise, high phosphate concentration also increased endogenous production of peroxynitrites in HEK-293 cells as indicated by the higher fluorescence of the DHRH probe (Fig. 7B). Finally, high phosphate concentrations decreased the content of reduced glutathione reported by the probe CMDFA (Fig. 7C).

Figure 8 shows that preincubation of HEK-293 cells with melatonin prevents the increase of DHRH intensity induced by high P concentration (5 mM) and also increases the content of glutathione (CMDFA) ( $p < 0.001$ ).





**Figure 4.** Burden phosphate reduces Klotho and promotes inflammation. Western blotting of protein extracts from kidney tissue. For detection of  $\alpha$ -klotho (A) was used the cytoplasmic fraction and  $\beta$ -actin as loading control. For p65 fragment from NF- $\kappa$ B (B) detection was used the nuclear fraction of renal protein extracts and TFIIB as loading control. Quantification of western blots of Klotho (C) and p65 (D) were performed by measurement of average relative density and normalized to  $\beta$ -actin levels. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs Sham LPD; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. Sham HPD and <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. Nx1/2 LPD.

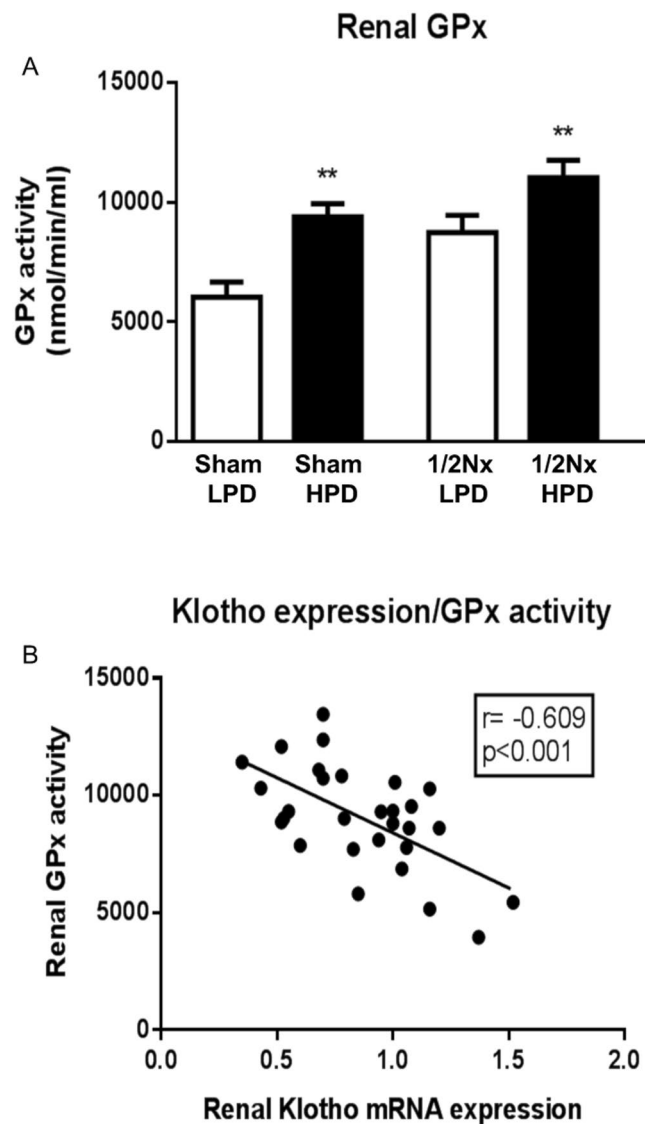
## Discussion

The present study was performed to determine whether the progression of renal disease in patients with moderate renal failure and normal serum phosphate was affected by the amount of phosphaturia. After a mean follow up of almost 3 years, the results showed that phosphaturia predicted progression of renal disease. Our clinical results suggested that an excessive tubular load of phosphate may damage the kidney. This concept was validated by additional studies in experimental animals and cultured kidney tubular cells.

We selected a group of patients with metabolic syndrome without overt proteinuria to have a uniform group of patients with early CKD (stages 2 and 3). Because albuminuria is associated with CKD progression, the presence of overt proteinuria could have obscured the finding of an independent effect of phosphaturia on progression of renal disease. Although unexpected, it was interesting to observe that even a minor degree of albuminuria negatively affected renal function.

A strength of this work is that during the entire study, patients received their medical care from the same physician. Thus, there were uniform criteria for the use of medications and for the management of hypertension, dyslipidemia and glucose control. In addition, because metabolic syndrome is so common our findings from the present study can be extrapolated to a large number of patients.

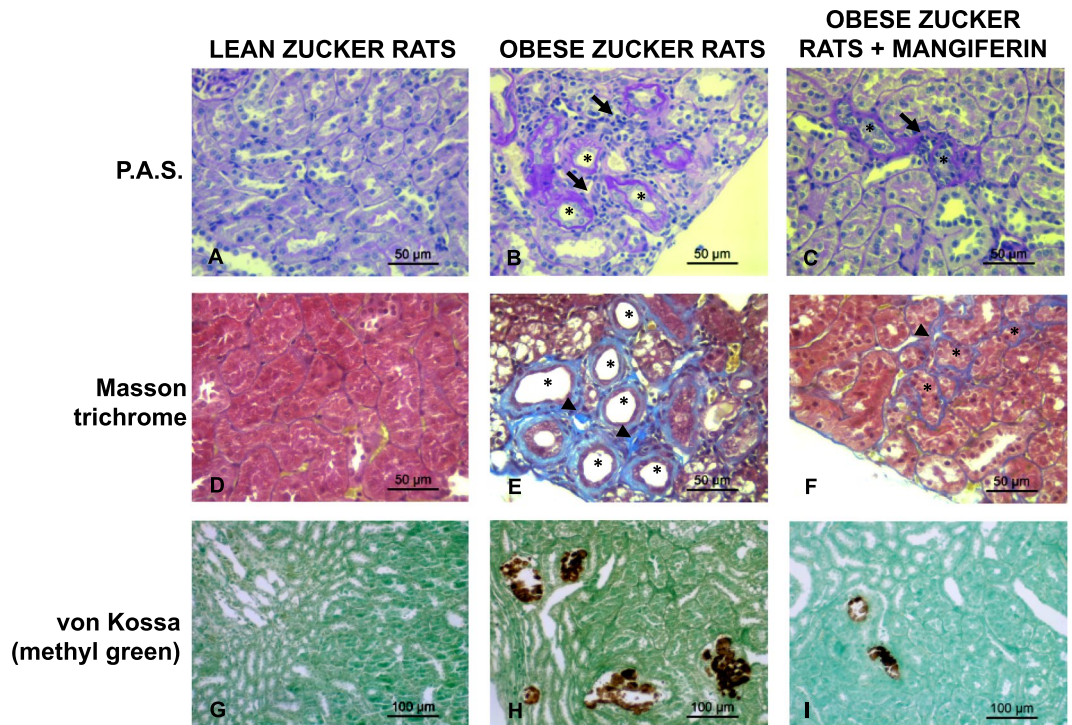
The animal studies were designed to determine the site of the phosphaturia-induced kidney damage that was observed in patients. The aim was to explore whether kidney injury can be induced by increased phosphaturia without hyperphosphatemia. Histological analysis revealed that a HPD, predominantly in moderate renal failure (1/2Nx) rats, produced tubular cell toxicity, inflammatory infiltrates, and cell proliferation with the latter presumably to repair damage. There was also evidence of focal calcification although the inflammatory response was not circumscribed to the small area of calcification. The increased expression of p65 in kidneys from rats on a HPD indicates that excessive phosphate promotes inflammation. Furthermore, the increased activity of the antioxidant enzyme GPx, suggests a tissue response to oxidative stress in rats on a HPD. The influence of oxidative stress on renal damage was further demonstrated by studies in obese Zucker rats with metabolic syndrome. These animals showed hyperphosphatemia and significant renal lesions, as compared with their lean counterparts. These lesions were more evident at tubular level and were improved after antioxidant treatment. A direct effect of high phosphate concentration on oxidative stress was also shown in HEK-293 cells in which increased production of ROS was seen in response to a graded increase in extracellular phosphate concentration. This pro-oxidant effect of high P on HEK-293 cells was also supported by the *in vitro* studies showing a beneficial antioxidant effect of Melatonin. Finally, gene and protein expression of renal  $\alpha$ -Klotho was reduced in rats on a HPD. Furthermore, the decrease in  $\alpha$ -Klotho expression was proportional to the increase in GPx.



**Figure 5.** Elevated phosphaturia generates renal oxidative stress. Glutathione peroxidase (GPx) activity in renal tissue. **(A)** GPx activity was determined in 20  $\mu$ g of total protein extracts of kidney samples by a coupled reaction with glutathione reductase. Units are expressed as nanomoles of NADPH oxidized per minute and milliliter. White bars are LPD (0.2%P diet) groups and black bars are HPD (1.2%P diet) groups. t-test analysis \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . **(B)** Negative correlation between renal mRNA  $\alpha$ -klotho expression and GPx activity.

	Lean-Zucker	Obese Zucker	Obese Zucker + Mangiferin
Weight Gain	59.7	255.3 <sup>a</sup>	246.8 <sup>a</sup>
Intake (g/day)	15.1 $\pm$ 1.62	26.6 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	25.4 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>
Serum P, mg/dl	4.5 $\pm$ 0.83	6.9 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	7.4 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>
Serum Creat, mg/dl	0.49 $\pm$ 0.083	0.44 $\pm$ 0.052	0.35 $\pm$ 0.053
Glucose, mg/dl	147 $\pm$ 11,7	184 $\pm$ 38,3	187 $\pm$ 21.2
Cholesterol, mg/dl	61 $\pm$ 6.1	113 $\pm$ 9.1 <sup>a</sup>	105 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>
LDL, mg/dl	4.4 $\pm$ 1.22	10.1 $\pm$ 3.89 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 3.97 <sup>a</sup>
HDL, mg/dl	25.8 $\pm$ 2.86	42.6 $\pm$ 2.67	46.7 $\pm$ 2.56
Triglycerides, mg/dl	49 $\pm$ 10	709 $\pm$ 254.5 <sup>a</sup>	841 $\pm$ 265.9 <sup>a</sup>
Insulin, ng/ml	0.36 $\pm$ 0,12	11.7 $\pm$ 7.95 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 3.44 <sup>a</sup>

**Table 7.** Metabolic Syndrome and renal parameters in Obese rats treated or not with antioxidant. <sup>a</sup>Significant differences at least  $p < 0.05$  vs Lean Rats.

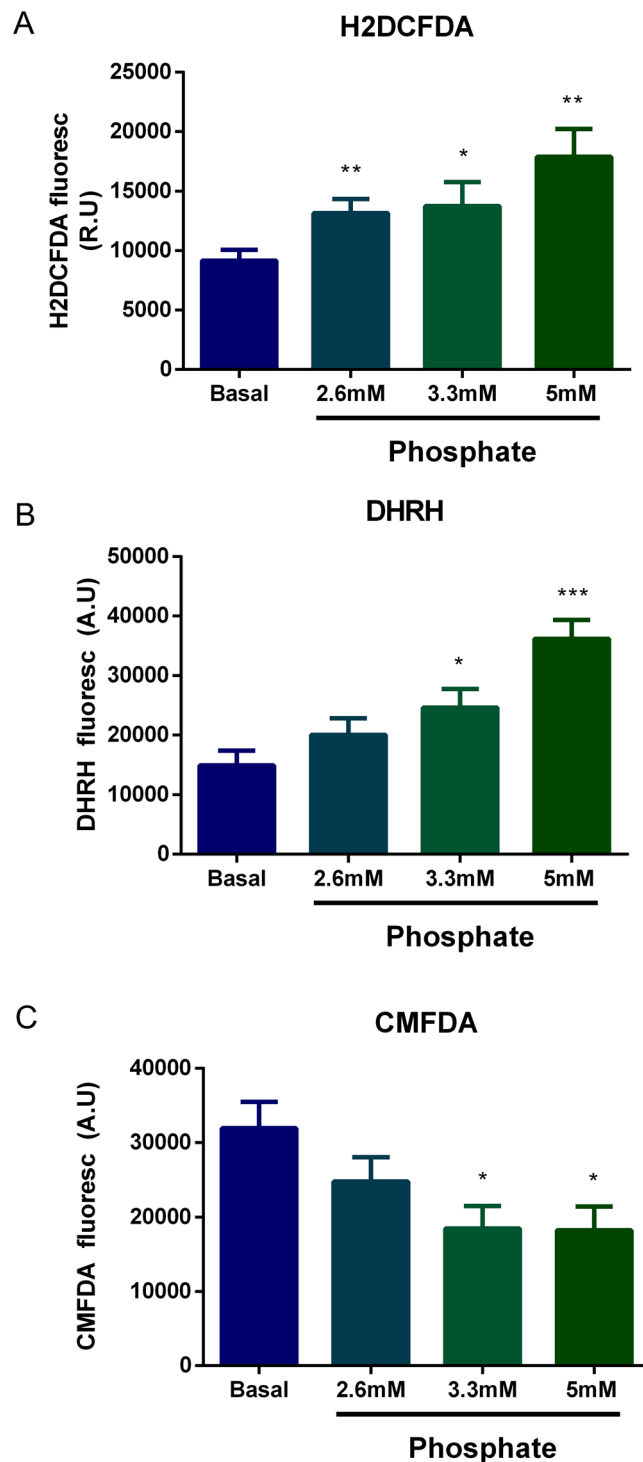


**Figure 6.** Treatment with Mangiferin reduces renal injury in obese Zucker rats. Kidney tissue samples from Lean, Obese Zucker rats and Obese Zucker rats plus 8 weeks of mangiferin treatment were analyzed with PAS stained sections (A–C) where tubular atrophy (asterisks) and peritubular inflammatory infiltrate (arrows) were observed. The thickening of the basement membrane was also evidenced in atrophic tubules (asterisks) with the Masson Trichrome, as well as interstitial fibrosis (arrowheads) (D–F). Mineral deposits are depicted by the brown color in von Kossa stain (G–I). Magnification: x400, scale Bar: 50 µm for PAS and Masson Trichrome, x200 and scale bar 100 µm for von Kossa.

Our results are unable to disclose if the generation of oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation are independent processes or they are tightly interrelated to each other. It is clear that in an early stage of kidney disease elevated phosphaturia promotes oxidative stress, p65 activation and renal injury. In previous work from our group it was observed that, in vascular smooth muscle cells treated with high phosphate and calcitriol, antioxidant treatment decreased p65 activation suggesting a central role of oxidative stress in p65 activation<sup>7</sup>.

Taken together one could assume that increased phosphaturia generates kidney injury through oxidative stress and inflammation that leads to a reduction in  $\alpha$ -Klotho expression. Moreover, we have also recently demonstrated in animal models that excessive phosphaturia through Wnt- $\beta$ -catenin activation, decreases renal Klotho expression which in turn, may prevent the phosphaturic action of FGF23<sup>8</sup>. Other authors have shown that high phosphate concentration is toxic and pro-apoptotic to tubular cells<sup>9–11</sup>. Of relevance, a recent work by Zhou *et al.*<sup>12</sup> has shown that injured renal tubular cells stimulate renal fibrosis through activation of the fibroblast Wnt signaling system, a mechanism by which excessive phosphaturia may produce renal damage. Thus, these cited studies support our findings that phosphaturia has the potential to produce renal injury and accelerate CKD progression even in early stages of renal disease.

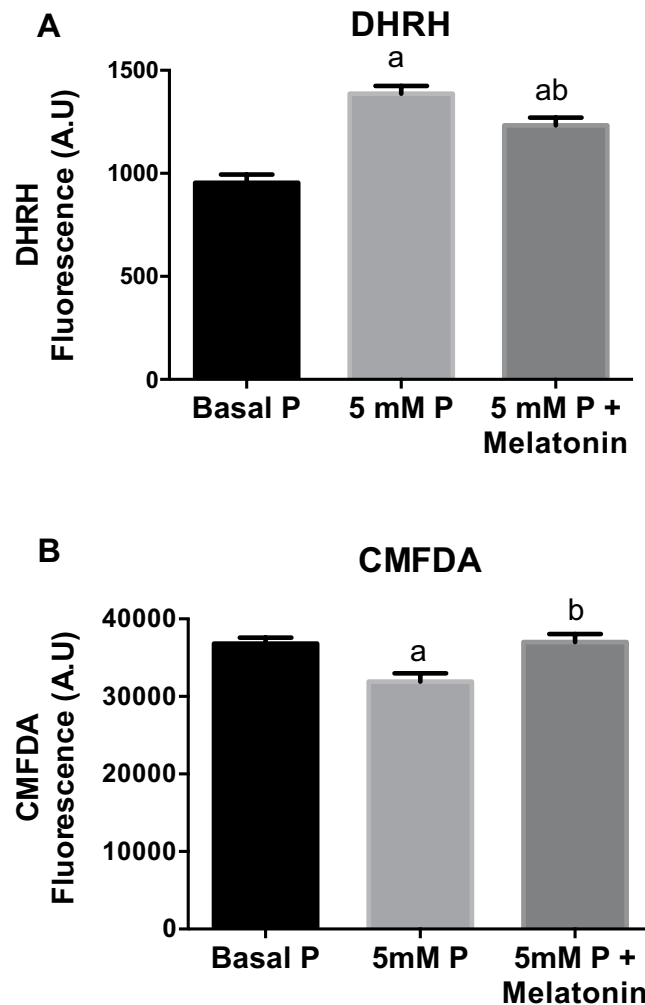
Based on our clinical and animal studies, it would appear that high phosphate intake increases the phosphate burden and the resulting phosphaturia produces secondary kidney damage by inducing tubular injury and interstitial fibrosis. Other studies have found that subjects with high serum phosphate had a higher risk for developing kidney disease<sup>13–15</sup>. In patients with more advanced renal disease, the progression of renal disease may be predetermined by other factors making it difficult to isolate phosphaturia as an independent factor predicting progression of renal disease. Moreover, in advanced CKD, the fractional excretion of phosphate is already very high limiting the capacity to further enhance phosphaturia. That is the reason hyperphosphatemia develops. At present, there are not studies in patients with CKD stages 2 to 3 in which the relationship between phosphaturia and progression of renal disease has been studied. In studies in patients with more advanced CKD from a variety of renal diseases and with different magnitudes of proteinuria, an effect of phosphaturia on renal disease progression has not been shown, but the limitation to further enhance phosphaturia may play a role<sup>15,16</sup>. Isakova *T et al.* found in patients with relatively preserved kidney function, GFR between 30 and 44 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, that high FGF23 was associated with significantly higher risk of end-stage renal disease. Unlike FGF23, neither PTH nor FePi were associated with mortality in fully adjusted models that excluded FGF23<sup>16</sup>. As compared with our patients, patients from the Isakova's study had more advanced stage of CKD with higher levels of FGF23 and more severe cardiovascular disease. At this stage of kidney failure other factors besides proteinuria and FePi may play a more relevant role in the renal disease progression.



**Figure 7.** Phosphate increases Reactive Oxygen Species (ROS) in HEK-293 cells. Intracellular ROS was determined using the probes (A) H2DCFDA (detects presence of ROS unspecifically) (B) DHRH (determinates peroxynitrate) (C) CMFDA (detects levels of glutathione) after 24 hours of incubation with different concentrations of inorganic phosphate. (t-test analysis. \* $p < 0.05$  vs basal phosphate; \*\* $p < 0.01$  vs basal phosphate; \*\*\* $p < 0.001$  vs basal phosphate. Basal phosphate is the content of phosphate in the culture medium at 0.9 mM.

Efforts to reduce progression of renal disease may have significant social and economic impact. The mechanisms involved in kidney injury in CKD are multifactorial; an increased acid excretion per remaining nephron has been shown to produce interstitial fibrosis and metabolic acidosis due to CKD is associated with progressive deterioration of kidney function experimental animals<sup>17</sup>.





**Figure 8.** In HEK-293 cells, the addition of melatonin prevents oxidative stress induced by high levels of inorganic phosphate. Intracellular ROS were determined by using the probes (A) DHRH and (B) CMFDA after 24 hours of incubation in a medium containing normal P concentration (0.9 mM), high levels of phosphate (5 mM P) and high phosphate plus melatonin ( $10^{-5}$  M). <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs normal phosphate; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs 5 mM phosphate.

The results of the present study may serve as the basis for future interventional studies with dietary phosphate restriction or phosphate binders that are designed to determine if a reduction in intestinal absorption of phosphate in stages 2 to 3 CKD helps to preserve renal function. Moreover, besides the phosphate in food as protein, a significant burden of dietary phosphate is due to unrestricted intestinal absorption of phosphate salts present in beverages and food additives<sup>18,19</sup>. If an excess of phosphate absorption from food additives and beverages is shown to have negative effects on patients with early to moderate CKD, health authorities should be aware.

In conclusion, in patients with metabolic syndrome and early CKD, phosphaturia and only marginal albuminuria were associated with a deterioration in renal function. Experimental studies showed that excessive phosphaturia was associated with renal injury, inflammation, oxidative stress and decreases in renal Klotho.

## Methods

**Study design in patients.** This is an observational retrospective study in patients followed in our renal outpatient clinic between June 2006 and June 2014. The study was approved by the Reina Sofia Hospital Ethics Committee and an informed consent was obtained. Authors state our adherence to the Declaration of Helsinki.

All studied patients had metabolic syndrome and had to fulfill three of the following five criteria to be considered metabolic syndrome<sup>20</sup>: (1) Waist circumference  $\geq 88$  cm in women and  $\geq 102$  cm in men; (2) serum triglycerides  $\geq 1.65$  mmol/L or drug treatment for hypertriglyceridemia; (3) low high-density lipoprotein, men  $< 1$  mmol/L, women  $< 1.25$  mmol/L or drug treatment; (4) elevated fasting glucose ( $\geq 6.05$  mmol/L) or drug treatment for diabetes mellitus; and (5) systolic blood pressure  $\geq 130$  and/or diastolic blood pressure  $\geq 85$  mmHg or treatment for arterial hypertension. Glomerular, tubular and interstitial pathologies were excluded.

Patients were 18 to 86 years old with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) between 90 and 30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Only patients with minimal proteinuria (albumin/creatinine ratio  $< 0.4$  mg/mg and protein/creatinine ratio  $< 1$  mg/mg) were included. Patients were closely followed as outpatients during a period that

ranged from 1 to 6 years. They were seen in clinics at least twice per year. On each visit, the same physician adjusted patient medications and blood and urine were collected for laboratory tests.

Baseline data obtained from the patient medical record included age, sex, body mass index, waist circumference, blood pressure, and pre-existing cardiovascular disease. Laboratory tests included serum creatinine, glucose, calcium, phosphate, magnesium, albumin, and lipids and urine phosphate, protein, albumin and creatinine. Medications including angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, angiotensin receptor blockers (ARB), loop and thiazide diuretics, statins, fibrates, xanthine oxidase inhibitors, oral hypoglycemic drugs and insulin use, and anticoagulation and antiplatelet drugs were recorded. Hypertension was defined as a systolic blood pressure >140 mmHg and/or diastolic blood pressure >90 mmHg or a previous diagnosis of hypertension on blood pressure medication. Pre-existing cardiovascular disease was defined as a clinical history of coronary artery disease, hypertensive heart disease, valvular heart disease, cardiomyopathy, arrhythmia, peripheral vascular disease, cerebral infarction, cerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage. Abnormalities in glucose metabolism were defined as a fasting glucose level >6.05 mmol/L or the use of hypoglycemic medication.

Blood was collected for measurement of standard serum biochemistry and hemogram. Morning urine samples were used for quantification of urine electrolytes, phosphate, albumin, protein and creatinine. Serum albumin, serum and urinary levels of creatinine, urea, sodium, phosphate, potassium and concentration of albumin and protein in urine were measured with an Architect c-16000 (Abbott®, Chicago, Illinois (USA)). The eGFR was calculated by CKD-EPI formula<sup>21</sup>. Hemogram was measured by Pentra 120 Retic® (ABX, France).

Daily habits and medications for control of blood pressure, serum lipids and glucose were maintained and adjusted according to values obtained on each visit. Non-steroidal anti-inflammatory drugs were avoided.

The rate of change in eGFR (ml/min per 1.73 m<sup>2</sup> per year) was calculated from the difference between last visit and baseline. This change in eGFR coincided with the calculated, using data points (range 2 to 8 points) throughout the follow up period with the use of the least-squares method.

**Animal Models.** Male Wistar rats underwent right nephrectomy to obtain a heminephrectomy (1/2Nx) and controls animals underwent sham operation. The animals were fed either a low phosphate (0.2%) diet (LPD) or high phosphate (1.2%) diet (HPD). Rats were allocated to the following groups: Sham + LPD (phosphate 0.2%, calcium 0.6%), n = 9; Sham + HPD (phosphate 1.2%, calcium 0.6%), n = 8; 1/2 Nx + LPD, n = 12 or 1/2 Nx + HPD, n = 12. After three weeks, rats were euthanized and exsanguinated by aortic puncture. The left kidney was sliced and fixed in 4% paraformaldehyde for histology and part of the tissue (cortex and medulla) was stored at -80 °C for further analysis.

The effect of an antioxidant treatment was evaluated in a rat model of metabolic syndrome, Zucker rats. Sixteen female obese Zucker rats were randomly assigned to two groups of 8 rats each. One group received 8 weeks of Mangiferin (Neuron Bio S.A, Granada, Spain), a potent antioxidant, and the other group received placebo. In addition, lean Zucker rats (n = 8) were used as controls. Rats were trained to eat gelatin pellets, which they perceived as a treat. Gelatin pellets were prepared from cooking gelatin (McCormick España SA, Sabadell, Spain) and distilled water using gelatin molds. Two types of pellets were prepared, pellets containing antioxidant and pellets without antioxidant (placebo). The amount of mangiferin within each pellet was adjusted for each rat to provide a dose of 15 mg/kg body weight. Obese Zucker rats received pellets with either mangiferin or placebo and lean rats, pellets with placebo. Rats were fed *ad libitum* and the pellets were administered once daily in the morning during a 8 week period. Control of food intake (g/day) was performed. In addition, body weight was recorded at the beginning and at the end of the experiment.

All experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Cordoba, and all rats received humane care in compliance with the guiding principles in the Guide for the Care and use of laboratory animals: Eighth edition.

**Biochemical measurements in blood and urine.** For the experiment with heminephrectomized rats and different content of phosphate diet two days before sacrifice, rats were placed in metabolic cages. Urine samples were collected during a 24 h period for biochemical analysis. At sacrifice plasma ionized calcium was measured using a selective electrode. Creatinine, phosphate and urine protein concentrations were measured using colorimetric assays. Plasma intact parathyroid hormone (PTH) was quantified by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay kit (Immutopic, San Clemente, CA). Intact fibroblast growth factor 23 (FGF23) concentration was determined using a FGF23 ELISA kit (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan).

In the experiment with Zucker rats, serum levels of creatinine, phosphate, total cholesterol, LDL, HDL, glucose and triglycerides were analyzed using colorimetric assays (Biosystem, Barcelona, Spain). Insulin was evaluated through radioimmunoassay (Millipore, St. Charles, MO, USA).

**Protein isolation and western blot.** Cytosolic and nuclear proteins were isolated from renal tissue using specific buffers lysis and the supernatants were centrifuged and stored. In the cytosolic fraction, renal  $\alpha$ -klotho protein levels were measured using an anti  $\alpha$ -klotho monoclonal antibody (Trans Genic Inc., Kobe, Japan) in a 0.5 mg/ml concentration.  $\beta$ -actin was used as housekeeper. The expression of p65 fragment from nuclear factor light chain kappa B (NF- $\kappa$ B) was determined in the nuclear fraction using polyclonal antibody and transcription factor IIB (TFIIB) expression was determined using a monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA).

**Histological analysis and immunohistochemistry.** Microscopic evaluation of the kidneys was performed in tissue sections (3  $\mu$ m) fixed with 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin-eosin, Masson Trichromic or periodic acid Schiff. Renal calcification and

mineralization was assessed by von Kossa staining. Immunohistochemistry analyses were performed with a Dako CytoMat staining kit (Glostrup, Denmark). Renal sections were dewaxed in xylene, rehydrated in ethanol and incubated at 100 °C in ChemMate™ Target Retrieval Solution pH 6.0 (Dako, Barcelona, Spain) for 20 min. After washing in phosphate buffered saline (PBS), slides were incubated for 10 min in 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase. Then, slides were incubated with anti-rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 60 min. Subsequently, slides were washed for 5 min in PBS and incubated 30 min with a horseradish peroxidase-labeled polymer. Diaminobenzidine for 5 min was used to develop the brown color of positive areas. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt medium (Labobam, Navarra, Spain).

**Glutathione Peroxidase Activity.** At sacrifice, kidney slices were placed in liquid nitrogen to prevent tissue deterioration and subsequently stored at −80 °C. To determine Glutathione Peroxidase (GPx) activity, renal tissue was homogenized and total renal protein was extracted using a specific buffer based on 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 1 mM dithiothreitol (DTT). Then, 20 µg of protein was assayed to determine the activity by spectrophotometry with a GPx assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

**Renal  $\alpha$ -klotho expression.** Total RNA from kidney tissue was extracted with 1 mL of TRI reagent (Sigma-Aldrich CO). Isolated RNA samples were treated with DNase amplification grade (Sigma-Aldrich CO) following manufacturer instruction. Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) was assayed with 50 ng of treated RNA using SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit (Bioline Reagents Limited, UK). Primers for PCR were synthesized with Oligo program for  $\alpha$ -klotho (Forward 5'-GAAATGGCTGGTTGTCTCG-3' Reverse 5'-CCTGATGGCTTTTAAGCTTTC-3') and GAPDH as housekeeping (Forward 5'-AGGGCTGCCTTCTCTTGTGAC-3' Reverse 5'-TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG-3'). The expression of target genes was normalized to the expression of GAPDH according to the  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct method.

**Determination of Oxidative Stress *in vitro*.** Human Embryonic Kidney-293 (HEK-293) cells were cultured with fetal bovine serum (FBS)-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) in 96-wells clear bottom black polystyrene microplates. Once cells were at 90–95% confluence, they were supplemented with monobasic and dibasic sodium phosphate in 1:2 proportions to obtain concentrations of 2.6, 3.3 or 5 mM of inorganic phosphate. Other HEK-293 cells were cultured with inorganic phosphate (5 mM) plus melatonin  $10^{-5}$  M that was added 30 minutes before of the phosphate administration. After 24 hours, intracellular content of reactive oxygen species was measured using fluorescent probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 25 µM, 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA, Thermo Fisher Scientific) at 1 µM or Dihydrorhodamine (DHRH, Thermo Fisher Scientific) at 2.5 µM. Probes were incubated at 37 °C for 30 minutes. After incubation, cells were washed and fluorescence was measured with a fluorimeter Tecan F200pro (Tecan Group Ltd, Switzerland) at an excitation/emission wavelength of 485/510 nm.

**Statistical Analysis.** Continuous variables are shown as mean ( $\pm$  standard deviation, SD) or median (interquartile range). Categorical variables are presented as percent (%). Baseline characteristics were compared between the two groups, progressors and non progressors using t test or  $\chi^2$  tests as appropriate. Simple correlation analysis was used to compare a relationship between rate of change in eGFR and other variables. Forward stepwise multiple regression analysis was used to identify variables that could predict the change in eGFR. A model to predict progressors vs non-progressor was constructed using logistic regression analysis. Data obtained from experimental work are presented as the mean  $\pm$  SD; means were compared by one way ANOVA followed by Tukey test as post hoc analysis. All reported P-values were two-sided. A P-value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS statistical program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## References

- Block, G. A. *et al.* Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **JASN** **15**, 2208–2218 (2004).
- Rodriguez-Benot, A., Martin-Malo, A., Alvarez-Lara, M. A., Rodriguez, M. & Aljama, P. Mild hyperphosphatemia and mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **46**, 68–77 (2005).
- Kestenbaum, B. Phosphate metabolism in the setting of chronic kidney disease: significance and recommendations for treatment. *Semin. Dial.* **20**, 286–294 (2007).
- Dhingra, R. *et al.* Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch. Intern. Med.* **167**, 879–885 (2007).
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.* **S1-130** 10.1038/ki.2009.188 (2009).
- Block, G. A. *et al.* Phosphate homeostasis in CKD: report of a scientific symposium sponsored by the National Kidney Foundation. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **62**, 457–473 (2013).
- Martinez-Moreno, J. M. *et al.* High phosphate induces a pro-inflammatory response by vascular smooth muscle cells and modulation by vitamin D derivatives. *Clin. Sci.* **131**, 1449–1463 (2017).
- Muñoz-Castañeda, J. R. *et al.* Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31**, 3858–3867 (2017).
- Di Iorio, B. R. *et al.* Phosphate attenuates the anti-proteinuric effect of very low-protein diet in CKD patients. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **28**, 632–640 (2013).
- Haut, L. L., Alfrey, A. C., Guggenheim, S., Buddington, B. & Schrier, N. Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int.* **17**, 722–731 (1980).
- Ohnishi, M. & Razzaque, M. S. Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 3562–3571 (2010).

12. Zhou, D. *et al.* Tubule-Derived Wnts Are Required for Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **28**, 2322–2336 (2017).
13. Uribarri, J. Dietary phosphorus and kidney disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1301**, 11–19 (2013).
14. Sakaguchi, Y. *et al.* Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int.* **88**, 833–842 (2015).
15. Selamet, U. *et al.* Relationship of dietary phosphate intake with risk of end-stage renal disease and mortality in chronic kidney disease stages 3–5: The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int.* **89**, 176–184 (2016).
16. Isakova, T. *et al.* Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA* **305**, 2432–2439 (2011).
17. Łoniewski, I. & Wesson, D. E. Bicarbonate therapy for prevention of chronic kidney disease progression. *Kidney Int.* **85**, 529–535 (2014).
18. Sherman, R. A. Dietary phosphate restriction and protein intake in dialysis patients: a misdirected focus. *Semin. Dial.* **20**, 16–18 (2007).
19. Martin, K. J. & González, E. A. Prevention and control of phosphate retention/hyperphosphatemia in CKD-MBD: what is normal, when to start, and how to treat? *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **6**, 440–446 (2011).
20. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
21. Levey, A. S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **150**, 604–612 (2009).

## Acknowledgements

This work has been partially supported by a Spanish Government Grant from the Programa Nacional I + D + I 2008–2011 from the Instituto de Salud Carlos III (PI14/00638 and PI14/00467) with co-financing from European Funds (FEDER), Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo from the Junta de Andalucía (CVI-7925) and REDINREN from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and EUTOX. This work was also supported by PI-0311-2014 Junta de Andalucía and PI12/01866 and EUTOX. JR Muñoz-Castañeda is a senior researcher supported by the Nicolás Monardes Programme, Consejería de Salud-SAS (Junta de Andalucía).

## Author Contributions

R.S.: Providing conception and design, data acquisition, data analysis and interpretation. D.-T.J.M.: Data acquisition, data analysis and interpretation. P.-R.M.M.V.: Data acquisition, data analysis and interpretation. R.A.: Data acquisition, data analysis and interpretation. S.-R.M.D.: Data analysis and interpretation. R.E.: Data analysis and interpretation. V.N.: Data analysis and interpretation. O.R.: Data analysis and interpretation. F.A.: Data analysis, interpretation, writing. M.-C.J.R.: Providing conception and design, data analysis, writing and interpretation and supervision. M.-M.A.: Data analysis and interpretation. A.R.: Data acquisition and data analysis. E.A.-T.: Data analysis, interpretation and supervision. A.P.: Data analysis and interpretation. R.M.: Providing conception and design, data analysis, writing and interpretation supervision.

## Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## EN REVISIÓN

**TITLE:** Phosphaturia and the source of dietary phosphate in patients with chronic kidney disease.

**SHORT TITLE:** Phosphaturia and the source of dietary phosphate.

**AUTHORS:** Pendón-Ruiz de Mier MV<sup>1,2,3,4</sup>, Santamaría R<sup>1,2,3,4</sup>, Rodelo-Haad C<sup>1,2,3,4</sup>, López-Zamorano MD<sup>3</sup>, Membrives C<sup>1,2</sup>, López R<sup>1,2</sup>, Muñoz-Castañeda JR<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Caravaca F<sup>5</sup>, Martín-Malo A<sup>1,2,3,4</sup>, Soriano S<sup>1,2,3,4</sup>, Rodríguez M<sup>1,2,3,4</sup>.

<sup>1</sup> Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Cordoba, Spain.

<sup>2</sup> University of Cordoba, Spain.

<sup>3</sup> Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain.

<sup>4</sup> Spanish Renal Research Network (REDinREN), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Nephrology Service, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain.

**\*Corresponding author:** [juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es](mailto:juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es). Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC). Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Avd. Menendez-Pidal s/n. 14004, Cordoba, Spain. Phone/FAX: +34957213791.

**KEYWORDS:** Phosphaturia, phosphate intake, FGF23, PTH, CKD.

### ABSTRACT

Serum phosphate concentration increases with the reduction of renal function. The phosphaturic hormones (parathyroid hormone (PTH) and fibroblast growth factor-23 (FGF23)) prevent the increase in serum phosphate levels during early stages of chronic kidney disease (CKD). In addition, the control of serum phosphate requires a restriction dietary phosphate. The aim of our study is to characterize, in a group of 71 patients with stage II-III CKD and normal serum phosphate level, the relationship between the urinary excretion of phosphate and the different sources of phosphate ingested. A secondary objective was to analyze whether of source of dietary phosphate has an effect on PTH and FGF23 concentrations. A dietary survey was performed to estimate the average amount of phosphate ingested daily and measurements and calculations of urine phosphate were also obtained.

The average intake of total phosphate was (mean±SD) 869 ± 289 mg/day. A 64% was from animal source, 22 % from vegetables and 14% from inorganic phosphate. Phosphaturia measured in a 24-hour urine collection did not correlate with the amount of ingested phosphate. However, a significant correlation was observed between dietary phosphate and phosphate/urea ratio in urine, finding a positive correlation with the proportion of inorganic phosphate from additives which are easily absorbable. The total phosphaturia did not correlate with PTH or FGF23, however these phosphaturic hormones did correlate with the fractional excretion of phosphate.

Our results suggest that the phosphate/urea ratio in 24-hour urine is a marker of inorganic phosphate intake which is to a large extent the phosphate absorbed. This finding might be useful in the clinical practice to recommend dietary actions led to control or decrease the adequate fraction of phosphate which is resulting potentially harmful for CKD progression.

## INTRODUCTION

Since early stages of chronic kidney disease (CKD) the production both fibroblast growth factor-23 (FGF23) and parathyroid hormone (PTH) increase to reduce tubular resorption of phosphate (P) so despite the reduction in glomerular filtration the serum concentration of P is maintained within normal levels (1). However, in advanced CKD (stage IV and V) the serum P concentration increases (2), because the phosphaturic effect of FGF23 and PTH are no longer able to overcome the marked reduction of glomerular filtration of P. With advance CKD, and perhaps in earlier stages of CKD, to prevent hyperphosphatemia it is reasonable to reduce the intake of P rich products without inducing malnutrition.

Almost all food components contain P. A large amount of P is found in proteins of animal origin. Also, P salts (inorganic phosphate) added to processed foods are major source of highly bioavailable dietary P because it is easily absorbed (3-6). It has been shown that the restriction of additives containing P, contributes to the control of serum P levels (6). Whereas P from animal sources are hydrolyzed and then absorbed, P from plants are poorly absorbed since it is bound to phytate and humans do not dispose of phytase, the enzyme required to extract P from phytate (7). The bioavailability of P from animal protein is 60% to 80%, from vegetables is only 40%, and from inorganic P as additives is 100% (3, 8, 9). The net absorption of P is roughly 65% and is influenced by several factors such as total P intake, food source or vitamin D levels (7, 10). The reduction of calcitriol induced by FGF23 may decrease the gut absorption of P (11). Given all these factors affecting P absorption it is not a surprise to see several reports indicating that urinary P excretion does not correlate with total phosphate intake. Therefore nephrologists may not find a good reason to measure urinary excretion of P.

There is a general agreement to recognize that high serum level of P should be corrected mainly because it is associated to mortality both in CKD and in the general population (12-15). Recently, we have observed that in early stage of CKD phosphate overload induces renal injury and accelerates renal disease progression (16). Others authors suggest that an increased P intake is associated with cardiovascular morbidity and mortality, even if the serum level of P is in the normal range (17, 18). Considering the control of dietary phosphate intake as an effective therapeutical strategy for CKD patients it would be important to have an easy method to assess P load and its source to extrapolate what degree of P is being absorbed and excreted. Ideally, as dietary recommendation protein intake should be preserved and the easily absorbable P from additives should be restricted.

Even if serum P is normal it may be important to reduce phosphate load in CKD, so the demand for PTH and FGF23 would be relieved. Recent reports indicates that increased tubular load of P, required to maintain phosphate balance, may contribute to CKD progression (5, 16). Furthermore there is increasing evidence indicating that elevation of FGF23 is associated with negative cardiovascular outcome (19).

Since phosphaturia does not correlate with total amount of phosphate ingested (20) and given the fact that urinary excretion of urea reflects protein metabolism. It may be important to determine if the magnitude of urinary phosphate excretion relative to the quantity of urea in urine reveals the amount of phosphate absorbed from other sources than proteins.

The aim of our study is to determine, in a uniform group of patients with CKD stage II-III with metabolic syndrome, if the ratio phosphate to urea in urine helps to differentiate the sources of phosphate ingested. A secondary objective was to analyze whether of source of dietary phosphate has an effect on PTH and FGF23 production.



## **METHODS**

### **Study design**

This is a cross sectional prospective study in patients followed regularly in our outpatient renal clinic. The study was approved by the Reina Sofia Hospital Ethics Committee. All patients signed the informed consent to participate in the study. Authors manifest adherence to the Declaration of Helsinki.

### **Inclusion criteria**

All patients were 18 to 85 years old with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) between 90 and 30 ml/min/1.73m<sup>2</sup> (CKD stage II-III) (21). Patients selected had limited proteinuria (albumin/creatinine ratio <0.4 mg/mg and a protein/creatinine ratio <1 mg/mg). All patients had metabolic syndrome so they fulfilled three of the following five criteria according to (22): 1) Waist circumference ≥88 cm in women and ≥102 cm in men; 2) serum triglycerides ≥150 mg/dl or drug treatment for hypertriglyceridemia; 3) low high-density lipoprotein, men <40 mg/dl, women <50 mg/dl or drug treatment; 4) elevated fasting glucose (≥110 mg/dl) or drug treatment for diabetes mellitus; and 5) systolic blood pressure ≥130 and/or diastolic blood pressure ≥85 mmHg or treatment for arterial hypertension.

### **Exclusion criteria**

Patients with serum phosphate concentration >5 mg/dl, congestive heart failure, glomerular disease, HIV infection, hepatitis B or C, chronic liver disease, systemic inflammatory disease or previous history of cancer in the last 5 years were excluded.

### **Patients**

Patients had been followed in the outpatient clinic at least twice per year and always visited the same physician who adjusted the patient medications. Blood and urine were collected for laboratory tests. Medications for control of blood pressure, serum lipids and glucose had been prescribed according to values obtained in their regular visits.

Baseline data included age, gender, body mass index, abdominal perimeter, blood pressure and comorbidities or prevalent diseases. Hypertension was defined as a systolic blood pressure >140mmHg and/or diastolic blood pressure >90mmHg or a previous diagnosis of hypertension on blood pressure medication. Abnormalities in glucose metabolism were defined as a fasting glucose level >110 mg/dl or the use of hypoglycemic medication.

Patients underwent a meticulous 3-day dietary survey prior to the extraction of blood and urine samples to estimate the average daily amount and the source of phosphate ingested. A manual estimation from nutritional tables (23) was used to estimate the intake of phosphate making a correspondence between the amount ingested by each patient and the values shown per 100 g of food. The dietary record method is suitable as a main dietary assessment method for a pan-european dietary survey to serve EFSA'S (European Food Safety Authority) purposes. Information on food consumption is recorded per day, usually per meal and between meals, which allows assessment of acute exposure. In practice no more than 4 consecutive days are recommended to be included. The form used to record consumption was open because a closed form could be less adequate due not all consumed foods might be listed. Food quantities are assessed by using the utensils commonly found in homes and indicating the amount consumed of each product (24). Prior to recording information, the patients were trained on how to adequately describe the foods, amounts consumed, cooking methods, etc. The survey was reviewed with the patient during the clinic visit with the aim of clarify the entries and add any omitted items and amounts.

### **Analytical determinations**

Blood was collected for measurement of standard serum biochemistry and hemogram. Laboratory tests included serum creatinine, urea (U), glucose, calcium, phosphate, magnesium, albumin, lipids, ferritin, iron and C-reactive-protein (CRP).

The 24-hour urine samples were used for quantification of electrolytes, phosphate, albumin, protein, urea and creatinine. Creatinine, urea, sodium, phosphate, potassium, albumin, and protein were measured with an Architect c-16000 (Abbott®, Chicago, Illinois, USA). The eGFR was calculated by CKD-EPI formula (21). Hemogram was measured by Pentra 120 Retic® (ABX, France). Intact FGF23 levels were determined with a FGF23 ELISA kits (intact FGF23: kainos laboratories, Tokyo, Japan) and human c- terminal FGF23 was also measured in plasma by ELISA (Inmunotopics, San Clemente, CA, USA). Intact PTH level was quantified by ELISA (Inmunotopics, San Clemente, CA, USA).

The following measurements were performed in 24 h urine collection. Urine phosphate excretion (UPE) (mg/day); phosphate/urea ratio (P/U ratio) (mg/mg) that reflects P excreted relative to protein intake; phosphate/creatinine ratio (P/Cr ratio) (mg/mg); fractional excretion of phosphate (FeP) (%) calculated as  $FeP = [(Serum\ creatinine \times Urine\ phosphate) / (Urine\ creatinine \times Serum\ phosphate)] \times 100$ ; UPE/CKD-EPI that reflects the urine phosphate excretion with respect to renal function.

### Statistical Analysis

Continuous variables are shown as mean ( $\pm$  standard deviation, SD). Categorical variables are presented as percent (%). Simple correlation analysis (Spearman) was used to compare a relationship between phosphaturia variables and other variables. P/U ratio was divided into tertiles to compare phosphate intake, phosphaturia, FGF23 and PTH. ANOVA was used to compare the difference between means of more than two groups. A p-value  $<0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS statistical program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R (R Development Core Team, Vienna, Austria).

## RESULTS

There were 71 patients included in the study. Demographics and clinical characteristics of the studied patients are shown in Table 1. Mean age,  $61 \pm 9$  years, range 38 to 77, male 71.8% (n=51), with a mean eGFR of  $68 \pm 21$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Hypertension was present in 100% (n=71), insulin resistance in 49.3% (n=35) and dyslipidemia in 77.5% (n=55). The mean BMI was  $32 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup> and the mean body weight was  $90.6 \pm 13$  kg.

The average intake of phosphate was  $869 \pm 289$  mg/day ranging from 229 to 1675 mg. The source of phosphate was: animal protein ( $64 \pm 13\%$ ,  $542 \pm 172$  mg/day), vegetable protein ( $22 \pm 10\%$ ,  $189 \pm 104$  mg/day) and inorganic phosphate ( $14 \pm 13\%$ ,  $138 \pm 65$  mg/day). Serum and urine biochemistry are shown in Table 2 and 3.

Simple linear correlation analyses of total P intake versus urine P parameters are shown in Table 4. No significant correlation were observed between the total daily intake of P and 24 h UPE (Fig. 1a), P/Cr ratio, FeP and UPE/CKD-EPI (Table 4). However, as it is showed in Fig. 1b, there was a significant correlation between total phosphate intake and the urine P/U ratio (p=0.008). Also, it was found a positive significant correlation between the P/U ratio in urine and both the total intake and the percent of inorganic P in the diet (p=0.008 and p=0.01 respectively) (Table 4). The ratio of urine P/U was inversely correlated with the percent of dietary P from animal proteins which may expected since U is the denominator and is proportional to the protein intake. The intake of inorganic P plus animal P divided by animal P was highly correlated with P/U in urine (p=0.009 if expressed in percent and p=0.018 if expressed in mg).

Respect to the relationship between urine phosphate parameters (dependent variable) and phosphaturic hormones, FGF23 (both intact and c-terminal) and PTH simple linear correlation analysis are shown in Table 5. Neither 24 h UPE, P/Cr nor ratio P/U in urine show a significant correlation with i-FGF23, c-FGF23 or PTH. However, the FeP correlated with both PTH (p=0.001) and cFGF23 (p=0.002). There was also a significant correlation between the ratio 24h UPE/CKD-EPI and cFGF23 (p=0.005) probably because of the close relationship between cFGF23 with CKD-EPI. The



eGFR (CKD-EPI) correlated with cFGF23 ( $r^2 = -0.534$ ,  $p < 0.0001$ ) and PTH ( $r^2 = -0.265$ ,  $p = 0.026$ ) but was not correlated with iFGF23 ( $p = 0.153$ ).

The serum concentration of c-FGF23, but not i-FGF23, was inversely correlated with the proportion of dietary P from animal protein and it also positively correlated with the percent of dietary inorganic P (Table 6).

The serum concentration of calcium, phosphate, CRP, albumin and iron did not show significant correlation with i-FGF23, cFGF23 or PTH (data not shown).

As seen in Figure 2a and 2b patients in highest tertile of P intake do not appear to ingest an excessive amount of P from animal or vegetal proteins; they rather have a high intake of inorganic P (Fig 2c). By contrast patients ingesting a discrete amount of P (first tertile) ingest a relatively low amount of P from animal proteins. As can be seen in Table 7, patients with a higher P/U ratio ingest a higher proportion of inorganic phosphate (both in absolute value ( $p = 0.038$ ) and in percentage ( $p = 0.049$ )). There are no significant differences with respect to phosphaturic hormones, although they tend to increase as the P/U ratio increases; also presenting proportionally greater phosphaturia. However, this increase at a higher P/U ratio is only significant in 24 h UPE ( $p = 0.043$ ).

## DISCUSSION

The present study was performed to analyze the relationship between different sources of P ingested and the urinary excretion of P. The study was performed in a group of metabolic syndrome patients with moderate CKD, stages II-III and normal serum P concentration. An additional objective was to analyze whether of source of dietary P has an effect on FGF23 and PTH production. The results confirm previous findings by others (25), showing that phosphaturia measured in a 24-hour urine collection does not correlate with the amount of P ingested. However we observed significant correlation between both total and inorganic P intake and the ratio P/U in urine. Although cFGF23 did not correlate with total P intake, it did correlate with the proportion of inorganic P ingested.

The value of 24-hour urea excretion shows the protein intake in patients with CKD (26), so the P/U ratio in urine reflects the amount of P excreted relative to the protein intake; if the amount of inorganic phosphate ingested is high and the protein intake is maintained, the P/U ratio increases. It is likely that the amount of P ingested in form of salts additives (P salt easily absorbable) account for a large amount of the phosphate excreted in urine. The total phosphaturia did not correlate with PTH, c-FGF23 or iFGF23, however these phosphaturic hormones did correlate with the FeP suggesting that is the load of phosphate relative to the prevailing GFR what dictate the stimulation of PTH and FGF23. In our patients with moderate CKD stages II and III the FeP and eGFR correlated with cFGF23 but not with iFGF23.

Until recently, it has been assumed that urine phosphate excretion reflects phosphate intake however this was assumption that has not been totally proven. Twenty-four-hour urine phosphate was considered a parameter that reflects phosphate intake in a situation of phosphate balance assuming that net phosphate absorption correlates with absorption and is linearly related to intake over a wide range of intakes. This relationship has been assumed to apply to patients with CKD (27). Ix et al. showed that the circadian pattern of serum phosphate is modifiable by phosphate intake (25). And the same author showed that P intake did not correlate with phosphaturia (CJASN). Stremke ER et al. have recently published that 24-hour urine phosphate was highly variable and did not relate to dietary phosphate intake or absorption in eight patients with moderate CKD on a tightly controlled dietary intake (28).

In western diet, P is ingested primarily as protein. The recommended dietary allowance for P in our area is 900-1000 mg/day in healthy adults. The European Food Safety Authority in Europe reports that the P intake ranges should be

between 1000-1767 mg/day (29). Our patients have an average P intake of  $869 \pm 289$  mg/day, and only a 14% is inorganic P and much of this is contained in additives (7). P ingested as additives is easily absorbed and excreted in urine. The amount of P ingested as additive is low but contributes to a large extent to the phosphate in urine obscuring the relationship to the total P intake. Caravaca et al. show that the reduction in intestinal absorption of P by P binders is reflected by a decrease in urine P/BUN ratio (30). Despite their widespread use, P additives are typically unaccounted in the estimated P content of processed foods. P additives represent a major and “hidden” P load in modern diets (3, 31).

Studies in patients with CKD not on dialysis and without CKD suggest that higher serum P levels even within the normal laboratory range ( $<4.5$ mg/dl) are a risk factor for vascular calcification (14). Trautvetter et al. performed a double-blind, placebo-controlled parallel designed study (n=66), which shows that additional intake of 1000 mg/day of P did not influence fasting plasma P concentrations of healthy adults after eight weeks of intervention (32). These findings should not be extrapolated to patients with CKD with long-term exposure to P load. Dietary intake of P is derived largely from foods with high protein content or food additives and is an important determinant of P balance in patients with CKD (3). Analyzing the P/U ratio in 24-hour urine is an advisable method to know the source of P intake. Our results suggest that reducing the intake of inorganic P without restriction of protein intake may be an effective measure to control P load in patients with moderate CKD.

With respect to the secondary objective of our study, PTH and cFGF23 were only correlated with FeP and they did not correlate with total amount of P in urine. FGF23 and PTH are stimulated by higher P intake (10) but the degree of renal failure is determinant in the P excretion; thus the P load relative to actual glomerular filtration is the stimulus for PTH and FGF23 production, our result indicate that in CKD II-III, FGF23 and PTH are not correlated with total P intake or total P excretion. The fact that inorganic P intake was associated to elevated FGF23 points to the relevance of inorganic P on the P load in each patient. Due to association between high levels of FGF23 and mortality this observation supports the importance of dietary restriction of inorganic P. Therapeutic approaches to reduce the intestinal absorption of P, according to urinary P/U ratio that lead to lower serum P and FGF23 levels simultaneously, could target the amount of P additives in the diet and the proportions of animal versus plant sources of dietary protein (7, 33). Some authors have shown that short-term dietary P restriction tends to reduce FGF23 levels in patients with moderately decreased kidney function (34).

In conclusion our results suggest that the proportion between P and urea excreted in urine increases with the relative amount of inorganic P ingested. Thus, the P/U ratio in 24-hour urine is a marker of inorganic P intake which is easily absorbed. It remains to be proven if in daily clinical practice the use of P/U ratio urine is useful tool to guide the dietary advice of patients with CKD.

## REFERENCES

- (1) Isakova T, Wolf MS. FGF23 or PTH: which comes first in CKD?. *Kidney Int.* 2010; 78: 947-949.
- (2) Block GA, Wheeler DC, Persky MS, et al. Effects of P Binders in Moderate CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23 (8):1407-1415. doi:10.1681/ASN.2012030223.
- (3) Kalantar-Zadeh K et al. Understanding sources of dietary phosphorus in the treatment of patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 519-530.
- (4) Vervloet MG, Sezer S, Massy ZA, et al. The role of P in kidney disease. *Nature reviews.* 2017; 13: 27-38.
- (5) St-Jules DE, Goldfarb DS, Pompeii ML, Sevick MA. P additive avoidance in chronic kidney disease. *Diabetes Spectr* 2017; 30 (2): 101-106.
- (6) Vervloet MG, Van Ballegooijen AJ. Prevention and treatment of hyperPmia in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2018; 93: 1060-1072.

- (7) Moe SM, Zidehsarai MP, Chambers MA, et al. Vegetarian compared with meat dietary protein source and phosphorus homeostasis in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 257-264.
- (8) Karp H, Ekholm P, Kemi V, et al. Differences among total and in vitro digestible phosphorus content of plant foods and beverages. *J Ren Nutr* 2012; 22: 416-422.
- (9) Calvo MS, Uribarri J. Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *Am J Clin Nutr* 2013; 98: 6-15.
- (10) Chang AR, Anderson C. Dietary phosphorus intake and the kidney. *Annu Rev Nutr* 2017; 37: 321-346.
- (11) Lederer E. Regulation of serum P. *J Physiol.* 2014;592:3985–95.
- (12) Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, et al. Relation between serum P level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* 2005; 112: 2627-2633.
- (13) Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, et al. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 2007; 167: 879-885.
- (14) Kendrick J, Kestenbaum B, Chonchol M. P and cardiovascular disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011; 18 (2): 113-119.
- (15) Vart P, Nigatu YT, Jaglan A, van Zon SK, Shafique K. Joint effect of hypertension and elevated serum phosphorus on the risk of mortality in national health and nutrition examination survey-III. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4: e001706.
- (16) Santamaria R, Díaz-Tocados JM, Pendón-Ruiz de Mier MV, et al. Increased phosphaturia accelerates the decline in renal function: a search for mechanisms. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 13701-137015.
- (17) Ritz E, Hahn K, Ketteler M, Kuhlmann MK, Mann J. P additives in food—a health risk. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109:49–55.
- (18) Uribarri J, Calvo MS. Dietary phosphorus excess: a risk factor in chronic bone, kidney, and cardiovascular disease? *Adv Nutr.* 2013;4:542–4.
- (19) Qin Z, Liu X, Song M, et al. Fibroblast growth factor 23 as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in prospective studies. *Atherosclerosis* 2017; 261: 1-11.
- (20) Selamet U, Tighiouart H, Sarnak MJ, et al. Relationship of dietary phosphate intake with risk of end stage renal disease and mortality in chronic kidney disease stage 3-5: A modification of diet in renal disease study. *Kidney Int.* 2016; 89 (1): 176-184.
- (21) Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration): A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 604-612.
- (22) Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-1645.
- (23) José Mataix Verdú. Tabla de composición de alimentos. Universidad de Granada. 5ª Ed., 2009. ISBN 9788433849809.
- (24) General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan- European dietary survey. *EFSA Journal* 2009; 7(12):1435.
- (25) Ix JH, Anderson C, Smits G, Persky M, Block G. Effect of dietary phosphate intake on circadian rhythm of serum phosphate concentrations in chronic kidney disease: a crossover study. *Am J Clin Nutr* 2014; 100: 1392–7.
- (26) Coles GA, Meadows JH, Bright C, Tomlinson K. The estimation of dietary protein intake in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transp.* 1989; 4 (10): 877-882.
- (27) Palomino HL, Rifkin DE, Anderson C, Criqui MH, Whooley MA, Ix JH. 24-hour urine phosphorus excretion and mortality and cardiovascular events. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 1202-1210.
- (28) Stremke ER, McCabe LD, McCabe GP, et al. Twenty-four-hour urine phosphorus as a biomarker of dietary phosphorus intake and absorption in CKD. A secondary analysis from a controlled diet balance study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13 (7): 1002-1012.
- (29) EFSA NDA Panel. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for phosphorus. *EFSA J.* 2015;13:54.

- (30) Caravaca F, Caravaca-Fontán F, Azevedo L, Luna E. How to assess the efficacy of P binders. *Nefrología* 2017; 37 (3): 311-319.
- (31) Gutiérrez OM. Sodium and phosphorus-based food additives: persistent but surmountable hurdles in the management of nutrition in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013; 20 (2): 150-156.
- (32) Trautvetter U, Jahreis G, Kiehntopf M, Gleit M. Consequences of a high phosphorus intake on mineral metabolism and bone remodeling in dependence of calcium intake in healthy subjects – a randomized placebo-controlled human intervention study. *Nutrition Journal* 2016; 15: 7.
- (33) Scialla JJ, Wolf M. Roles of P and fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10: 268-278.
- (34) Tsai WC, Wu HY, Peng YS, et al. Effects of lower versus higher P diets on fibroblast growth factor-23 levels in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2018: 1-7.

## TABLES

**Table 1.** Demographics and clinical characteristics of the study patients (n=71). Quantitative and qualitative variables are summarized as mean ± standard deviation and number / percentage, respectively. ACE-i: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor; ARB: Angiotensin Receptor Blocker; CCB (D): Calcium Channels Blocker (Dihydropyridine); BB: Beta-blocker; CAB: Central Alfa-Blocker.

	mean±SD
Age (years)	61 ± 9
Gender (n male / % male)	51 / 71.8
Type 2 diabetes (n/%)	35 / 49.3
Dyslipidemia (n/%)	55 / 77.5
Hyperuricemia (n/%)	43 / 60.6
Smokers (n/%)	8 / 11.3
Ischemic cardiopathy (n/%)	8 / 11.3
Peripheral arteriopathy (n/%)	9 / 12.7
Cardiovascular events (n/%)	12 / 16.9
Hypertension (n/%)	71 / 100
ACE-i (n/%)	7 / 9.9
ARB (n/%)	61 / 85.9
Diuretics (n/%)	41 / 57.7
CCB (D) (n/%)	45 / 63.4
BB (n/%)	28 / 39.4
CAB (n/%)	31 / 43.7
Other antihypertensive drugs (n/%)	4 / 5.6
Body weight (kg)	90.6 ± 13
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	32 ± 4
Abdominal perimeter (cm) in men	110 ± 10
Abdominal perimeter (cm) in women	108 ± 10
Systolic blood pressure (mmHg)	136 ± 25
Diastolic blood pressure (mmHg)	84 ± 16
Mean blood pressure (mmHg)	108 ± 19
Heart rate (bpm)	64 ± 13

**Table 2.** Biochemical parameters for serum and 24-hour urine summarized as mean ± standard deviation. HDL: High density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; CRP: C-reactive-protein; PTH: Parathyroid hormone; iFGF23: intact Fibroblast growth factor-23; cFGF23: c-terminal Fibroblast growth factor-23.

SERUM	mean±SD
Creatinine (mg/dl)	1.19 ± 0.41
Urea (mg/dl)	47.8 ± 16
Glucose (mg/dl)	128.6 ± 48.8
Sodium (mEq/L)	139.4 ± 2.4
Potassium (mEq/L)	4.4 ± 0.5

Chloride (mEq/L)	106.1 ± 3.3
Calcium (mg/dl)	9.5 ± 0.3
Phosphate (mg/dl)	3.09 ± 0.5
Magnesium (mg/dl)	1.89 ± 0.29
Triglycerides (mg/dl)	150 ± 65
Cholesterol (mg/dl)	178 ± 37
HDL- Cholesterol (mg/dl)	39 ± 9
LDL- Cholesterol (mg/dl)	108 ± 32
Albumin (g/dl)	4.3 ± 0.2
CRP (mg/L)	8.01 ± 17.3
Iron (µg/dl)	83 ± 33
Ferritin (ng/ml)	105 ± 112
PTH (pg/ml)	63 ± 38
iFGF23 (pg/ml)	124 ± 74
cFGF23 (RU/ml)	96 ± 73
<b>URINE (24 hour collection)</b>	<b>mean±SD</b>
Creatinine (mg/day)	1402 ± 618
Urea (mg/day)	26257 ± 9721
Sodium (mEq/day)	1833 ± 764
Potassium (mEq/day)	670 ± 280
Calcium (mg/day)	106 ± 79
Albumin (mg/day)	483 ± 715

**Table 3.** Parameters in urine (24-hour urine collection). mean ± standard deviation.

<b>PHOSPHATURIA (24-hour urine collection)</b>	<b>mean±SD</b>
Urine phosphate excretion (UPE) (mg/day)	797 ± 324
Phosphate/urea ratio (P/U ratio)	0.0311 ± 0.008
Phosphate/creatinine ratio (P/Cr ratio)	0.60 ± 0.17
Fractional excretion of phosphate (FeP) (%)	23.3 ± 10
UPE/CKD-EPI	13.1 ± 7.1

**Table 4.** Simple linear correlation analysis. Total P intake (mg/day) (Dependent variable) vs Independent variables: Urine phosphate excretion (UPE) 24-hour (mg/day), Phosphate/creatinine ratio (P/Cr ratio) 24-hour (mg/mg), Phosphate/urea ratio (P/U ratio) 24-hour (mg/mg), Fractional excretion of P (FeP) 24-hour (%), UPE/CKD-EPI. P/urea ratio (P/U ratio) 24-hour (mg/mg) (Dependent variable) vs Independent variables: animal source (%) (mg), vegetable source (%) (mg), inorganic P (%) (mg) and ratio ((P inorganic + P Animal)/P Animal). P: phosphate.

		<b>Spearman coefficient</b>	<b>p</b>		<b>Spearman coefficient</b>	<b>p</b>
<b>A) Total P intake (mg/day)</b>						
UPE (mg/day)		0.189	0.128			
P/Cr ratio (mg/mg)		0.110	0.373			
P/U ratio (mg/mg)		0.323	0.008			
FeP 24-hour (%)		-0.088	0.484			
UPE/CKD-EPI		-0.032	0.797			
<b>B) P/U ratio 24-hour (mg/mg):</b>						
Animal P	%	-0.255	0.038	mg	0.189	0.126
Vegetable P	%	0.031	0.801	mg	0.232	0.059
Inorganic P	%	0.313	0.01	mg	0.362	0.003
Ratio ((Pinorganic + PAnimal)/P Animal)	%	0.316	0.009	mg	0.289	0.018

**Table 5.** Simple linear correlation analysis. Dependent variables: Urine phosphate excretion (UPE) 24-hour (mg/day), Phosphate/creatinine ratio (P/Cr ratio) 24-hour (mg/mg), Phosphate/urea ratio (P/U ratio) 24-hour (mg/mg), Fractional excretion of P (FeP) 24-hour (%), UPE/CKD-EPI and CKD-EPI (ml/min). Independent variables: intact FGF23 (iFGF23) (pg/ml), c-terminal FGF23 (cFGF23) (RU/ml) and parathyroid hormone (PTH) (pg/ml).

	Spearman coefficient	Significance (p)
<b>UPE (mg/day):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	-0.173	0.164
cFGF23 (RU/ml)	-0.029	0.813
PTH (pg/ml)	-0.184	0.134
<b>P/Cr ratio (mg/mg):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	0.094	0.451
cFGF23 (RU/ml)	0.196	0.109
PTH (pg/ml)	0.188	0.123
<b>P/U ratio (mg/mg):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	-0.095	0.445
cFGF23 (RU/ml)	-0.022	0.859
PTH (pg/ml)	0.147	0.228
<b>FeP (%):</b>		
iFGF23 (pg/ml)	0.05	0.689
cFGF23 (RU/ml)	0.367	0.002
PTH (pg/ml)	0.395	0.001
<b>UPE/CKD-EPI:</b>		
iFGF23 (pg/ml)	0.033	0.794
cFGF23 (RU/ml)	0.342	0.005
PTH (pg/ml)	0.089	0.469
<b>CKD-EPI</b>		
iFGF23 (pg/ml)	-0.175	0.153
cFGF23 (RU/ml)	-0.534	0.0001
PTH (pg/ml)	-0.265	0.026

**Table 6.** Simple linear correlation analysis. Dependent variables: intact FGF23 (iFGF23) (pg/ml), c-terminal FGF23 (cFGF23) (RU/ml) and parathyroid hormone (PTH) (pg/ml). Independent variables: Total intake of P (mg/day), Animal source intake (%) (mg), Vegetable source intake (%) (mg), Inorganic P intake (%) (mg). P: phosphate.

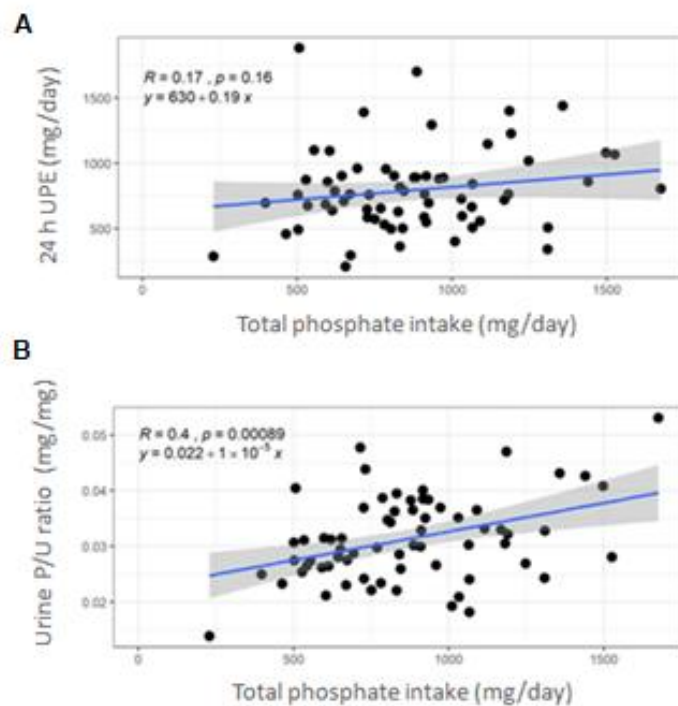
		Spearman coefficient	Significance (p)		Spearman coefficient	Significance (p)
<b>iFGF23 (pg/ml):</b>						
Total intake of P (mg/day)		-0.099	0.431			
Animal source intake	%	-0.03	0.813	mg	-0.096	0.444
Vegetal source intake	%	-0.071	0.574	mg	-0.087	0.487
Inorganic P intake	%	0.115	0.359	mg	0.075	0.551
<b>cFGF23 (RU/ml):</b>						
Total intake of P (mg/day)		-0.149	0.225			
Animal source intake	%	-0.278	0.022	mg	-0.293	0.015
Vegetal source intake	%	0.015	0.904	mg	-0.04	0.747
Inorganic P intake	%	0.283	0.019	mg	0.206	0.092
<b>PTH (pg/ml):</b>						
Total intake of P (mg/day)		-0.1	0.415			
Animal source intake	%	-0.209	0.084	mg	-0.26	0.031
Vegetal source intake	%	0.063	0.605	mg	0.07	0.568
Inorganic P intake	%	0.211	0.082	mg	0.178	0.144

**Table 7.** Comparison of phosphate (P) intake, glomerular filtration (CKD-EPI), phosphaturic hormones and phosphaturia variables based on the tertiles of phosphate/urea ratio (P/U ratio). Intact FGF23 (iFGF23), c-terminal FGF23 (cFGF23), parathyroid hormone (PTH), Fractional excretion of P (FeP) 24-hour (%), Phosphate/creatinine ratio (P/Cr ratio) 24-hour, Urine phosphate excretion (UPE) 24-hour.

P/U	T1 (<0.027) n=23	T2 (0.027-0.033) n=22	T3 (>0.033) n=24	p
Age (years)	65	62.50	60.50	0.871
Total intake of P (mg/day)	775	836	982	0.047
Animal source intake (md/day)	498	539	581	0.283
Vegetal source intake (md/day)	135	210	196	0.160
Inorganic P intake (md/day)	71	72.5	141	0.038
Animal source intake (%)	65	66	61	0.426
Vegetal source intake (%)	21	24	21	0.540
Inorganic P intake (%)	14	10	18	0.049
CKD-EPI (ml/min)	62	66	81	0.265
iFGF23 (pg/ml)	107	100	104	0.654
cFGF23 (RU/ml)	76	77	82	0.906
PTH (pg/ml)	49	57	64	0.542
FeP (%)	19.56	20.41	20.75	0.653
P/Cr (mg/mg)	0.54	0.61	0.64	0.123
P/CKDEPI	11.14	11.53	12.79	0.662
UPE (mg/day)	663	739	890	0.043

## FIGURES

**Figure 1. a)** Relationship between total phosphate intake and urine phosphate excretion (UPE) 24-hour, **b)** Relationship between total phosphate intake and urine phosphate/urea ratio (P/U ratio) 24-hour.



**Figure 2. a)** Relationship between total phosphate intake and animal source intake, **b)** Relationship between total phosphate intake and vegetal source intake, **c)** Relationship between total phosphate intake and inorganic phosphate intake. Glomerular filtration rate (CKD-EPI) is expressed in function of circle size; so that, the largest circle reflects greater CKD-EPI. The 24h urine phosphate/creatinine ratio (P/Cr ratio) is expressed in color scale; so that warmer colors indicate lower P/Cr ratio and colder colors show higher P/Cr ratio.



