



## **TESIS DOCTORAL**

Programa de Doctorado en Biomedicina

# **Efectos de elevados niveles de FGF23 sobre la pared vascular y el fenotipo de las células de músculo liso vascular. Estudios básicos y clínicos**

**Effects of elevated levels of FGF23 on vascular wall and vascular smooth muscle cell phenotype. Basic and clinical studies**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina por

**Noemí Vergara Segura**

**Director**

Juan Rafael Muñoz Castañeda

**Co-Directora y tutora**

María Sagrario Soriano Cabrera

**Mayo 2021**

**Córdoba**

TITULO: *EFFECTOS DE ELEVADOS NIVELES DE FGF23 SOBRE LA PARED VASCULAR Y EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR. ESTUDIOS BÁSICOS Y CLÍNICOS*

AUTOR: *Noemí Vergara Segura*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

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

---



**TÍTULO DE LA TESIS:** Efectos de elevados niveles de FGF23 sobre la pared vascular y el fenotipo de las células de músculo liso vascular. Estudios básicos y clínicos

**DOCTORANDO/A:** Noemí Vergara Segura

**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 Noemi Vergara Segura, se incorporó al grupo de investigación de Nefrología en 2014 (Metabolismo del Calcio y Calcificación Vascular en IMIBIC) cuando inició sus estudios de doctorado. Desde su incorporación ha participado activamente en todas las actividades del grupo mostrando gran resolución en las tareas en las que ha participado. Fruto de su vinculación al grupo y de su trabajo ha publicado 9 artículos científicos en revistas internacionales de prestigio. Hay que resaltar que estos trabajos son de contrastada calidad científica al estar publicados en revistas de primer decil y primer cuartil.

Derivados exclusivamente de su tesis y con posición de liderazgo se ha publicado ya un artículo en una revista de primer cuartil (Nutrients, Q1, IF: 4, 546) y hay otro ya sometido y en proceso de revisión en una revista de primer decil (HYPERTENSSION, D1, IF: 7,713).

Del mismo modo, derivado de su labor investigadora es miembro de la Sociedad Española de Nefrología y de la Sociedad Española de Investigación Ósea y de Metabolismo Mineral participando activamente en los congresos nacionales e internacionales derivados de ambas especialidades.

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

Córdoba, 23 de Junio de 2021

Firma de los director/es

MUÑOZ  
CASTAÑEDA  
JUAN RAFAEL -  
30821424K

Firmado digitalmente por  
MUÑOZ CASTAÑEDA  
JUAN RAFAEL -  
30821424K  
Fecha: 2021.06.24  
10:09:27 +02'00'

Fdo.: Juan R. Muñoz Castañeda  
Director

SORIANO CABRERA  
MARIA SAGRARIO -  
30522922J

Firmado digitalmente por SORIANO  
CABRERA MARIA SAGRARIO -  
30522922J  
Fecha: 2021.06.24 16:00:38 +02'00'

Fdo.: Sagrario Soriano Cabrera  
Co-directora





**TÍTULO DE LA TESIS:** Efectos de elevados niveles de FGF23 sobre la pared vascular y el fenotipo de las células de músculo liso vascular. Estudios básicos y clínicos

**DOCTORANDO/A:** Noemí Vergara Segura

### **INFORME RAZONADO DEL TUTOR**

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

La Dra. Sagrario Soriano Cabrera, profesora asociada de la Universidad de Córdoba, es co-directora y tutora de esta tesis.

A través de este documento, ratifica de forma favorable el informe realizado por el Dr. Juan Rafael Muñoz Castañeda, director de la tesis.

La doctorando Noemi Vergara Segura ha realizado un excelente trabajo de investigación que le ha permitido formarse tanto en aspectos básicos de bioquímica y biología molecular como en aquellos clínicos derivados del estudio de los cambios en los niveles de FGF23 en pacientes con enfermedad renal crónica. Su formación ha sido alcanzada de forma muy satisfactoria y todos los objetivos han sido completados cumpliendo con los indicios de calidad requeridos por la Universidad.

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

Córdoba, 23 de Junio de 2021

MARTIN MALO  
ALEJANDRO -  
13695596Q

Firmado digitalmente por MARTIN  
MALO ALEJANDRO - 13695596Q  
Fecha: 2021.06.24 22:56:28 +02'00'

SORIANO  
CABRERA MARIA  
SAGRARIO -  
30522922J

Firmado digitalmente por  
SORIANO CABRERA MARIA  
SAGRARIO - 30522922J  
Fecha: 2021.06.24 16:01:40  
+02'00'

Firma del responsable de línea de investigación  
Fdo.: Alejandro Martín Malo

Firma de la tutora  
Fdo.: Sagrario Soriano Cabrera



***El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría***

Isaac Asimov



# Agradecimientos



Y después de tanto tiempo... hoy me toca escribir estas líneas de agradecimiento de mi tesis doctoral. Una etapa de mi vida que parecía no terminar nunca y que ya está llegando a su fin.

Me acuerdo cuando el primer día, con los bolsillos llenos de nervios a la vez que de ilusión, me incorporé al grupo donde tuve la gran oportunidad de empezar un nuevo camino en el mundo de la investigación y no en un sitio cualquiera, sino en el GC13 del IMIBIC. Gracias por hacerme partícipe en vuestros proyectos.

No ha sido un camino fácil ni tampoco un camino lleno de felicidad pero me siento afortunada de haber tenido la suerte de coincidir y poder conocer a personas que hacen que las adversidades de esta trayectoria no se noten tanto.

Carmen Herencia, prácticamente, todo el “sota, caballo y rey” como tú lo llamas... me lo has enseñado tú. Gracias por dejarme ser tu sombra y confiar en mí desde el minuto 1. Ofreciéndome, además, seguridad y muy buenos momentos en mis primeros pasitos del camino.

Julio, gracias por ser como eres. Por haber estado cuando lo he necesitado y por buscar siempre una excusa para reír.

Erena, gracias por la gran compañía que me has brindado en todo este tiempo. Ha sido un placer trabajar contigo hasta el último día. Sin tu presencia todo hubiese sido mucho más difícil.

Rafa Suanes, gracias por hacer tu trabajo fin de máster con nosotros y por compartir así la parte final de mi camino. Ha sido una muy buena experiencia poder transmitirme todo lo que yo había aprendido. Además, has sido una gran ayuda para mí.

Gracias también al resto de mis compañeros por haber formado parte del camino y contribuir para que se haga realidad, entre ellos Marien, Yoli y Rodri y en especial a Victoria.

Gracias a Juan y Sagrario, mis directores de tesis, porque sin ellos todo esto no hubiese tenido lugar. Mencionar también a Mariano por su participación como si de un director se tratara.

Belén y Sonia, gracias por permitir que nos conociéramos a través de los pasillos. Ha sido una suerte coincidir y gracias a ello hemos podido disfrutar de muchos momentos fuera del IMIBIC.

Susana, gracias por haber sido mi día a día durante todo este camino y brindarme siempre la confianza como si fuera parte de tu familia. Sin ti todo esto hubiese sido completamente diferente.

Cardeosilla, que decir de ti... la que nunca falla desde hace ya más de una década que nos conocemos, la que sabe que para ser hay que estar y tú siempre estás ahí al pie del cañón a pesar de la distancia.

Mario, gracias a ti empecé este camino. Gracias por no dejarme caer y por proporcionarme la fuerza suficiente para llegar hasta la meta y poder escribir a día de hoy estas palabras.

Por último, y no por eso menos importante, gracias a mi familia. A mis padres, mi hermano y mi cuñada, gracias a vosotros me he sentido respaldada en las grandes adversidades del camino. Gracias por todo vuestro apoyo.



# Abreviaturas



**ACTA2:**  $\alpha$  actina 2 (del inglés, alpha-actina-2)

**Arg:** Arginina

**AGO1:** Argonauta 1

**AGO2:** Argonauta 2

**BSA:** Albúmina sérica bovina (del inglés, bovine serum albumin)

**Ca:** Calcio

**cDNA:** ADN copia (del inglés, complementary DNA)

**CMLV:** Células de músculo liso vascular

**CTR:** Calcitriol

**CV:** Calcificaciones vasculares

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

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

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (del inglés, deoxyribonucleic acid)

**ELISA:** Enzyme linked immunosorbent assay

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**FBS:** Suero bovino fetal (del inglés, fetal bovine serum)

**FeP:** fracción de excreción de fósforo

**FG:** Filtrado glomerular

**FGF:** Facto de crecimiento fibroblástico (del inglés, fibroblast growth factor)

**FGF23:** Factor de crecimiento fibroblástico 23 (del inglés, fibroblast growth factor 23)

**FGFR:** Receptor de factor de crecimiento fibroblástico (del inglés, fibroblast growth factor receptor)

**FRS2** (del inglés, fibroblast growth factor receptor substrate 2)

**GALNT3:** UDP-N-acetil- $\alpha$ -galactosamina-transferasa 3

**Grb2** (del inglés, growth factor receptor-bound protein 2)

**HD:** Hemodiálisis

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad (del inglés, high density lipoprotein)

**hEGF:** factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (del inglés, human epidermal growth factor recombinant)

**hFGF-b:** factor de crecimiento fibroblástico b humano (del inglés, human fibroblast growth factor b)

**HSPG:** Heparina o proteoglicano heparán-sulfato

**K/DOQI:** Kidney/Disease Outcomes Quality Initiative

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

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad

**microRNA:** micro ARN (del inglés, micro ribonucleic acid)

**mRNA:** mARN (del inglés, messenger ribonucleic acid)

**NA:** Noradrenalina

**NO:** Óxido nítrico

**P:** Fósforo

**PACT:** (del inglés, protein kinase RNA activator)

**PAD:** Presión arterial diastólica

**PAM:** Presión arterial media

**PAS:** Presión arterial sistólica

**PBS:** Solución salina tamponada de fosfato (del inglés, phosphate buffered saline)

**pri-microRNA:** pri-micro ARN (Del inglés, primary-microRNA)

**PCR:** Proteína C reactiva

**PTH:** Hormona paratiroidea

**RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por ARN (del inglés, RNA-induced silencing complex)

**RNA:** Ácido ribonucleico (del inglés, ribonucleic acid)

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**RT-PCR:** Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, reverse transcription-polymerase chain reaction)

**Ser:** Serina

**SmBm:** Medio SmBm (del inglés, Smooth Muscle Basal Medium)

**SM-MHC:** Cadena pesada de miosina de músculo liso (del inglés, smooth muscle-myosin heavy chain)

**SOS:** Factor de intercambio de nucleótidos de guanina

**SPC:** Enzimas tipo convertasas (del inglés, subtilisin-like proprotein convertases)

**TAE:** Tris-base, ácido acético y EDTA

**TFG:** Tasa de filtración glomerular

**TIM:** Triosa fosfato isomerasa (del inglés, triosephosphate isomerase)

**TRBP:** (del inglés, transactivation responsive element RNA-binding)

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

**UUN:** Nitrógeno en la urea urinaria (del inglés, urinary urea nitrogen)

**VDR:** Receptor de vitamina D (del inglés, vitamin D receptor)

**XLH:** Hipofosfatemia ligada al cromosoma X (del inglés, X-linked hypophosphatemia)

**$\alpha$ -SM22:**  $\alpha$ -músculo liso 22 (del inglés,  $\alpha$ -smooth muscle 22)



## Tabla de contenido

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	13
<b>1. Enfermedad Renal Crónica</b> .....	15
1.1 Alteraciones del metabolismo mineral en la enfermedad renal crónica .....	17
1.2 Homeostasis del fósforo en la enfermedad renal crónica .....	19
1.3 Ingesta de fósforo en la enfermedad renal crónica .....	22
<b>2. Factor de crecimiento fibroblástico 23</b> .....	26
2.1 Origen de FGF23 .....	26
2.2 Familia FGF .....	27
2.3 Estructura de FGF23 .....	29
2.4 Efectos de FGF23 .....	31
2.4.1 Klotho como cofactor de FGF23 .....	32
2.4.2 Receptores de factores de crecimiento fibroblástico .....	35
2.4.3 Complejo proteico heterotrímico klotho/FGFR/FGF23 .....	38
2.5 Acciones fisiológicas .....	40
2.5.1 Acciones fisiológicas de FGF23 en Riñón.....	40
2.5.2 Acciones de FGF23 sobre la glándula paratiroidea .....	41
2.6 Patologías asociadas a alteraciones de FGF23 .....	42
2.6.1 Patologías óseas relacionadas con FGF23 .....	43
2.7 FGF23 y enfermedad renal crónica .....	44
<b>3. Disfunción Vascular durante la ERC</b> .....	47
3.1 Mortalidad cardiovascular.....	47

3.1.1 FGF23 y mortalidad cardiovascular .....	47
3.2 Endotelio.....	48
3.2.1 FGF23 y endotelio.....	49
3.3 Rigidez arterial .....	49
3.3.1 FGF23 y rigidez arterial.....	51
3.4 Calcificación vascular .....	51
3.4.1 FGF23 y calcificación vascular .....	52
<b>4. Células de músculo liso vascular .....</b>	<b>55</b>
4.1 Localización de las CMLV .....	55
4.2 Fenotipo de las células de músculo liso vascular .....	56
4.2.1 Fenotipos contráctil y sintético .....	56
4.2.2 Fenotipo osteogénico de CMLV.....	59
4.3. Alteraciones de CMLV en el proceso aterosclerótico .....	60
<b>5. Papel de los microRNA sobre el fenotipo de las CMLV .....</b>	<b>61</b>
5.1 Biogénesis de los microRNA .....	61
5.2 Clasificación de los microRNA según su nomenclatura.....	63
5.3 Papel de los microRNA en la ERC.....	64
<b>Hipótesis .....</b>	<b>69</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>74</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>79</b>
<b>Bloque 1: Estudio <i>in vitro</i> del efecto de FGF23 recombinante sobre el fenotipo de CMLV .....</b>	<b>81</b>
<b>1. Cultivo de CMLV .....</b>	<b>81</b>
1.1 Subcultivo celular .....	81

1.2 Recuento y determinación de la viabilidad celular .....	82
<b>2. Diseño de experimentos y tratamientos .....</b>	<b>84</b>
2.1 Determinación de los efectos de FGF23 intacto sobre la proliferación de CMLV.....	84
2.1.1 Ensayo colorimétrico de proliferación celular .....	85
2.1.2 Western blot de proteínas relativas a proliferación celular ...	86
2.1.2.1 Extracción de Proteína citoplasmática y nuclear .....	87
2.1.2.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford .....	88
2.1.2.3 Técnica de western Blot .....	89
2.1.2.3.1 Preparación de muestras .....	90
2.1.2.3.2 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE .....	90
2.1.2.3.3 Transferencia semiseca de proteínas a una membrana de nitrocelulosa .....	90
2.1.2.3.4 Bloqueo de la membrana .....	91
2.1.2.3.5 Inmunodetección con anticuerpo primario y secundario.	91
2.1.2.3.6 Revelado .....	93
2.2 Estudio del papel de FGF23 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV de contráctil a sintético .....	94
2.2.1 Microscopía de fluorescencia.....	94
2.2.2 RT-PCR .....	97
.....	97
2.2.2.1 Recogida de muestras de cultivo de CMLV .....	97
2.2.2.2 Extracción de RNA .....	98
2.2.2.3 Cuantificación de RNA .....	99
2.2.2.4 Tratamiento con DNAsa .....	99
2.2.2.5 Técnica RT-PCR a tiempo real.....	99
2.2.3 Western blot.....	103

2.3 Estudio del papel de FGF23 sobre cambios en el perfil de microRNA relacionados con patologías vasculares .....	105
2.3.1 Evaluación de cambios en el perfil de microRNA.....	106
2.3.1.2 Ensayo Array de microRNA.....	107
2.3.2 Expresión de genes relacionados con la biogénesis de microRNA .....	109
2.3.3 Validación del ensayo Array de microRNA .....	110
2.4 Determinación de la señalización inducida por FGF23 en CMLV.	112
2.4.1 Western blot en experimentos con inhibidores.....	112
.....	113
2.4.1.1 Extracción de proteína total .....	113
2.4.2 RT-PCR en experimentos con inhibidores .....	115
2.5 Papel de la modulación de los microRNA 221 y microRNA 222 sobre el fenotipo de las CMLV tratadas con FGF23 .....	116
2.5.1 Transfección de mimics microRNA 221 y 222 .....	116
2.5.2 Evaluación de la efectividad de la transfección de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 por RT-PCR.....	118
2.5.3 Efecto de FGF23 sobre la expresión de MAP3K2: Papel de los microRNA 221 y 222 .....	119
2.5.3.1 RT-PCR para evaluar la expresión génica de MAP3K2 en presencia de los microRNA 221 y microRNA 222.....	119
2.5.3.2 Western Blot para evaluar la expresión proteica de MAP3K2 en presencia de microRNA 221 y microRNA 222 .....	121
2.5.4 Efecto de la transfección de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 sobre la fosforilación de ERK 1/2. ....	122
2.6 Estudio comparativo del efecto de la molécula intacta de FGF23 y del fragmento C-terminal de FGF23 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV.....	123

2.6.1 Análisis comparativo de los efectos de FGF23 intacto y c-terminal sobre la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil.....	124
2.6.2 Cambios sobre la señalización celular .....	125
2.7 Comparación del efecto de FGF23 intacto con el de FGF2 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV.....	126
2.7.1 Cambios en la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil inducidos por FGF2.....	126
2.7.2 Cambios en la señalización inducida por FGF2 .....	127
<b>3. Análisis estadístico del Bloque de células.....</b>	<b>128</b>
<b>Bloque 2: Estudio <i>in vivo</i> de los cambios vasculares promovidos por altos niveles de FGF23 .....</b>	<b>129</b>
<b>4. Modelo experimental en ratas.....</b>	<b>129</b>
<b>5. Diseño experimental.....</b>	<b>130</b>
5.1 Recogida de muestras sanguíneas y de orina .....	131
5.1.1 Cuantificación de FGF23 intacto.....	132
5.1.2 Medición de fósforo .....	132
5.1.3 Medición de creatinina.....	133
5.1.4 Cuantificación de PTH.....	133
5.1.5 Cuantificación de calcitriol .....	134
5.2 Análisis de genes contráctiles por RT-PCR a partir de RNA de aorta torácica .....	135
5.2.1 Recogida del tejido: aorta torácica.....	136
5.2.2 Extracción de RNA a partir de aorta abdominal.....	136
5.3 Medición de microRNA 221 y microRNA 222 a partir de aorta torácica de rata.....	137

5.4 Medición de microRNA 221 y microRNA 222 en plasma de rata.	138
5.5 Estudio histológico.....	140
5.5.1 Tinción Hematoxilina y eosina.....	141
5.6 Medición de la contractilidad en anillos arteriales .....	142
<b>6. Análisis estadístico en los experimentos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>143</b>
<b>Bloque 3: Estudio de la relación entre FGF23 y daño vascular en pacientes con estadios tempranos (2-3) de ERC.....</b>	<b>144</b>
<b>7. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio..</b>	<b>144</b>
<b>8. Recogida de muestras de sangre y orina .....</b>	<b>146</b>
<b>9. Medición de fósforo en plasma.....</b>	<b>147</b>
<b>10. Medición de creatinina plasmática .....</b>	<b>147</b>
<b>11. Medición de PTH en plasma .....</b>	<b>148</b>
<b>12. Cuantificación de FGF23 C-terminal.....</b>	<b>148</b>
<b>13. Medición de microRNA 221 y microRNA 222 en RNA total a partir de plasma .....</b>	<b>149</b>
<b>14. Otros parámetros evaluados en consulta.....</b>	<b>149</b>
14.1 Medición de la velocidad de onda de pulso y parámetros hemodinámicos centrales .....	149
<b>15. Análisis estadístico en los experimentos en pacientes .....</b>	<b>150</b>
<b>Bloque 4: Estudio clínico en pacientes con enfermedad renal crónica 2-3 y síndrome metabólico para estudiar la relación entre FGF23 y la ingesta de P .....</b>	<b>152</b>
<b>16. Valoración de la ingesta de P ingerido.....</b>	<b>152</b>

<b>17. Recogida de muestras de sangre y orina .....</b>	<b>154</b>
<b>18. Medición de fósforo, creatinina y PTH en plasma .....</b>	<b>154</b>
<b>19. Cuantificación de FGF23 C-terminal .....</b>	<b>154</b>
<b>20. Análisis estadístico en los experimentos en pacientes .....</b>	<b>154</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>157</b>
<b>Bloque 1: Estudios <i>in vitro</i> acerca del efecto de altos niveles de FGF23 sobre el fenotipo de CMLV .....</b>	<b>159</b>
<b>1. Efecto de altos niveles de FGF23 sobre la proliferación de CMLV. ....</b>	<b>159</b>
1.1 Ensayo colorimétrico de proliferación celular.....	159
1.2 Expresión proteica de marcadores de proliferación celular .....	160
<b>2. Estudio del cambio de fenotipo en CMLV inducido por altos niveles de FGF23.....</b>	<b>161</b>
2.1. Efecto de FGF23 sobre el cambio en la morfología de las CMLV	161
2.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil de CMLV.....	164
2.3 Efecto de FGF23 sobre la expresión proteica de algunos marcadores de fenotipo contráctil .....	165
<b>3. Evaluación de FGF23 sobre un perfil de microRNA relacionado con patologías vasculares.....</b>	<b>167</b>
3.1 Evaluación de cambios en el perfil de microRNA.....	167
3.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión de genes relacionados con la biogénesis de microRNA.....	168

3.3. Validación de la expresión de microRNA en CMLV en presencia de FGF23 .....	170
<b>4. Efecto de altos niveles de FGF23 intacto sobre la señalización intracelular en CMLV .....</b>	<b>171</b>
<b>5. Papel de la modulación de los microRNA 221 y microRNA 222 sobre el fenotipo de las CMLV tratadas con FGF23 .....</b>	<b>177</b>
5.1 Transfección y evaluación de la efectividad de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 .....	177
5.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión de MAP3K2 en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 .....	178
5.2.1 Efecto de FGF23 sobre la expresión génica de MAP3K2 en CMLV transfectadas .....	178
5.2.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión proteica de MAP3K2 en CMLV transfectadas.....	180
5.3 Efecto de FGF23 sobre la expresión de ERK 1/2 en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 .....	181
5.4 Análisis de los marcadores de fenotipo contráctil en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 .....	182
<b>6. Estudio comparativo de los efectos de la molécula de FGF23 intacta vs su fragmento C-terminal sobre el cambio de fenotipo de las CMLV .....</b>	<b>183</b>
6.1 Cambios sobre la expresión génica de genes contráctiles de CMLV .....	184
6.2 Estudio comparativo de la señalización promovida por FGF23 intacto y FGF23 C-terminal en CMLV .....	184

<b>7. Efecto de FGF2 recombinante sobre el cambio de fenotipo de las CMLV .....</b>	<b>185</b>
7.1 Cambios sobre la expresión génica de genes contráctiles de CMLV .....	186
7.2 Efecto de FGF2 recombinante sobre activación de FGFR1 y ERK 1/2 .....	187
<b>Bloque 2: Efecto de altos niveles de FGF23 sobre el cambio de fenotipo de CMLV en aortas de rata .....</b>	<b>188</b>
<b>8. Efecto de altos niveles de FGF23 sobre la expresión de marcadores de fenotipo contráctil en aorta torácica de rata .....</b>	<b>189</b>
<b>9. Análisis de los niveles de expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en aorta torácica y en plasma en el modelo experimental de alto FGF23 en ratas.....</b>	<b>190</b>
<b>10. Cambios histológicos inducidos por el exceso de FGF23 sobre la aorta torácica .....</b>	<b>192</b>
<b>11. Cambios sobre la rigidez arterial inducida por altos niveles de FGF23.....</b>	<b>194</b>
<b>Bloque 3: Estudio clínico en pacientes con enfermedad renal crónica 2-3 y síndrome metabólico para estudiar la relación entre altos niveles de FGF23 y rigidez arterial. ....</b>	<b>198</b>
<b>12. Efecto de FGF23 sobre los parámetros bioquímicos más relevantes de la ERC.....</b>	<b>203</b>
<b>13. Efecto de FGF23 sobre los parámetros clínicos relativos a rigidez arterial.....</b>	<b>204</b>

<b>14. Efecto de FGF23 sobre la expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en plasma .....</b>	<b>208</b>
<b>Bloque 4: Estudio clínico en pacientes con enfermedad renal crónica 2-3 y síndrome metabólico para estudiar la relación entre FGF23 y la ingesta de P .....</b>	<b>210</b>
<b>15. Efecto de la ingesta de P sobre los parámetros clínicos de P en orina .....</b>	<b>210</b>
<b>16. Consumo de distintas fuentes de P y valores de FGF23 .....</b>	<b>211</b>
<b>17. Efecto de los parámetros clínicos de P en orina con FGF23 y PTH .....</b>	<b>212</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>215</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>239</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>244</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>292</b>
<b>Anexo 1. Assessment of Inorganic Phosphate Intake by the Measurement of the Phosphate/Urea Nitrogen Ratio in Urine (Artículo publicado en la revista Nutrients) .....</b>	<b>294</b>
<b>Anexo 2. Fibroblast growth factor 23 increases arterial stiffness through changes in vascular smooth muscle cell phenotype (Artículo sometido en la revista Hypertension) .....</b>	<b>294</b>



# Resumen



En los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), los niveles elevados del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) se asocian con la enfermedad cardiovascular y la mortalidad.

Las células de músculo liso vascular (CMLV) presentan dos fenotipos funcionales diferenciados, contráctil y sintético. La abundancia del fenotipo sintético se asocia con la disfunción vascular, y se desconoce si el FGF23 puede promover el cambio fenotípico ocasionando complicaciones fisiopatológicas vasculares, como por ejemplo la rigidez vascular.

El presente estudio evaluó si el FGF23 afecta al fenotipo de las CMLV y en consecuencia a la rigidez arterial. Además, en este se exploró un posible biomarcador clínico relacionado con la ingesta de P y su excreción. Dicho marcador permite predecir la existencia de altos niveles de FGF23 a nivel clínico y por tanto identificar qué pacientes tienen mayor riesgo de disfunción vascular.

Nuestros resultados indicaron que altos niveles de FGF23 promovieron la transición de las CMLV de un fenotipo contráctil hacia un fenotipo sintético, así como una down-regulación de los genes responsables de la biogénesis de microRNAs que conducen a un descenso de la expresión de microRNAs relacionados con rigidez arterial, como microRNA 221 y microRNA222. Los efectos de FGF23 fueron mediados a través de FGFR1 y la posterior activación de la señalización Ras-MAPK-Erk1/2. La inhibición de ambas vías promovió el fenotipo contráctil de las CMLV. La inhibición de FGFR1 aumentó la expresión de microRNA 221 mientras que la inhibición de ERK 1/2 no modificó la expresión de microRNA. La proteína MAP3K2 es un gen diana de los microRNA 221 y microRNA 222 y su expresión resultó estar

incrementada con el tratamiento de FGF23. Por este motivo, la sobreexpresión de microRNA 221 y microRNA 222 igualmente disminuyó MAP3K2 y ERK 1/2 al mismo tiempo que recuperó el fenotipo contráctil de CMLV disminuido por FGF23.

En ratas Wistar, la infusión exógena de FGF23 recombinante produjo un aumento del grosor de la pared vascular en CMLV que presentaron fenotipo sintético y una reducción de los niveles de microRNA 221 en plasma y aorta. Los estudios funcionales realizados en anillos arteriales aórticos revelaron que las fuerzas pasivas y activas estaban alteradas en las ratas tratadas con FGF23 mostrando una mayor rigidez arterial y un incremento en el grosor de la túnica media del vaso.

Finalmente, en un grupo de pacientes en estadio 2-3 de ERC con niveles elevados de FGF23, se observó un aumento de la presión del pulso y de la velocidad de onda de pulso que reflejaba la rigidez vascular, junto con niveles plasmáticos bajos de microRNA 221 y microRNA 222. En estos mismos pacientes se observó que altos niveles de FGF23 correlacionaron no con el fósforo en orina ni el ratio de fósforo/creatinina sino con la tasa de filtración glomerular y la fracción de excreción de fósforo. En este estudio descubrimos que el ratio fósforo/urea en orina es indicador de la absorción de fósforo. El mayor consumo de fósforo en la dieta, especialmente fósforo inorgánico procedente de alimentos procesados, promueve el daño renal e incrementa la carga de fósforo y la necesidad de elevar los niveles de FGF23. Estos parámetros podrían ser utilizados en la práctica clínica de la consulta de nefrología para conocer qué pacientes son esperados a tener mayores niveles de FGF23 y por tanto un mayor daño vascular. La

intervención dietética reduciendo la ingesta de fósforo inorgánico sobre todo podría ser una alternativa para disminuir los niveles de FGF23 durante los estadios tempranos de la ERC.

En conclusión, el FGF23 promueve el cambio de fenotipo de las CMLV de contráctiles hacia sintéticas aumentando la rigidez arterial; este puede ser un mecanismo por el cual el FGF23 contribuye directamente al desarrollo de la enfermedad vascular en pacientes con ERC. Por lo que es muy interesante controlar los niveles de FGF23 en aquellos pacientes con una alta ingesta de P mediante el control riguroso de la ingesta de fósforo, la tasa de filtración glomerular y la fracción de excreción de fósforo.



# Abstract



In patients with chronic kidney disease (CKD), high levels of fibroblast growth factor 23 (FGF23) are associated with cardiovascular disease and mortality.

Vascular smooth muscle cells (VSMC) exhibit two differentiated functional phenotypes, contractile and synthetic. The abundance of the synthetic phenotype is associated with vascular dysfunction, and it is unknown whether FGF23 may promote phenotypic switching leading to vascular pathophysiological complications, such as vascular stiffness.

The present study was conducted to evaluate whether FGF23 affects VSMC phenotype and arterial stiffness consequently. In addition, this study evaluated a potential clinical biomarker related to P intake and excretion. Such a marker allows us to predict the existence of high levels of FGF23 at the clinical level and thus identify which patients are at increased risk of vascular dysfunction.

Our results indicated that high levels of FGF23 promoted VSMC transition from a contractile phenotype to a synthetic phenotype as well as down-regulation of genes involved in the microRNAs biogenesis and microRNAs related to arterial stiffness, such as microRNA 221 and microRNA222. The effects of FGF23 were mediated through FGFR1 and the subsequent activation of Ras-MAPK-ERK 1/2 signalling. Inhibition of both pathways enhanced the contractile phenotype of VSMCs. Inhibition of FGFR1 increased microRNA 221 expression while inhibition of ERK 1/2 did not modify microRNA expression. MAP3K2 protein is a target gene of microRNA 221 and microRNA 222 and resulted be up-regulated after FGF23 treatment. For this reason, overexpression of microRNA 221 and microRNA 222 decreased MAP3K2 and ERK 1/2 while

at the same time that recovered the contractile phenotype of VSMC decreased by FGF23.

In Wistar rats, the recombinant FGF23 exogenous infusion produced an increase in vascular wall thickness in VSMC with a synthetic phenotype and a reduction of microRNA 221 in plasma and aortic levels. Functional studies performed on aortic arterial rings revealed that both passive and active forces were altered in FGF23-treated rats showing increased arterial stiffness and increased vessel tunica media thickness.

Finally, in a group of stage 2-3 CKD patients with high FGF23 levels, we observed an increase in pulse pressure and pulse wave velocity reflecting vascular stiffness together with both microRNA 221 and microRNA 222 low plasma level. In these same patients, high levels of FGF23 correlated not with urine phosphorus and phosphorus/creatinine ratio but with glomerular filtration rate and phosphorus excretion fraction. In this study we found that the urine phosphorus/urea ratio is an indicator of phosphorus absorption. Increased dietary phosphorus intake, especially inorganic phosphorus from processed foods, promotes renal damage and increases phosphorus load and the need for elevated FGF23 levels. These parameters could be used in clinical practice in the nephrology clinic to determine which patients are expected to have higher levels of FGF23 and thus greater vascular damage. Dietary intervention by reducing inorganic phosphorus intake above all could be an alternative to reduce FGF23 levels during the early stages of CKD.

In conclusion, FGF23 promotes the VSMC phenotype switching from contractile to synthetic increasing arterial stiffness; this may could

be one mechanism by which FGF23 directly contributes to the development of vascular disease in CKD patients. It is therefore very interest to monitor FGF23 levels in patients with high P intake by closely monitoring phosphorus intake, glomerular filtration rate and fractional phosphorus excretion.



# Introducción



## 1. Enfermedad Renal Crónica

Enfermedad Renal Crónica (ERC) es un término general para definir un conjunto de enfermedades que presentan anomalías en la estructura o funciones de los riñones con implicaciones en la salud.

En el año 2002, se fundó la organización KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes). Se trata de una organización independiente dirigida por un consejo internacional de expertos en nefrología. Su misión es aunar criterios para mejorar la atención y la evolución de los pacientes con nefropatías en todo el mundo promoviendo la coordinación, colaboración e integración de iniciativas para desarrollar e implementar directrices a través de la elaboración de las guías de práctica clínica K/DOQI (Kidney/Disease Outcomes Quality Initiative). Según estas guías <sup>1</sup>, se define a la ERC como:

-Daño renal durante al menos tres meses, definido como alteraciones renales funcionales o estructurales, con o sin descenso del filtrado glomerular (FG), manifestado por: la presencia de marcadores de daño renal, que incluyen alteraciones en la composición de la sangre o la orina y/o alteraciones detectadas por estudios de imagen.

-Disminución de la función renal, expresada mediante el descenso del FG o por un aclaramiento de creatinina inferior a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> durante al menos tres meses, con o sin daño renal aparente.

De acuerdo a las guías K/DOQI, la ERC se puede clasificar en 5 estadios diferentes atendiendo principalmente a la tasa de FG:

- Estadio 1 (FG  $\geq$  90 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>): Microalbuminuria, daño renal con FG normal o elevado.

- Estadío 2 (FG entre 60 y 89 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>): Microalbuminuria, daño renal con FG ligeramente disminuido.
- Estadío 3 (FG entre 30 y 59 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>): Albuminuria con FG moderadamente disminuido.
- Estadío 4 (FG entre 15 y 29 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>): Albuminuria con FG gravemente disminuido.
- Estadío 5 (FG<15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>): Fallo renal. Diálisis.

Categorías de Filtrado glomerular (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Categorías de Albuminuria (mg/g <sup>a</sup> )		
	A1 Normal a ligeramente elevada (< 30)	A2 Moderadamente elevada (30-300)	A3 Gravemente elevada (> 300)
<b>G1 Normal o elevado</b> ( ≥ 90)			
<b>G2 Ligeramente disminuido</b> (60-89)			
<b>G3a Ligera a moderadamente disminuido</b> (45-59)			
<b>G3b Moderada a gravemente disminuido</b> (30-44)			
<b>G4 Gravemente disminuido</b> (15-29)			
<b>G5 Fallo renal</b> (<15)			

Tabla 1. Pronóstico de la ERC según las categorías de filtrado glomerular y de albuminuria. Verde, riesgo de referencia, no hay enfermedad renal si no existen otros

marcadores definitorios; amarillo, riesgo moderado; naranja, riesgo alto y rojo, riesgo muy alto. La albuminuria se expresa como cociente albúmina/creatinina. (Tabla modificada de KDIGO 2012 <sup>2</sup>).

La ERC implica una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales. Como consecuencia, los riñones pierden su capacidad para eliminar desechos, concentrar la orina y conservar los electrolitos de la sangre. Las causas más comunes de la ERC son la nefropatía diabética, la hipertensión arterial y la glomerulonefritis <sup>3</sup>. Juntas, constituyen el 75% de las causas de ERC en adultos.

Es por otro lado, de sobra conocido que las alteraciones del metabolismo mineral asociadas a la ERC promueven la aparición de complicaciones que incrementan la morbimortalidad por causas cardiovasculares. Por ello, el enfoque actual del enfermo urémico debe abordarse en conjunto, teniendo en cuenta y ponderando, tanto las alteraciones del metabolismo mineral como las del hueso así como la enfermedad cardiovascular asociada.

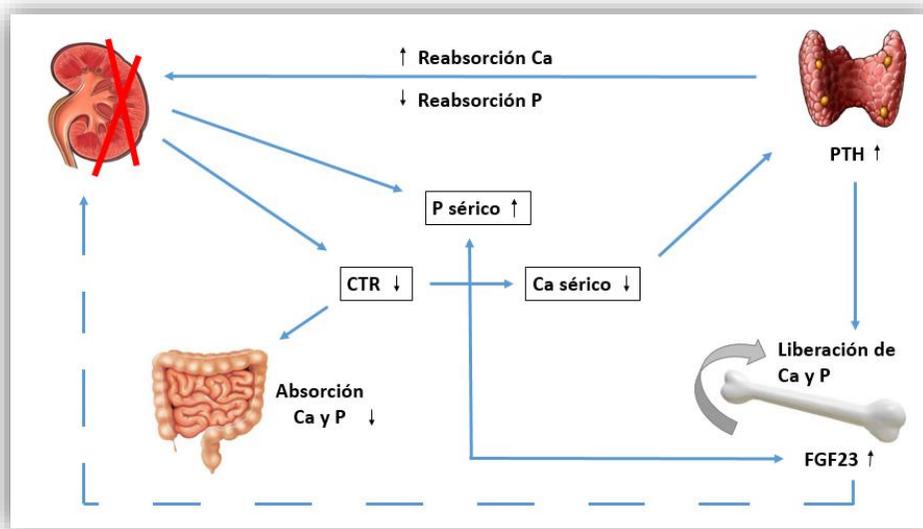
### **1.1 Alteraciones del metabolismo mineral en la enfermedad renal crónica**

Los riñones, junto con otros órganos como la glándula paratiroides, el intestino y el hueso, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo mineral, especialmente del calcio (Ca) y el fósforo (P). La progresión de la ERC y las alteraciones del metabolismo mineral promueven la aparición de calcificaciones extraesqueléticas, dando como resultado complicaciones cardiovasculares y un aumento de la mortalidad cardiovascular <sup>4, 5</sup>.

En la génesis de las alteraciones del metabolismo mineral se detecta una pérdida o reducción de masa renal que conduce a una menor producción de calcitriol (CTR). El déficit de CTR provoca, a su vez, un descenso de Ca sérico lo cual lleva aparejado a un aumento en la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) <sup>6</sup>. La PTH es una hormona que tiene como objetivo, entre otros, regular los niveles de Ca en sangre. Para ello, la PTH estimula la liberación de Ca y P procedente de la matriz ósea, la reabsorción de Ca por el riñón y la producción renal de CTR, el cual aumenta la absorción de Ca y P a través del intestino. La PTH también tiene un efecto fosfatúrico inhibiendo la reabsorción de P y evitando con ello la hiperfosfatemia. A menudo, por tanto, la ERC lleva asociada la generación de un hiperparatiroidismo secundario responsable del desbalance mineral y de las alteraciones sobre el hueso <sup>7</sup>.

El factor de crecimiento fibroblástico (FGF23, del inglés Fibroblast Growth Factor) objeto de estudio en esta tesis doctoral y que se describirá con más detalle posteriormente es un elemento que juega un papel importante en esta homeostasis mineral. Se trata de una hormona fosfatúrica sintetizada por los osteoblastos maduros y los osteocitos <sup>8, 9</sup>. Para ejercer su acción fosfatúrica en el riñón requiere de la proteína klotho como co-receptor. Además actúa sobre el riñón como órgano diana inhibiendo la actividad 1- $\alpha$ -hidroxilasa en el túbulo proximal, reduciendo los niveles de CTR y con ello indirectamente la absorción intestinal de P y Ca. La producción ósea de FGF23 se ve estimulada por CTR <sup>10</sup> y sobre todo por el contenido de P en la dieta <sup>11, 12</sup>. No sabemos que tipo de fósforo es responsable en mayor o menor medida de la estimulación de FGF23. Este aspecto pretende ser

estudiado en esta tesis doctoral. El incremento de FGF23 tiene como principal fin promover la fosfaturia y mantener los niveles séricos de P dentro de la normalidad. Estos cambios del metabolismo mineral durante la ERC se pueden ver resumidos a continuación en la Figura 1.



**Figura 1. Alteraciones del metabolismo mineral en la ERC.** La pérdida de masa renal está asociada con un aumento del P sérico y un descenso del CTR, el cual disminuye por un lado la absorción intestinal de Ca y P y por otro lado disminuye el Ca sérico provocando un incremento de la PTH, denominado hiperparatiroidismo secundario. El aumento de PTH promueve la liberación ósea de Ca y P y la secreción de FGF23. A su vez, el FGF23 actúa sobre el riñón inhibiendo la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa, provocando así, aún más, la bajada del CTR y la subida de la PTH. Además, un incremento de FGF23 promueve un incremento de P sérico. Finalmente, para contrarrestar este desajuste la PTH aumenta la reabsorción de Ca y disminuye la de P.

## 1.2 Homeostasis del fósforo en la enfermedad renal crónica

El P, tanto en forma de fosfato inorgánico (Pi) como orgánico, es un elemento clave para la homeostasis celular y sistémica participando de forma decisiva en procesos vitales como la respiración celular, la obtención de energía en forma de ATP, la señalización intracelular o el

mantenimiento del pH. Asimismo, es uno de los principales componentes de macromoléculas como fosfolípidos o ácidos nucleicos. Cuando los niveles séricos de fosfato exceden valores de 2,5-4,5 mg/dl se produce lo que se denomina hiperfosfatemia. Esta hiperfosfatemia suele estar unida a un incremento del producto calcio x fósforo (Ca x P).

En pacientes con insuficiencia renal, tanto la hiperfosfatemia como el aumento del producto Ca x P están directamente relacionados con la calcificación de arterias coronarias, arterias periféricas y válvulas cardíacas<sup>13,14</sup>. Todas estas complicaciones están también significativamente asociadas a una elevada mortalidad en pacientes en hemodiálisis <sup>15</sup>. Además, se ha identificado a la hiperfosfatemia como el principal factor de riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes con ERC <sup>16, 17</sup> e incluso en población general <sup>18</sup>.

En humanos, la mayoría del P (85%) se encuentra en el hueso en forma de matriz mineralizada. También hay un 14% distribuido de manera intracelular mientras que el 1% restante permanece en el fluido extracelular. Durante periodos de baja disponibilidad de P ingerido, la mayoría de este es absorbido por el tracto gastrointestinal, por transporte pasivo a través de los enterocitos o mediante un cotransportador de P dependiente de sodio denominado NaPi-2b <sup>19</sup>. En condiciones normales, el 80-90% del P filtrado es reabsorbido en el túbulo proximal renal, principalmente a través de NaPi-2a <sup>20</sup> y NaPi-2c <sup>21</sup>. Aunque el riñón es el principal regulador de la homeostasis del P, se sabe que el hueso contribuye también decisivamente al control del P, dado que participa tanto como un importante reservorio de P, a través de los procesos de formación ósea, como fuente del mismo, derivado de los procesos de resorción ósea <sup>22</sup>.

Algunos de los elementos conocidos más importantes en la regulación del P son la PTH, el FGF23 y el CTR <sup>23</sup>. La disminución de los niveles de Klotho que se observa en la insuficiencia renal también influye sobre los niveles de P sérico <sup>24</sup>.

Al inicio de la ERC los niveles de P sérico se mantienen en el rango normal gracias a una regulación al alza de FGF23 y PTH <sup>25</sup>. Desafortunadamente, este mecanismo compensador se ve desbordado a medida que la función renal va declinando. Así, a medida que avanza la ERC, el filtrado glomerular disminuye y el FGF23 incrementa de forma exponencial encontrando concentraciones hasta 50 ó 100 veces más altas de lo normal. Además de la reducida excreción de P, el hiperparatiroidismo secundario aumenta la PTH, la cual aumenta el remodelado óseo. Este hecho junto con la dieta acaba provocando una marcada hiperfosfatemia que promueve en gran medida la aparición de calcificaciones vasculares <sup>26</sup>.

En los enfermos renales, la hiperfosfatemia inhibe la actividad de la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa en el riñón, disminuyendo la producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (CTR) a partir de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (calcidiol) <sup>27</sup>. Por otra parte, el aumento de P plasmático determina un incremento de los niveles de FGF23, que inhibe la actividad  $1\alpha$ -hidroxilasa, contribuyendo al déficit de CTR. Los bajos niveles de CTR conducen a una situación de hipocalcemia (en seres humanos nivel sérico de Ca total menor de 8,5 mg/dL). La hipocalcemia junto con la hiperfosfatemia estimula la secreción de PTH contribuyendo a la progresión del hiperparatiroidismo secundario frecuentemente asociado a la ERC.

### 1.3 Ingesta de fósforo en la enfermedad renal crónica

La hiperfosfatemia generada en los pacientes con ERC debe corregirse debido a la asociación que existe entre el P sérico y el aumento de la mortalidad tanto en pacientes con ERC como en la población general <sup>28, 29, 30</sup>.

En previos estudios, nuestro grupo de investigación ha sugerido que en las primeras fases de la ERC la ingesta elevada de P, reflejada en una sobrecarga de P y por tanto en una elevada excreción de P en la orina, induce una lesión renal y acelera la progresión de la enfermedad renal, desencadenándose aún más, la alteración del metabolismo mineral que conlleva esta enfermedad <sup>31</sup>.

Además, otros autores sugieren que la ingesta de fósforo está asociada con morbilidad y mortalidad cardiovascular, incluso cuando el nivel de P sérico está dentro de la normalidad <sup>32, 33</sup>. Por lo tanto, incluso con un P sérico normal, podría ser esencial reducir la carga renal de P durante la ERC ya que disminuiría la demanda de las hormonas fosfatúricas PTH y FGF23. Además, cada vez hay más evidencias que demuestran como la elevación de FGF23, necesario para mantener el P sérico, se asocia con un resultado cardiovascular negativo <sup>34</sup>.

Una posible solución para intentar evitar los altos niveles séricos de P en los pacientes con ERC sería reducir la reabsorción intestinal de P. Para ello, sería conveniente reducir la ingesta de P, ya que éste se encuentra principalmente en la dieta. Debido a que *in vivo* el P orgánico se une en gran medida a las proteínas y a otras moléculas intracelulares que contienen carbono, el P se encuentra de forma natural en los

alimentos ricos en proteínas <sup>35</sup>, tanto de origen animal como vegetal. El P orgánico procedente de las proteínas de origen animal se hidroliza en el tracto intestinal y luego se absorbe en la circulación como P inorgánico <sup>36</sup>. La digestibilidad del P de los alimentos de origen animal es mayor que el de las proteínas vegetales. Además, los productos cárnicos suelen estar procesados mediante la adición de aditivos de P, lo que puede aumentar notablemente el contenido total de P <sup>37</sup>.

Existe una estrecha correlación positiva entre la ingesta de proteínas de la dieta y la ingesta de P y en consecuencia con el incremento de los niveles de P en plasma sobre todo en pacientes con ERC <sup>35</sup>. Por lo tanto, una mayor ingesta de proteínas en la dieta en los pacientes con ERC no sólo predispone a una mayor ingesta de P sino que también puede conducir a promover hiperfosfatemia <sup>37</sup>.

Alimentos como frutas y verduras contienen solo pequeñas cantidades de P. Hay que señalar que de forma natural hay un aporte abundante de P en algunas semillas vegetales, frutos secos y legumbres. A diferencia del P de la carne, que está presente como P orgánico en los compartimentos intracelulares y que es fácilmente hidrolizado y absorbido, el P en las plantas, especialmente en las judías, los guisantes, los cereales y los frutos secos, se encuentra principalmente en forma de ácido fítico o fitato <sup>38, 39</sup>. Dado que los seres humanos no expresan la enzima fitasa que lo degrada, la biodisponibilidad del P de los alimentos de origen vegetal es relativamente baja <sup>40</sup>.

Por lo tanto, a pesar del aparente mayor contenido de P de algunas plantas, el resultado real puede ser una menor tasa de

absorción intestinal de P por gramo de proteína vegetal que de proteína de origen animal <sup>41</sup>. Por esta razón, una ingesta similar en cuanto a la cantidad de P pero con distinta procedencia en cuanto a la fuente de P (alimentos animales vs vegetales) se traduce en una diferente absorción de P, lo cual se refleja en la excreción urinaria de P que será mayor en individuos con mayor consumo de alimentos de origen animal ya que los alimentos vegetales son algo menos probable que aumenten la carga de P.

Sin embargo hay que señalar que la ingesta de fósforo que más afecta a los pacientes con ERC es el P inorgánico ya que éste se absorbe con mayor facilidad que el fósforo unido a proteínas. La absorción intestinal de P procedente de proteínas de origen animal es del 50-70%, la de origen vegetal del 30-50% mientras que la absorción del P inorgánico es de aproximadamente 100% <sup>42 43</sup>. Por lo tanto, lo ideal para evitar la hiperfosfatemia sería, por un lado preservar y mantener la ingesta de proteínas, las cuales son necesarias para tener una buena nutrición y prevenir el desgaste muscular, y por otro lado, restringir el consumo de P inorgánico fácilmente absorbible.

Absorción intestinal de P		
P Orgánico		P Inorgánico
De origen animal	De origen vegetal	
50-70%	30-50%	100%

**Tabla 2. Absorción intestinal de P en función de su procedencia.** P orgánico (de origen animal o de origen vegetal) y P inorgánico.

El P inorgánico, el cual no está unido a las proteínas y es altamente absorbible, se encuentra fundamentalmente en bebidas carbonatadas (refrescos, sodas) y en los aditivos alimenticios sobre todo presentes en alimentos procesados <sup>37, 44, 45</sup>. En relación a este P inorgánico, algunos autores han demostrado que la restricción de aditivos que contienen P contribuye en gran medida al control del P sérico <sup>45, 41</sup>.

Por lo tanto, se puede suponer que la absorción neta de P <sup>46</sup> está influenciada por varios factores, como la ingesta total de P, la fuente de alimentación y los efectos de hormonas como por ejemplo el CTR que aumenta la absorción intestinal del P <sup>47, 48, 49</sup>. Teniendo en cuenta todos estos factores que afectan a la absorción de P, no es sorprendente encontrar informes que muestran que la excreción urinaria de P no se correlaciona con la ingesta total de P <sup>50</sup>. Por lo que se crea la necesidad de encontrar un marcador que permita evaluar la cantidad y el tipo de P ingerido que estime el riesgo de contener elevados niveles de FGF23.

La excreción urinaria de P debe reflejar la absorción intestinal de P, que incluye tanto el P inorgánico como el orgánico (procedente de las proteínas). Está bien establecido que el contenido de nitrógeno en la urea urinaria (UUN, del inglés urinary urea nitrogen) es una medida de la cantidad de proteína que ha sido absorbida y metabolizada <sup>51</sup>. De tal manera que una ingesta excesiva de P inorgánico en relación con la ingesta de P orgánico debería reflejarse en un aumento de la relación P/UUN en la orina. Debido a que el P se puede encontrar tanto en su forma orgánica como inorgánica, y en consecuencia ser más o menos absorbido por el intestino, se crea la necesidad de estudiar un marcador

que permita evaluar qué cantidad aproximada de P están ingiriendo los pacientes con ERC, ya que esta ingesta podría estar ligada a un incremento de los niveles de FGF23 y por lo tanto de un potencial desarrollo de disfunción cardiovascular.

## **2. Factor de crecimiento fibroblástico 23**

Como se ha comentado anteriormente el FGF23 resulta particularmente relevante en esta tesis. A las acciones fosfatúricas y fisiológicas mencionadas anteriormente se han unido una serie de efectos fisiopatológicos que lo sitúan como una citoquina de especial interés para su estudio en el contexto de la nefrología y de las complicaciones cardiovasculares asociadas a ella. De hecho, hoy día disponemos de numerosos estudios que muestran la asociación entre FGF23 y mortalidad cardiovascular, tanto en población con ERC<sup>52</sup> como en población general<sup>53</sup>.

A continuación se detallan las principales características de la proteína de FGF23.

### **2.1 Origen de FGF23**

En el año 1994, se identificó una proteína de bajo peso molecular, liberada por un hemangioma esclerosante que inducía osteomalacia. Esta proteína causaba una disminución de los niveles séricos de fósforo y vitamina D y un aumento de la fosfaturia<sup>54</sup>. Aunque no se propuso al FGF23 como responsable, se comenzó a tener la idea de la existencia de fosfatoninas.

En el año 2000 se identificó a FGF23 como un gen de la familia de factores de crecimiento fibroblásticos identificando su producción inicialmente en el núcleo ventrolateral del tálamo del cerebro <sup>55</sup>.

Poco más tarde, el grupo de investigación de Kenneth E. White estableció por primera vez una asociación entre la presencia de varias mutaciones sin sentido en este gen de FGF23 y la causa del raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante. En este trabajo ya se especula con la existencia de un factor fosfatúrico de naturaleza ósea <sup>56</sup>.

FGF23 se produce principalmente en el hueso, concretamente en osteoblastos maduros y osteocitos <sup>57</sup>. Los osteocitos son las células más abundantes del esqueleto adulto, comprenden más del 90-95% de todas las células óseas en comparación con los osteoblastos (<5%) y osteoclastos (<1%) <sup>57</sup>. También, se documentó una producción residual en otros tipos celulares como glándulas salivales, estómago, hígado y corazón <sup>58</sup>.

## 2.2 Familia FGF

El FGF23 pertenece a la familia génica de factores de crecimiento fibroblástico (FGF, del inglés Fibroblast Growth Factor Receptor) la cual está formada por 22 miembros desde Fgf1 hasta el Fgf23 (Fgf15 no existe en humanos) <sup>59</sup>.

La familia FGF está dividida en siete subfamilias filogenéticas, las cuales están clasificadas en tres grupos distintos en función de su mecanismo de acción <sup>60</sup>:

Intracelular: Subfamilia Fgf 11/12/13/14: Estos factores de crecimiento actúan como moléculas de señalización intracelular de una manera

independiente a los receptores de factor de crecimiento fibroblástico (FGFR, del inglés Fibroblast Growth Factor Receptor).

Canónica: Subfamilias Fgf1/2/5, Fgf3/4/6, Fgf7/10/22, Fgf8/17/18 y Fgf9/16/20. Estos factores de crecimiento tienen una función paracrina mediante la unión y activación de receptores de superficie celular tirosina quinasa que usan moléculas de heparán sulfato como cofactor.

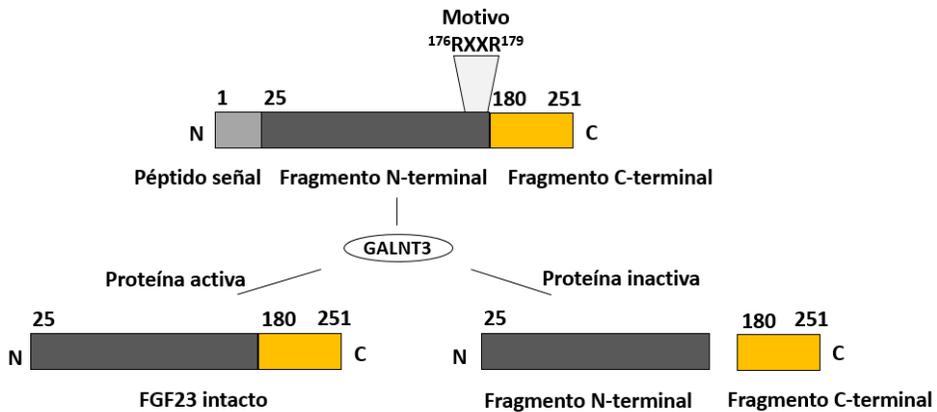
FGF endocrino o similar a hormonas: Subfamilia 19/21/23. Este tipo de factores de crecimiento actúan de forma extracelular y endocrina. Median sus respuestas a través de mecanismos dependientes de receptores FGFR. FGF15, el cual no existe en la especie humana y sí en ratones requiere de  $\beta$ -klotho, al igual que el FGF19 existente en humanos y no en ratones. FGF21 también requiere de  $\beta$ -klotho para su actividad metabólica. Mientras que FGF23 requiere de  $\alpha$ -Klotho como cofactor para el desarrollo óptimo de su señalización <sup>61</sup>.

Grupo	Subfamilia	Miembro
Intracelular	Fgf 11/12/13/14	FGF23 11, FGF12, FGF13, FGF14
Canónica	Fgf1/2/5	FGF1, FGF2, FGF5
	Fgf3/4/6	FGF3, FGF4, FGF6
	Fgf7/10/22	FGF7, FGF10, FGF22
	Fgf8/17/18	FGF8, FGF17, FGF18
	Fgf9/16/20	FGF9, FGF16, FGF20
Endocrina	Fgf19/21/23	FGF19, FGF21, <b>FGF23</b>

**Tabla 3.** Subfamilias de la familia de factores de crecimiento fibroblástico

## 2.3 Estructura de FGF23

En humanos, el gen *Fgf23*, NM\_020638.2, está localizado en el brazo pequeño del cromosoma 12 (12p13). Está formado por tres exones intercalados con dos intrones. Codifica una glicoproteína de 32 KDa, la cual contiene un total de 251 residuos de aminoácidos.



**Figura 2. Regulación de la secreción de FGF23.** FGF23 se produce como un péptido de 251 aminoácidos. Hay un péptido señal con 24 aminoácidos y la proteína secretada de FGF23 consta de 227 aminoácidos. Una parte de la proteína de FGF23 es proteolíticamente dividida entre <sup>179</sup>Arg y <sup>180</sup>Ser en fragmentos inactivos por enzimas que reconocen el motivo 176RXXR179 justo antes del sitio del procesamiento.

Como puede observarse en la Figura 2, la proteína comprende una secuencia señal hidrofóbica de 24 aminoácidos, un extremo amino-terminal de 154 aminoácidos que contiene la región de homología central con el resto de FGFs y un dominio carboxi-terminal de 73 aminoácidos. Después de la escisión de la secuencia señal de 24 aminoácidos y una O-glicosilación por la enzima UDP-N-acetil- $\alpha$ -galactosamina-transferasa 3 (GALNT3), la proteína madura correspondiente al fragmento <sup>25</sup>FGF23-<sup>251</sup> es secretada a la circulación.

Por tanto, en el torrente sanguíneo, FGF23 puede circular de dos formas distintas: como molécula madura intacta (<sup>25</sup>-FGF23-<sup>251</sup>) o como molécula fragmentada y por tanto más corta (<sup>25</sup>-FGF23-<sup>179</sup>) <sup>62, 63</sup>. La forma más corta surge de una escisión proteolítica entre Arg<sup>179</sup> y Ser<sup>180</sup> por enzimas tipo convertasas (SPC, del inglés Subtilisin-like proprotein convertases) <sup>64</sup> que reconocen el motivo <sup>176</sup>RXXR<sup>179</sup>. Se trata de dos aminoácidos localizados en el residuo 176 y 179, respectivamente, los cuales forman un sitio consenso para la escisión proteolítica, la cual inactiva y degrada la proteína FGF23 activa <sup>65, 66</sup>. Hasta el momento conocemos que sólo la forma madura y completa de FGF23 es activa y tiene actividad fosfatúrica. Se conoce que el dominio COOH-terminal es esencial para la interacción con el cofactor  $\alpha$ -Klotho y la activación de la señalización de FGFR <sup>67</sup>.

La O-glicosilación de FGF23 se produce precisamente en la región 162-228 <sup>68</sup> solapándose con el sitio de escisión <sup>176</sup>RXXR<sup>179</sup>. Esta modificación postraducciona protege a FGF23 de la escisión causada por proteínas SPC <sup>64</sup>. GALNT3 codifica una enzima que es responsable de la glicosilación de FGF23. Mutaciones inactivantes de la proteína GALNT3 previenen la O-glicosilación de FGF23, resultando en una degradación rápida de la proteína y por tanto una reducida fosfatúria <sup>69</sup>. Pacientes con la mutación en GALNT3, presentan bajos niveles de FGF23 intacto mientras que el fragmento C-terminal de FGF23 es elevado <sup>70</sup>. También, mutaciones inactivantes en la propia molécula de FGF23 como por ejemplo una mutación en regiones muy conservadas de la proteína como la serina (Ser) situada en la posición 71, se han relacionado con calcinosis tumoral <sup>62</sup>. Esta mutación provoca altas

concentraciones de P y Ca que inducen calcificaciones de tejidos blandos <sup>71, 72</sup>.

Además de las enzimas comentadas en este apartado, también es importante resaltar la importancia de otras que tienen acción similar sobre FGF23, como la enzima FAM20C. FAM20C regula la fosforilación de la Ser<sup>180</sup> de FGF23, un residuo que está junto al motivo <sup>176</sup>RXXR<sup>179</sup>. Esta fosforilación podría inhibir la O-glicosilación de GALNT3 en <sup>176</sup>RXXR<sup>179</sup>, la cual permite la posterior proteólisis de FGF23 mediante las enzimas SPC. Se ha comprobado que ratones knockout para la enzima FAM20C presentan altos niveles de FGF23 biológicamente activo e intacto, excesiva fosfaturia y raquitismo hipofosfatémico <sup>73</sup>.

Por otra parte, la hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH, del inglés X-linked hypophosphatemia) tiene el origen de la alteración en una mutación en el gen PHEX. Este gen, el cual se expresa principalmente en hueso, codifica para la convertasa que regula FGF23. En pacientes con XLH, PHEX está mutado y no puede degradar FGF23, por lo que este sube su concentración provocando hipofosfatemia, excesiva fosfaturia y problemas de mineralización ósea <sup>74, 75</sup>.

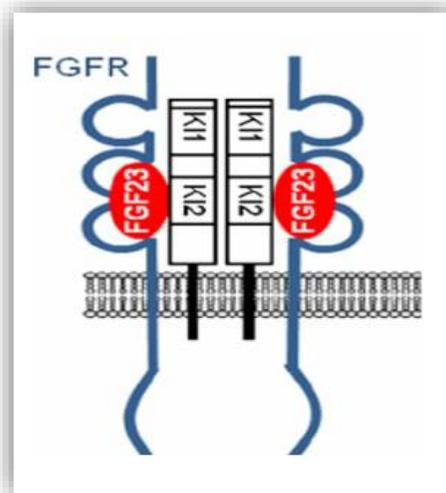
### **2.4 Efectos de FGF23**

Hoy día conocemos que FGF23 interviene a nivel renal promoviendo la fosfaturia, a nivel de la glándula paratiroides disminuyendo la secreción de PTH y también es responsable del descenso de vitamina D. Para el desarrollo de estas acciones fisiológicas el FGF23 circulante debe unirse a su receptor de FGF y a su co-receptor Klotho. A continuación se detalla el proceso de traducción de la señal desencadenado por FGF23.

### 2.4.1 Klotho como cofactor de FGF23

El gen klotho fue descubierto en 1997 como un gen supresor del envejecimiento <sup>76</sup>. Posteriormente se descubrieron otras isoformas como el  $\beta$ -Klotho <sup>77</sup> y el  $\gamma$ -Klotho <sup>78</sup>. Por tanto, la primera forma conocida de Klotho y de la cual hablaremos a continuación se conoce como  $\alpha$ -Klotho.

$\alpha$ -Klotho es una proteína de 130 KDa de un solo dominio transmembrana y con un dominio extracelular amino terminal compuesto por dos subunidades en tándem denominadas KL1 y KL2 <sup>79</sup>. Cada dominio extracelular tiene una notable homología con proteínas  $\beta$ -glucosidasas <sup>80 81</sup>. Finalmente, también presenta un pequeño dominio intracelular en el extremo carboxi-terminal.



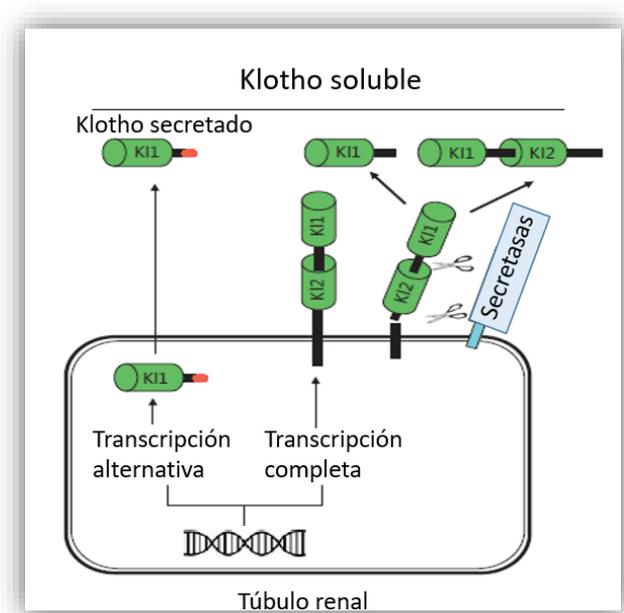
**Figura 3. Estructura de klotho transmembrana.** En esta figura se puede apreciar dos moléculas de klotho transmembrana con sus dominios KL1 y KL2. Además de la unión con FGF23 y el receptor FGFR. Esquema modificado de Huang and Moe <sup>82</sup>.

Los principales sitios de expresión de  $\alpha$ -Klotho como proteína transmembrana son el riñón (túbulos renales proximal y distal) <sup>83</sup>, plexo

coroideo del cerebro y glándula paratiroidea <sup>84</sup>. En menor medida también se expresa en otros sitios como músculo esquelético, placenta, vejiga urinaria, colon, oído interno, nodo sinoauricular, páncreas, testículo y ovario <sup>85</sup>.

El riñón es el principal órgano de producción de  $\alpha$ -Klotho donde se desarrolla la acción fosfatúrica <sup>86</sup>.

Además de  $\alpha$ -Klotho como receptor con dominio transmembrana, Klotho puede presentarse como proteína circulante en forma soluble. Existen varias formas de klotho soluble. Una de ellas abarca el fragmento KL1, la cual se genera mediante splicing alternativo durante la transcripción y a la que se denomina klotho secretado <sup>76, 85</sup>. Esta constituye la principal forma de klotho soluble en circulación <sup>87</sup>. También se puede presentar otra forma soluble de klotho a partir de su forma transmembrana. En este caso las secretasas de los túbulos renales proximal y distal ejercen su función cortando el dominio extracelular al completo (KL1 y KL2) o cortando solo KL1. Estas dos últimas formas de klotho soluble también se encuentran en la circulación sanguínea. <sup>87, 88</sup>.



**Figura 4. Tipos de klotho soluble.** Se distinguen tres tipos de klotho soluble, uno se genera a partir de una transcripción alternativa llamado klotho secretado, el cual lleva solo el dominio KL1. Los otros dos tipos de klotho soluble se generan a partir de una transcripción completa y dependiendo de la zona donde actúen las secretasas se forma un klotho soluble con un dominio KL1 o con los dos dominios KL1 y KL2. Esquema modificado de Neyra JA and Hu MC <sup>89</sup>.

La proteína  $\alpha$ -klotho transmembrana es requerida para la transmisión de la señalización de FGF23 <sup>90</sup>. El FGF23, hormona fosfatúrica producida por osteocitos, se une con una afinidad moderada a la familia de los receptores de FGF. Pero en presencia de klotho, este complejo FGFR/FGF23 se une con una mayor afinidad <sup>91, 92</sup>. Por lo tanto, FGF23 y klotho se complementan para regular la homeostasis del fósforo <sup>93</sup> promoviendo la excreción renal de fósforo mediante la reducción del número de co-transportadores de fosfato NaPi2a y NaPi2c presentes en el túbulo proximal y la reducción de la absorción

de fósforo intestinal, disminuyendo la síntesis renal de 1,25-dihidroxi vitamina D3 (1,25(OH)<sub>2</sub> D3).

Por tanto, parte de las funciones fisiológicas de FGF23 resultan ser dependientes de Klotho <sup>90,93</sup>.

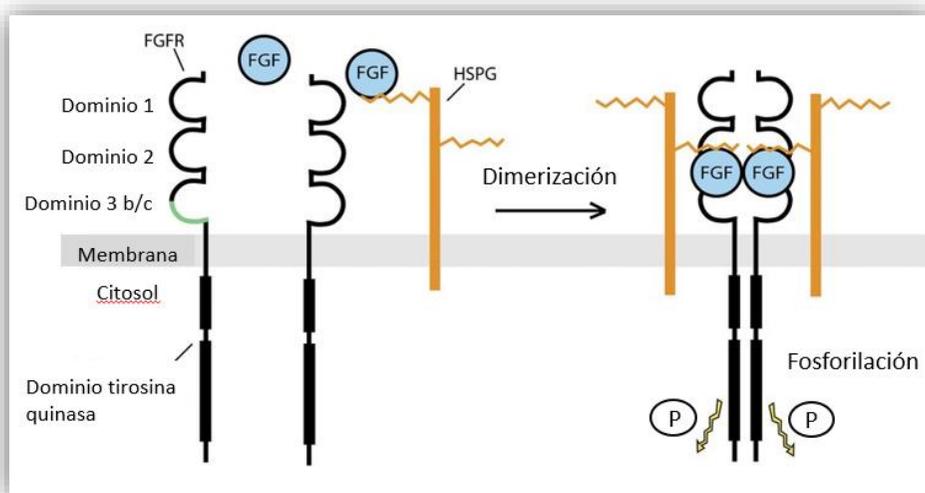
#### **2.4.2 Receptores de factores de crecimiento fibroblástico**

Existen cuatro receptores de FGF, que surgen de un gen común que dependiendo del tejido sufre un tipo de splicing alternativo u otro que determina su expresión y su presencia o no en un tejido concreto. Estos receptores son proteínas de membrana de un solo paso. El dominio extracelular N-terminal de un FGFR consiste en tres dominios tipo inmunoglobulina: D1, D2 y D3.

La porción proximal de la membrana comprende D2 y D3. La unión D2-D3 es necesaria y suficiente para la unión con el ligando FGF <sup>94, 95</sup>. Esta unión se realiza mediante un residuo muy conservado presente en la unión D2-D3 del receptor. Se trata de una arginina que forma tres puentes de hidrógeno con el ligando <sup>96</sup>. Un splicing alternativo específico de tejido en el dominio D3 de FGFR1 y FGFR3 genera las isoformas “b” y “c” de estos receptores y cada uno tiene una especificidad de unión al ligando distinta <sup>95, 97</sup>. Siguiendo con la estructura de un FGFR, se encuentra el dominio transmembrana que consiste en una  $\alpha$ -hélice sencilla. A continuación, la región intracelular del receptor abarca un dominio con actividad tirosina quinasa (TK).

Los receptores FGFR, los cuales tienen función tirosina quinasa, están presentes en la membrana celular como monómeros. La unión del ligando induce la dimerización de estos receptores. Tras esta dimerización se produce un reclutamiento directo de proteínas de

señalización intracelular que se unen a los sitios intracelulares de autofosforilación de tirosina del receptor para activarlo en respuesta a la estimulación extracelular inducida por el ligando FGF y llevar a cabo la señalización celular TK <sup>98</sup>. Para que esta unión FGF-FGFR sea más efectiva, se necesita una molécula accesoria como heparina o proteoglicano heparan-sulfato (HSPG), la cual tiene baja afinidad por el receptor y por sí sola no es capaz de transmitir una señal biológica. Pero su función como molécula accesoria es necesaria tanto para regular la unión de los FGFs a sus receptores como para la activación de los receptores FGFRs <sup>99</sup>.



**Figura 5. Estructura de FGFR.** En esta figura se pueden apreciar los tres dominios extracelulares del receptor FGFR y su dominio tirosina quinasa intracelular. Además, tras la actuación de la molécula accesoria HSPG, cuya función es necesaria tanto para la unión del FGF con su receptor como para la activación del FGFR, se puede observar la nueva conformación del receptor tras su dimerización al unirse con un ligando para formar el complejo FGF/FGFR <sup>100</sup>.

El complejo de unión está formado por dos moléculas de FGF y dos moléculas de FGFR, en el cual una de las moléculas de FGF

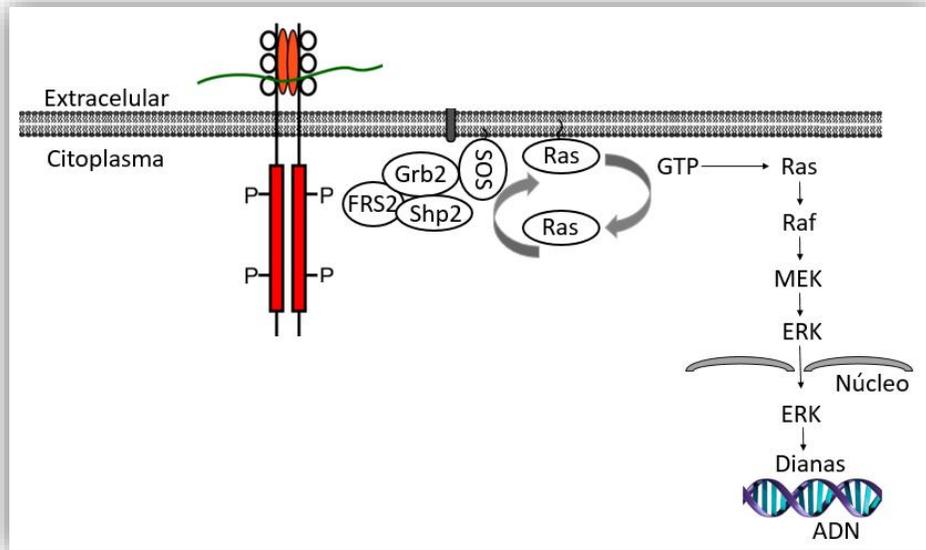
interacciona con el dominio D2, D3 y con el nexa que conecta estos dos dominios dentro de uno de los receptores. A este sitio se le conoce como sitio de unión primario. El dímero es establecido mediante un sitio de unión secundario implicando interacciones entre la otra molécula de FGF y el dominio D2 del segundo receptor del complejo.

También existen interacciones entre las dos moléculas FGFR del complejo mediante sus dominios D2 <sup>101</sup>. Cada molécula de FGFR simultáneamente contacta tanto con FGF como con la molécula accesoria HSPG <sup>101</sup>. Las dos moléculas de FGF en el complejo no contactan entre sí. Por esta razón las interacciones entre FGF-FGFR no son suficientes para establecer los dímeros en la membrana celular.

La molécula accesoria HSPG contacta tanto con ambos ligandos del complejo como con ambas moléculas FGFR a través del dominio D2 del receptor, permitiendo una dimerización estable en el complejo FGF-FGFR <sup>102</sup>. Esta dimerización es un prerrequisito para la autofosforilación de tirosina y la estimulación de la actividad intrínseca TK de estos receptores <sup>103</sup>.

Una vez promovida la autofosforilación de FGFR se produce la fosforilación de tirosina de FRS2 (del inglés, fibroblast growth factor receptor substrate 2) que conduce al reclutamiento de cuatro moléculas de Grb2 (del inglés, Growth factor receptor-bound protein 2) directamente y dos moléculas de Grb2 indirectamente a través de la fosforilación de tirosina de la proteína tirosina fosfatasa Shp2. Las moléculas de Grb2 unidas a FRS2 reclutan el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS), lo que lleva a la activación de la cascada de señalización Ras-MAPK <sup>103</sup>. Activándose una serie de intermediarios como Ras, Raf y ERK, además de p38. La proteína ERK y p38 activadas

se traslocan al núcleo y desencadenan la activación de los genes diana que controlan proliferación y crecimiento celular.



**Figura 6. Ruta de señalización Ras-MAPK.** Tras la dimerización y activación del receptor FGFR, mediante la autofosforilación y la estimulación de la actividad intrínseca TK, se produce la señalización intracelular mediante la ruta Ras-MAPK, activándose una serie de intermediarios, de los cuales ERK resulta particularmente relevante en esta tesis.

### 2.4.3 Complejo proteico heterotrímico klotho/FGFR/FGF23

Los FGF con acción paracrina, subfamilia a la cual pertenece FGF23, presentan baja afinidad con la molécula HSPG. Para compensar esta pérdida de interacción y poder activar los FGFR, los miembros de esta subfamilia utilizan en su lugar la molécula klotho, proteína transmembrana de un solo paso, para facilitar su interacción con el receptor <sup>91</sup>. FGF23 requiere de forma selectiva a  $\alpha$ -klotho como co-receptor para unirse a FGFR <sup>90, 93</sup>. La proteína de klotho solo interactúa

con la isoforma “c” de los receptores FGFR, esto restringe la unión de klotho a los receptores que pueden ser utilizados por FGF23<sup>104</sup>.

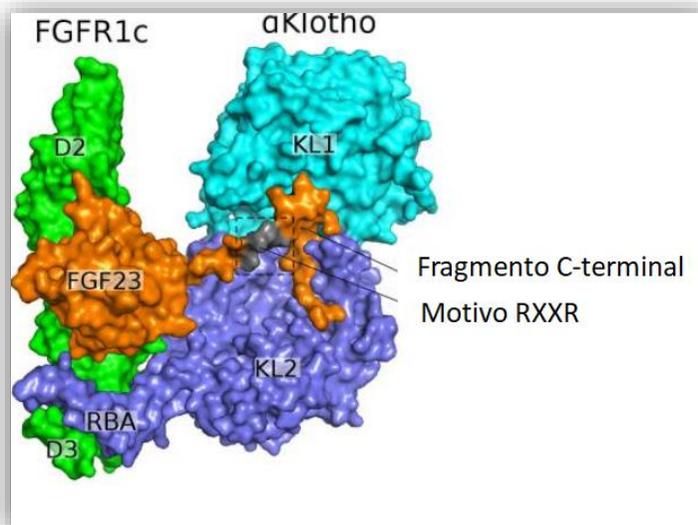
Recientes estudios han demostrado que klotho soluble también puede tener su propio mecanismo de acción, actuando como una hormona circulante. Sugiriendo que  $\alpha$ -klotho soluble también es un buen co-receptor de FGF23 junto con FGFRc1<sup>61</sup>.

En el complejo FGF23-FGFR1c- $\alpha$ -Klotho (1:1:1)  $\alpha$ Klotho aumenta la afinidad de unión entre FGF23 y FGFR1c. En el complejo binario FGF23-FGFR1c, FGF23 se une con baja afinidad entre los dominios D2 y D3 del receptor mediante un residuo de serina presente únicamente en las isoformas “c” de los FGFR<sup>61</sup>.

Con respecto a  $\alpha$ -klotho, de acuerdo con la secuencia de homología con proteínas  $\beta$  glucosidasas que presentan los dominios de klotho (KL1 y KL2) podemos diferenciar una estructura denominada barril TIM (del inglés, Triosephosphate isomerase) para cada uno de los dominios, la cual está formada por ocho cadenas  $\alpha$ -hélice y ocho láminas  $\beta$ . Los dominios KL1 y KL2 difieren en la conformación del bucle  $\beta$ 1 $\alpha$ 1. En KL2, este bucle sobresale de la estructura TIM y sirve como un brazo de enlace para la unión con el dominio D3 del receptor. El dominio KL1 y KL2 están conectados por un enlazador corto rico en prolina. También existen conexiones entre ambos KL a través de algunos contactos interdominios. Uno de estos contactos está mediado por un ión de  $Zn^{2+}$  permitiendo la unión de FGF23 a  $\alpha$ -klotho mediante su motivo RXXR presente en su cola del extremo C-terminal<sup>61</sup>.

La disposición de este complejo es similar tanto para  $\alpha$ -Klotho soluble como para  $\alpha$ Klotho transmembrana teniendo una capacidad

similar para transmitir la señalización intracelular desencadenada por FGF23 <sup>61</sup>.



**Figura 7. Complejo proteico heterotrimérico de klotho soluble, FGFR1c y FGF23.** Imagen modificada de Gaozhi, C y colaboradores <sup>61</sup>.

## 2.5 Acciones fisiológicas

### 2.5.1 Acciones fisiológicas de FGF23 en Riñón

El riñón es una de las principales dianas fisiológicas de FGF23. Tiene como función inhibir la expresión renal de los transportadores de Na-dependientes de fósforo NaPi-2a y NaPi-2c, disminuyendo así la reabsorción de fósforo en el túbulo proximal de la nefrona, estimulando la excreción de P y por tanto la fosfaturia <sup>105</sup>.

En el riñón, FGF23 también disminuye la síntesis de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (Calcitriol), la forma biológicamente activa de la vitamina D, suprimiendo la actividad de la enzima 1- $\alpha$ -hidroxilasa, necesaria para su generación. Además, FGF23 estimula también la degradación de 1,25

(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> mediante el estímulo de la enzima 24-hidroxilasa aumentando así la generación del metabolito de baja actividad biológica de la vitamina D <sup>106</sup>.

Mediante estos mecanismos, FGF23 se postula como la principal hormona fosfatúrica y contra-reguladora de vitamina D <sup>107</sup>. A su vez, los niveles séricos de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> se muestran como uno de los reguladores de la producción de FGF23 más importantes. En animales de experimentación se ha podido observar que 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> estimula de una forma directa y dosis dependiente la secreción de FGF23 por el osteoblasto <sup>108</sup>. Este sistema permite mantener los niveles de fósforo en sangre dentro de márgenes precisos y controlados <sup>10</sup>. En aquellas situaciones en las que se produzca un incremento de los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> y, por tanto, de la absorción gastrointestinal de P, el estímulo de la producción del FGF23 por parte del osteoblasto favorecerá la fosfaturia, impidiendo la aparición de hiperfosfatemia.

### **2.5.2 Acciones de FGF23 sobre la glándula paratiroidea**

La glándula paratiroidea es otro órgano diana para FGF23. En la glándula paratiroides, FGF23 inhibe la síntesis y secreción de la hormona paratiroidea (PTH). Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que FGF23 de manera dosis dependiente disminuye tanto la transcripción del ARNm como su secreción proteica <sup>109, 110</sup>.

Del mismo modo, los niveles de PTH séricos intervienen también en la regulación de FGF23. La PTH estimula la formación de osteoblastos que son los principales productores de FGF23 <sup>111</sup>. Se ha demostrado que roedores con hiperparatiroidismo primario tienen mayor número de

osteoblastos y elevados niveles de FGF23. En esta situación la paratiroidectomía consigue revertir estos altos niveles de FGF23 <sup>112</sup>.

El efecto directo de FGF23 sobre el hueso es objeto de estudio en los últimos años. Algunos trabajos muestran una relación entre altos niveles de FGF23 y cambios en el remodelado óseo presentes en la osteodistrofia renal. Estos resultados subrayan la idea de que altos niveles de FGF23 podrían estar implicados con la generación de procesos fisiopatológicos en distintos órganos y tejidos como los documentados en corazón <sup>113</sup> y hueso <sup>114</sup>. Estas acciones serán comentadas en los siguientes apartados.

Del mismo modo, otros autores refuerzan la idea de que la PTH actúa sobre el hueso para estimular la expresión de FGF23 que se acompaña de una disminución de la expresión de esclerostina, proteína sintetizada en los osteocitos para evitar la formación de hueso en exceso <sup>115</sup>. Gracias a un estudio experimental in vivo, se ha demostrado que realizando una paratiroidectomía se previene y corrige el aumento de FGF23 en la insuficiencia renal temprana, confirmando la importancia de la PTH en la regulación de los niveles de FGF23 y sugiriendo por tanto que los niveles altos de FGF23 en la ERC pueden estar fuertemente influenciados por el hiperparatiroidismo. Por lo tanto, es necesario controlar los niveles séricos de PTH en pacientes con ERC para evitar los elevados niveles séricos de FGF23 <sup>116</sup>.

### **2.6 Patologías asociadas a alteraciones de FGF23**

Existen numerosas patologías que tienen como origen una alteración grave de los niveles de FGF23. Muchas de estas alteraciones que a continuación se describen están relacionadas con patologías

óseas. Sin embargo otro tipo de efectos derivados del exceso de FGF23 se están evidenciando también a nivel extrarrenal, desencadenándose así patologías en órganos y tejidos como corazón, endotelio o hueso.

### 2.6.1 Patologías óseas relacionadas con FGF23

Como se ha comentado anteriormente las alteraciones en los niveles de FGF23 conducen a alteraciones óseas. Es interesante comprobar que estas alteraciones se producen tanto por exceso de FGF23 (que da lugar a hipofosfatemia y problemas de mineralización ósea) como por deficiencia en los niveles de FGF23 (que conducen a elevados niveles de P). A continuación se mencionan de forma resumida, en la siguiente Tabla, las alteraciones óseas relacionadas con FGF23.

<b>Alteraciones óseas</b>		
<b>Por exceso de FGF23</b>		
	<b>Etiología de la alteración</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante</b>	-Mutación en Arg <sup>176 o 179</sup> -FGF23 no es fragmentado por SPC permaneciendo intacto y funcional	- Hipofosfatemia -Fosfaturia - Disminución CTR
<b>Raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo</b>	-Mutación inactivante en el gen DMP1 (específico de hueso y dientes)	-Hipofosfatemia -Elevada fosfaturia -Disminución CTR -Aumento fosfatasa alcalina
<b>Osteomalacia inducida por tumor</b>	-Trastorno paraneoplásico derivado de un tumor	-Hipofosfatemia -Elevada fosfaturia -Disminución CTR

	de origen mesenquimático	-Aumento fosfatasa alcalina
<b>Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X</b>	-Mutación en el gen PHEX -FGF23 no es fragmentado SPC permaneciendo intacto y funcional	-Hipofosfatemia severa -Elevada fosfatemia -Disminución CTR
<b>Por déficit de FGF23</b>		
<b>Calcinosis tumoral familiar</b>	-Mutación en el gen GALNT3 -Mutación en el residuo Ser <sup>71</sup> de FGF23	-Hiperfosfatemia -Aumento CTR -No hay fosfatemia

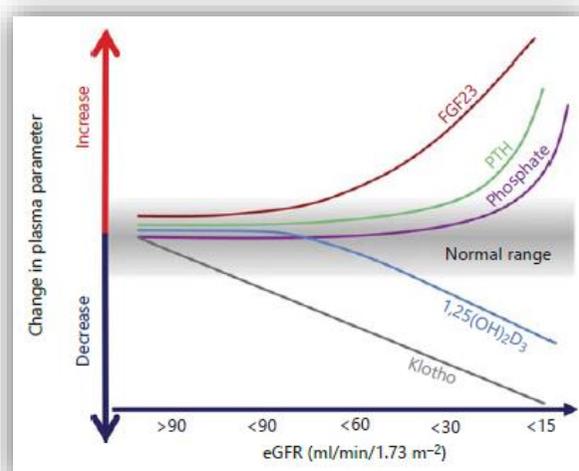
**Tabla 4. Alteraciones óseas relacionadas con el exceso y déficit de FGF23** <sup>117, 118, 54, 74, 119</sup>.

## 2.7 FGF23 y enfermedad renal crónica

Como ya se ha mencionado, los niveles séricos de FGF23 incrementan progresivamente a medida que la función renal decae. Los niveles de FGF23 suelen ser entre 2-5 veces más altos durante la etapa temprana e intermedia de la ERC. Sin embargo, en los últimos estadios de la ERC puede alcanzar más de 200 veces el nivel normal. El incremento en FGF23 es paralelo al acúmulo de fosforo sérico <sup>120</sup>.

Debido al aumento de FGF23, se produce una inhibición de 1,25 (OH) 2 D3 <sup>121</sup> que reduce la absorción intestinal de fosfato. En pacientes en hemodiálisis (HD), se ha sugerido que los niveles elevados de FGF23 en suero están también asociados con la expresión reducida de Klotho

<sup>122</sup> aunque no se ha encontrado una relación causal entre ellos. Estudios recientes han establecido una relación entre el fósforo de la dieta y los niveles séricos de FGF23 <sup>123</sup> y han demostrado que los quelantes del fósforo reducen los niveles de FGF23 en pacientes en hemodiálisis <sup>124</sup>. El incremento de las concentraciones de FGF23 ocurre antes de que se desarrollen los cambios en los niveles de fósforo sérico, PTH o  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  <sup>125</sup>.



**Figura 8. Tiempo de evolución de los niveles plasmáticos de FGF23, PTH, fósforo,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y klotho.** Se puede apreciar que cuando la TFG comienza a disminuir, lo primero que sucede en el metabolismo mineral es la caída de klotho junto con la subida de FGF23.

A día de hoy, no se conoce muy bien la razón exacta del aumento de FGF23 en la etapa inicial de la ERC. Posibles explicaciones para este fenómeno pueden ser los efectos compensatorios de la retención de fósforo causado por el descenso de la capacidad de los riñones para excretar el fósforo proveniente de la dieta. La deficiencia de klotho en la ERC o la administración activa de la vitamina D quizás contribuyen al incremento de los niveles séricos de FGF23 <sup>25</sup>.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto que la sobrecarga de fósforo presente en los estadios iniciales de la ERC es la responsable del descenso de Klotho renal. De esta manera, el exceso de fósforo, desencadena un efecto tóxico sobre los túbulos renales induciendo a la pérdida de Klotho. Este descenso es independiente de FGF23 y es consecuencia de la activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina por altos niveles de fósforo. La administración de inhibidores de esta ruta Wnt, Dkk1, consiguió revertir el descenso de Klotho inducido por fósforo. Por tanto, se propone al exceso de fósforo como origen del descenso de Klotho. Este descenso de Klotho podría explicar por qué a pesar de los altos niveles de FGF23 no se produce su efecto fosfatúrico y se genera hiperfosfatemia <sup>126</sup>.

Un argumento a favor de la restricción dietética de fuentes específicas de P, comentada con anterioridad, es el hecho de que la carga tubular de P se asocia con un aumento tanto del FGF23 como de la PTH, que se observa antes de que haya un aumento significativo de la concentración sérica de P. Muchos estudios indican que un aumento progresivo de FGF23 predice una rápida progresión de la enfermedad renal y la mortalidad <sup>52</sup>.

Debido a que el FGF23 no es un parámetro disponible en la clínica de nefrología, se crea la necesidad de conocer otros parámetros que sirvan de biomarcadores y que estén relacionados con el aumento de FGF23. Así de esta manera, se podrá identificar desde la clínica cuáles son los pacientes que tienen más riesgo cardiovascular.

Los parámetros que podrían ayudar al nefrólogo a identificar qué pacientes tienen niveles de FGF23 altos, podrían ser aquellos

parámetros relacionados con el fósforo en la orina. Aunque hay que considerar que no siempre existe una relación de FGF23 y fósforo en la orina ya que en presencia de altos niveles de FGF23, si el riñón está muy dañado, se puede excretar poca cantidad de fósforo a través de la orina, y esta poca cantidad de P en la orina no sería un reflejo de la cantidad de FGF23 sérico, debido a la baja tasa de filtración que posee el riñón. Es por esto que se necesita explorar con mayor nivel de evidencia parámetros que nos permitan conocer cuándo los niveles de FGF23 podrían suponer una amenaza cardiovascular. En esta tesis se explorará el potencial enlace entre ingesta de fósforo y daño vascular a través del aumento de FGF23.

### **3. Disfunción Vascular durante la ERC**

#### **3.1 Mortalidad cardiovascular**

La disfunción endotelial y la rigidez arterial son factores de riesgo establecidos para la mortalidad cardiovascular en la población general y son altamente prevalentes en pacientes con ERC <sup>127</sup>. Estas junto con la presencia de calcificaciones vasculares son algunas de las razones por las que la enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad y morbilidad en pacientes con ERC <sup>128</sup>.

##### **3.1.1 FGF23 y mortalidad cardiovascular**

Los niveles suprafisiológicos de FGF23 en pacientes con ERC no han tenido tanta importancia hasta hace relativamente poco tiempo. El primer estudio que demostró la asociación entre FGF23 y mortalidad fue publicado en 2008. Gutiérrez y colaboradores observaron una asociación positiva entre los altos niveles de FGF23 y la mortalidad en

pacientes en diálisis. Esta relación demostró ser independiente de los niveles séricos de fósforo <sup>129</sup>. Posteriormente, Faul y colaboradores demostraron que altos niveles de FGF23 son causa directa de hipertrofia de cardiomiocitos de rata y de hipertrofia del ventrículo izquierdo aumentando con ello la mortalidad cardiovascular en estos pacientes con ERC <sup>113</sup>.

Más recientemente, Isakova y colaboradores han demostrado que en la mayoría de pacientes con estadios avanzados de ERC los niveles de FGF23 son elevados. Sin embargo cuando se analizan estos niveles a diferentes tiempos, encuentran que en aquellos pacientes donde se producen los cambios más bruscos de FGF23 se establece una asociación positiva con un avance más rápido en la progresión de la enfermedad y el riesgo de mortalidad <sup>52</sup>.

### **3.2 Endotelio**

El endotelio está formado por una monocapa de células endoteliales que recubren la zona interna de todos los vasos sanguíneos y controlan la comunicación entre la sangre y los vasos. Las CE son capaces de detectar cambios tanto de tipo físico, relacionados con el estrés mecánico producido por el flujo sanguíneo, la presión arterial o la distensión de la pared, como de tipo químico, debidos a la liberación de sustancias por parte de las células sanguíneas o de los tejidos.

La función del endotelio es fundamental para la homeostasis vascular y es sensible a cambios en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) o de especies reactivas del oxígeno (ROS). El NO es un potente vasodilatador necesario para el correcto funcionamiento de la vasculatura y su baja biodisponibilidad resulta en una vasoconstricción

inadecuada. En el contexto de la ERC, la disfunción endotelial ocurre desde las etapas más tempranas <sup>130</sup>, y contribuye en gran medida al incremento del riesgo de la enfermedad cardiovascular <sup>131</sup>.

### **3.2.1 FGF23 y endotelio**

Se han relacionado altos niveles séricos de FGF23, incluso dentro del rango normal, con un cambio en la vasorreactividad endotelial en sujetos con función renal normal <sup>132</sup>. En un estado de deficiencia de klotho, como sucede en la ERC, se produce una disminución de la síntesis de NO mediada por FGF23 y aumenta la formación de ROS. Confirmando así, que el exceso de FGF23 puede promover principalmente el estrés oxidativo y por tanto la disfunción endotelial en pacientes con ERC <sup>133</sup>.

### **3.3 Rigidez arterial**

El sistema arterial representa una red compleja de tubos elásticos ramificados que, tras recibir la sangre procedente de las contracciones rítmicas del corazón, consigue, mediante un efecto de amortiguado obtener un flujo continuo en arteriolas y capilares <sup>134,135</sup>. La contracción cardíaca genera una onda de pulso que se transmite a lo largo de las arterias gracias a su consistencia elástica. La velocidad de propagación de la onda de pulso generada depende de la presión arterial, del radio de la arteria por la que se propaga y del espesor de su pared <sup>134</sup>.

Conceptualmente, la rigidez arterial es la relación entre tensión y deformación de la arteria. No es más que una pérdida de la distensibilidad del vaso, siendo esta la capacidad o facilidad de los vasos

sanguíneos para distenderse y contraerse apropiadamente en respuesta a los cambios de volumen y de presión. La velocidad a la que se transmite la onda aumenta a medida que disminuye la distensibilidad, transmitiéndose, así, con mayor rapidez en las arterias más rígidas <sup>136</sup>. La rigidez arterial está determinada principalmente por la edad <sup>137</sup>, el sexo <sup>138</sup> y la presión arterial <sup>137</sup> y se relaciona con los factores de riesgo cardiovascular <sup>139</sup> debido a que causa una mayor disfunción diastólica e insuficiencia cardíaca <sup>140</sup>.

La rigidez arterial es un biomarcador importante en la evaluación del riesgo cardiovascular <sup>141</sup>. La aorta es el principal vaso de interés para medir la rigidez arterial por dos razones. La primera es que tanto la aorta torácica como la abdominal presentan una modificación de su estructura en función de las oscilaciones de la presión de la sangre permitiendo una mejor función amortiguadora arterial <sup>142</sup> y la segunda porque la presión de onda de pulso es un predictor independiente de los factores de riesgo de eventos cardiovasculares en una variedad de poblaciones <sup>143</sup>. Además, la presión de onda de pulso es considerada como un biomarcador de mortalidad <sup>144</sup> pues está inversamente relacionada con la distensibilidad.

Zanoli y colaboradores han demostrado la evidencia de varias alteraciones en la función de la carótida en pacientes con ERC temprana. Esas evidencias que alteran su función son una disminución de la distensibilidad carotídea, una disminución de la tensión carotídea y un aumento en la rigidez carotídea <sup>145</sup>.

Los pacientes con ERC terminal presentan un mayor riesgo cardiovascular acompañado de un aumento de la velocidad de onda de pulso en comparación con la población general <sup>146</sup>.

### **3.3.1 FGF23 y rigidez arterial**

Como se ha comentado anteriormente, el FGF23 se relaciona con elementos de riesgo cardiovascular, como la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la carga aterosclerótica y la disfunción endotelial <sup>147</sup>. Sin embargo, la relación entre FGF23 y rigidez arterial no está del todo descifrada ya que hoy en día existe mucha controversia entre dicha relación.

Inci y colaboradores demostraron que la rigidez arterial incrementó durante la ERC pero no obtuvieron una relación positiva entre los niveles de FGF23 y rigidez arterial <sup>148</sup>. Sin embargo, Krishnasamy y colaboradores han demostrado una asociación positiva entre FGF23 y velocidad de onda de pulso anormal, sugiriendo que el FGF23 puede tener un papel importante en la mediación de la rigidez arterial <sup>149</sup>.

En esta tesis se explorará en profundidad si existe una relación entre FGF23 y rigidez arterial con especial atención a los mecanismos potenciales por los que esta se desarrolla.

### **3.4 Calcificación vascular**

Otra de las complicaciones asociadas a la ERC es la presencia de calcificaciones vasculares (CV). Se trata de un proceso por el cual las células de músculo liso vascular (CMLV) presentes en los vasos sanguíneos sufren una transformación fenotípica por la que se diferencian en células similares a osteoblastos conduciendo a la rigidez de los vasos y a alteraciones hemodinámicas como hipertensión que agravan la patología cardiovascular asociada a la ERC y con ello la mortalidad.

### 3.4.1 FGF23 y calcificación vascular

Los efectos potenciales de FGF23 sobre la CV son controvertidos. Por un lado, hay evidencias que sostienen un efecto preventivo de FGF23 sobre la CV <sup>150, 151</sup>.

Zhu et al. reportaron que FGF23 tenía un efecto protector sobre la calcificación de CMLV cultivadas con altas concentraciones de fósforo. Este efecto fue inhibido al bloquear el intermediario ERK de la ruta de señalización de las MAP quinasas, aumentando así la calcificación en estas células. Estos datos apoyan la idea de que la activación de la ruta ERK es un papel clave en la mediación del efecto protector del FGF23 contra la calcificación de CMLV <sup>150</sup>.

En la misma línea, Lim et al demostraron que FGF23 disminuyó la calcificación de CMLV humanas de forma dependiente tras la inducción de  $\alpha$ -klotho. En sus estudios presentaron por primera vez la expresión de Klotho endógena en arterias tanto *in vitro* como *in vivo*. Proporcionaron evidencia de que la ERC es un estado de deficiencia vascular de  $\alpha$ -Klotho, una explicación probable para el envejecimiento vascular acelerado con la presencia de calcificación. Estos autores proponen que los altos niveles de FGF23 observados durante la ERC no pueden ser vasculoprotectores por la resistencia que supone la deficiencia de Klotho/FGFR. Confirmaron que la restauración de klotho mediante la activación de los receptores de vitamina D (VDR) con calcitriol hace que las CMLV vuelvan a ser sensibles a FGF23 con efectos inhibidores de la proliferación y la calcificación. De esta manera, proponen a la activación de VDR como estrategia terapéutica en la ERC para la restauración de la deficiencia vascular de klotho y la respuesta

vascular de FGF23, aunque este aspecto de momento no ha sido demostrado *in vivo* o en pacientes <sup>151</sup>.

Por otro lado hay trabajos que señalan al FGF23 como un agravante del proceso de calcificación de estas CMLV <sup>152, 153, 154, 155</sup>.

Jimbo et al defienden que FGF23 potencia la calcificación inducida por P en CMLV humanas que sobre-expresan  $\alpha$ -Klotho <sup>152</sup>.

Otros estudios en pacientes realizados por Khan y colaboradores confirmaron que en los individuos con ERC y en diálisis, los niveles plasmáticos de FGF23 están fuertemente asociados con la progresión de la calcificación arterial coronaria. Sugiriendo incluso que FGF23 podría ser un marcador de riesgo cardiovascular en la ERC <sup>153</sup>.

También se ha reportado que en individuos con ERC que no están en diálisis, el FGF23 también está relacionado con calcificación arterial coronaria. La prevalencia de dicha calcificación aumentó significativamente a medida que disminuía la función renal. Los niveles de FGF23 fueron significativamente mayores en pacientes con ERC en estadio 3 que en pacientes con ERC en estadios 1 y 2. En contraste, los niveles de fósforo sérico sólo fueron significativamente más altos en pacientes con ERC en estadio 5 sin distinción en estadios tempranos donde no hay tampoco correlación con la calcificación arterial coronaria.

Estos resultados sugieren que la medición de FGF23 puede ser mejor biomarcador de calcificación y de factores de riesgo asociados a ella que la propia medición del fósforo <sup>154</sup>. Sin embargo de momento no disponemos de kits diagnóstico fiables para valorar los niveles séricos de FGF23. Otros autores también apoyan esta misma premisa, pues han

observado que altos niveles de FGF23 séricos están relacionados con CV <sup>153, 155</sup>.

Otros estudios sin embargo, demuestran que FGF23 no interfiere sobre el proceso de CV. Scialla et al. también demostraron in vitro que la adición de FGF23 a CMLV humanas en condiciones de alto fósforo no promovió cambios sobre estas células ni sobre anillos de aortas, tanto en presencia como en ausencia de klotho soluble <sup>156</sup>. Resultados similares fueron encontrados por Lindberg et al, demostrando que FGF23 no promueve la calcificación inducida por  $\beta$ -glicerofosfato de CMLV bovinas <sup>157</sup>.

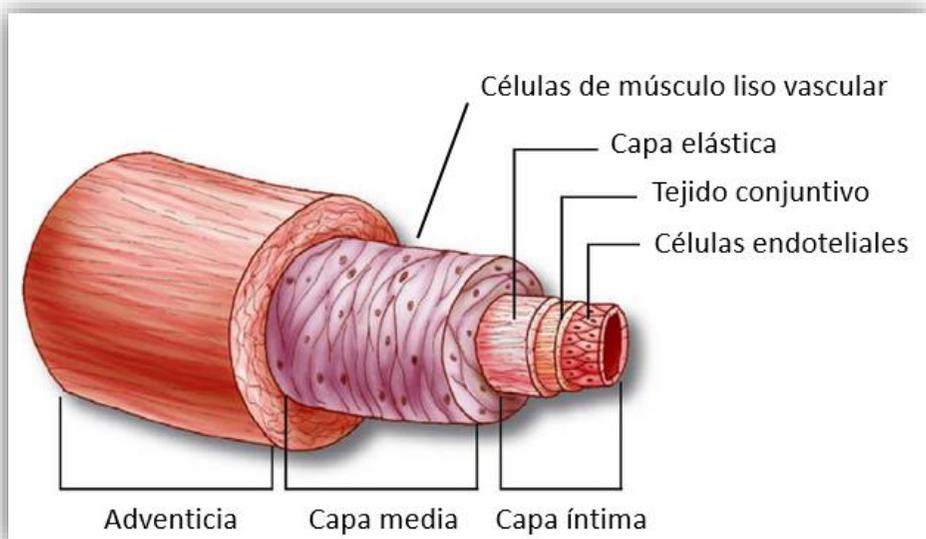
Dada la controversia encontrada en la bibliografía consideramos que el efecto de FGF23 sobre la CV debe ser estudiado en profundidad para dilucidar si las acciones sobre las CMLV son directas o por el contrario están subordinadas a otros cambios relacionados con las variaciones en otros elementos como fósforo, vitamina D o PTH.

Las CMLV son células cuyo fenotipo no está totalmente definido. Además, distintos estímulos pueden influir sobre ellas y modificar su función encontrando, como se verá a continuación, la posibilidad de detectar distintos tipos de fenotipos.

## 4. Células de músculo liso vascular

### 4.1 Localización de las CMLV

En la estructura de las arterias se pueden distinguir tres capas de células caracterizadas por presentar diferencias morfológicas y funcionales. Desde la más interna a la más externa se pueden distinguir las siguientes capas: capa íntima, capa media y adventicia.



**Figura 9. Estructura de una arteria.** Las CMLV se encuentran en la capa media de la arteria.

Las CMLV se localizan en la capa media de las arterias. Están organizadas en capas concéntricas circulares alrededor de la capa íntima. Son células altamente especializadas que presentan un importante papel en el mantenimiento del tono vascular regulando el diámetro de los vasos gracias al proceso de contracción y relajación en respuesta a estímulos vasoactivos que intervienen en el control de la presión arterial y el flujo sanguíneo.

## 4.2 Fenotipo de las células de músculo liso vascular

Dependiendo de la necesidad fisiológica puntual, las CMLV pueden presentar fenotipos diferentes, fundamentalmente el fenotipo contráctil o el sintético. Ambos son funcionales y tienen características diferenciales relacionadas con la función que realizan. Aunque se identifican claramente los fenotipos contráctil y sintético se postula que en las CMLV ambos fenotipos constituyen los extremos de un amplio espectro de otros posibles fenotipos intermedios <sup>158</sup>.

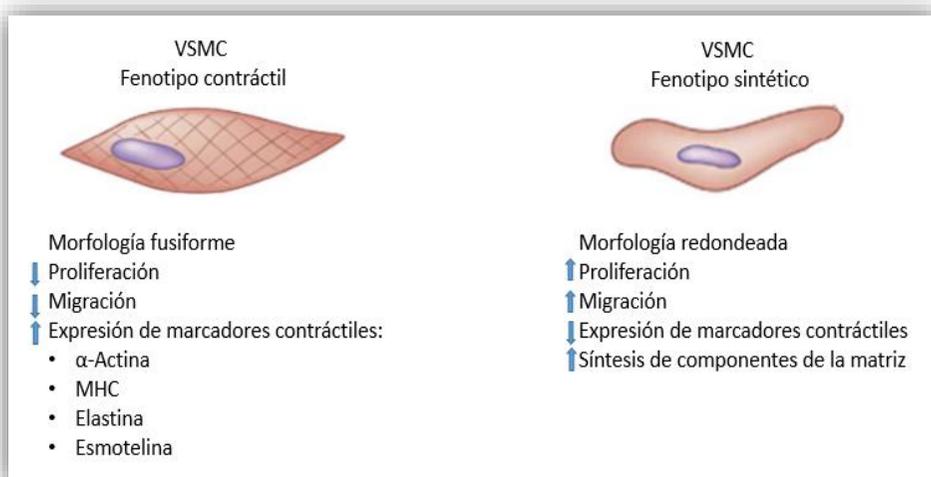
En condiciones de uremia las CMLV pueden también transdiferenciarse a células similares a osteoblastos por lo que también pueden alcanzar un fenotipo osteogénico, del cual se hablará más adelante.

### 4.2.1 Fenotipos contráctil y sintético

Las CMLV de fenotipo contráctil presentan una morfología fusiforme y una baja tasa de proliferación y migración. La presencia de filamentos con capacidad contráctil promueve la contracción del vaso que permite el mantenimiento del tono vascular. Además, expresan proteínas específicas e identificadoras del fenotipo contráctil. Para definir el fenotipo contráctil de las CMLV se valora la expresión de marcadores proteicos específicos <sup>159</sup>. Los más relevantes son la presencia de  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular ( $\alpha$ -SMA), cadena pesada de miosina de músculo liso (SM-MHC, del inglés smooth muscle-myosin heavy chain), esmotelina, elastina y  $\alpha$ -SM22 entre otros. Algunas de estas proteínas están implicadas en la contracción de las CMLV, como componente estructural del aparato de contracción como pueden ser

$\alpha$ -SMA y SM-MHC o como regulador de la contracción como por ejemplo  $\alpha$ -SM22 y esmotelina <sup>158</sup>.

En cambio, las CMLV de fenotipo sintético presentan una morfología menos alargada y fusiforme y contienen un gran número de orgánulos implicados en la síntesis de proteínas y en la producción de matriz extracelular. Con respecto al fenotipo contráctil, las CMLV sintéticas presentan una alta tasa de proliferación y una gran capacidad de migración <sup>160</sup>. En la siguiente figura se pueden visualizar las principales características y diferencias de ambos fenotipos de CMLV.



**Figura 10. Características de los dos fenotipos bien diferenciados de las CMLV.** Ambos fenotipos tienen morfología y función diferentes.

La plasticidad que poseen las CMLV es muy importante durante el desarrollo vascular normal. Durante este proceso, las CMLV exhiben una alta tasa de proliferación, migración, y producción de componentes de matriz extracelular tales como elastina y proteoglicanos, constituyendo una mayor proporción de células no comprometidas con

la contracción vascular y sí con la formación del vaso <sup>161</sup>. Al mismo tiempo que el vaso se va desarrollando, las CMLV van adquiriendo la capacidad de contraerse. De esta manera, una vez desarrollado el vaso, la mayor parte de las CMLV tienen fenotipo contráctil para asumir las funciones requeridas por la pared arterial madura, es decir la contracción y relajación del propio vaso, <sup>161</sup>. También se detectan en la pared del vaso sano, CMLV con fenotipo sintético, las cuales son necesarias para el correcto mantenimiento y remodelado fisiológico de la vasculatura <sup>158</sup>.

En el contexto de angiogénesis se produce una proliferación y migración de un progenitor común de las CMLV. En este momento, se activa un programa basal de diferenciación de las CMLV, el cual es responsable del desarrollo de este tipo celular hacia un fenotipo u otro. Se trata de una célula precursora de músculo liso vascular <sup>158</sup>.

Algunos estudios sostienen que son los cambios epigenéticos sobre estas células precursoras los que determinan la diferenciación hacia el fenotipo contráctil o sintético <sup>158</sup>. Otros trabajos proponen al microambiente del vaso como la fuente de estímulos que determinan el tipo de fenotipo que se necesita <sup>158</sup>. Generalmente, los cambios fenotípicos en CMLV son más relevantes durante la formación de los vasos sanguíneos (angiogénesis embrionaria). Pero también una vez formado el vaso, en una etapa post-natal, se producen cambios de fenotipo en las CMLV para solventar las necesidades de ese momento como en la neovascularización, en el remodelado vascular y en la reparación de un daño en el vaso <sup>162</sup>.

En los distintos tipos de arterias del sistema circulatorio, si se produce un daño y este es persistente se desencadena la patología

vascular originando un desequilibrio en el fenotipo de las CMLV. Se ha documentado una asociación patológica relacionada con el incremento de CMLV de fenotipo sintético y proliferativo en detrimento de la presencia de CMLV de fenotipo contráctil.

En esta situación de daño vascular hay una desregulación del ciclo celular que conduce a un incremento de la proliferación. El control de este proceso es clave durante la remodelación fisiológica que ocurre en los vasos promoviendo una mayor presencia de CMLV de fenotipo sintético que se acumulan en la pared vascular y que favorecen la progresión de procesos patológicos como aterosclerosis, hipertensión, trombosis, restenosis y otras enfermedades vasculares <sup>163, 164</sup>.

#### **4.2.2 Fenotipo osteogénico de CMLV.**

La exposición de las CMLV a concentraciones elevadas de P y calcio muestra un aumento de la mineralización dependiente de la dosis, que se asocia con la desdiferenciación de las CMLV hacia un fenotipo osteogénico <sup>165, 166</sup>. Por lo que la desdiferenciación de las CMLV en células similares a los osteoblastos está asociada a la calcificación vascular en la pared de los vasos <sup>167</sup>. La transición osteogénica de las CMLV se debe a una disminución de los marcadores de fenotipo contráctil <sup>167</sup> junto a un aumento de expresión de los marcadores osteogénicos, como por ejemplo el factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2), la osteopontina (OPN) y la fosfatasa alcalina <sup>167</sup> que participan en el desarrollo normal de los huesos, y que controlan la expresión de proteínas osteogénicas <sup>168</sup>.

Los desencadenantes de la transición osteogénica de las CMLV se han estudiado ampliamente y se reconocen muchos factores de riesgo,

como la pérdida de inhibidores de la calcificación, la senescencia, la muerte y el daño celular, el estrés oxidativo, el estrés mecánico y la disfunción mitocondrial <sup>167</sup>.

### **4.3. Alteraciones de CMLV en el proceso aterosclerótico**

La aterosclerosis es una enfermedad crónica inflamatoria de la pared vascular, caracterizada por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en la capa íntima de las arterias. Provoca una reacción inflamatoria y la multiplicación y migración de las CMLV contribuyendo a la estenosis arterial.

El cambio de fenotipo de las CMLV tiene una importancia fundamental en este proceso aterosclerótico, condicionando en gran medida la aterosusceptibilidad arterial. De forma fisiológica, las CMLV participan en la remodelación de la pared arterial para mantener el flujo sanguíneo en los vasos afectados debido a los cambios ateroscleróticos. Sin embargo, la capacidad de las CMLV para transdiferenciarse a células mieloides, similares a macrófagos ha sido también demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*. Tras una carga de colesterol, Rong y colaboradores descubrieron que CMLV murinas cultivadas se transformaban en células similares a macrófagos con capacidad para fagocitar y presentar antígenos <sup>169</sup>.

Por otro lado, se ha observado que células mieloides como macrófagos o progenitores mieloides derivados de médula ósea son capaces de transformarse en células musculares lisas de manera que cultivos de macrófagos tratados con TGF- $\beta$  <sup>170</sup> o trombina <sup>171</sup> empezaron a expresar  $\alpha$ -SMA. Estos estudios subrayan por tanto la capacidad

recíproca de ambos tipos celulares (macrófagos y CMLV) para transdiferenciarse en determinadas condiciones.

Finalmente y en relación a aterosclerosis y FGF23, otros estudios han demostrado que niveles altos de FGF23 se asocian a disfunción endotelial <sup>132</sup> situación que precede al desarrollo de aterosclerosis al igual que otras complicaciones cardiovasculares <sup>172, 173</sup>.

## **5. Papel de los microRNA sobre el fenotipo de las CMLV**

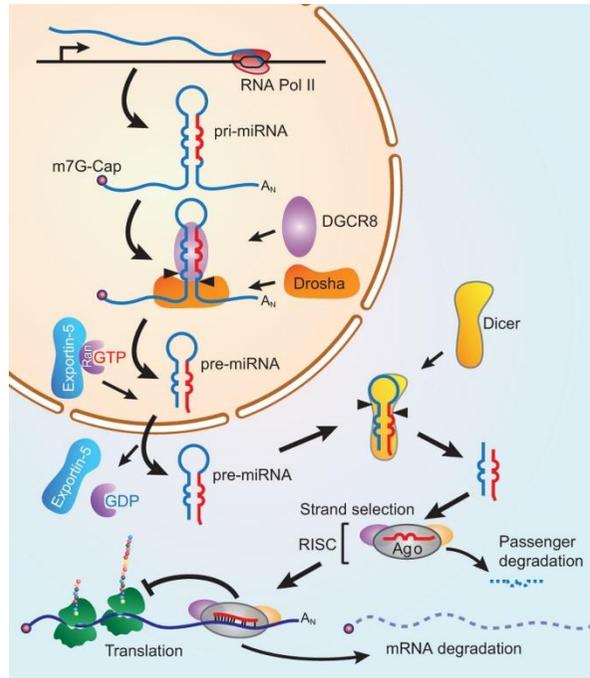
Los microRNA (del inglés, micro ribonucleic acid) son pequeñas moléculas monocatenarias de RNA (del inglés, ribonucleic acid) endógeno que no codifican para proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica. Tienen un tamaño de aproximadamente 20-25 nucleótidos. Se unen específicamente a diferentes mRNA (del inglés, messenger ribonucleic acid) y regulan negativamente su expresión inhibiendo su traducción o favoreciendo su degradación. Pero también pueden jugar un papel aumentando la expresión de diferentes genes, al disminuir la expresión de sus inhibidores <sup>174</sup>.

### **5.1 Biogénesis de los microRNA**

La secuencia de DNA (del inglés, deoxyribonucleic acid) a partir de la cual se va a formar un microRNA tiene una longitud que supera al tamaño final del propio microRNA e incluye la región microRNA y una región que es complementaria a la anterior, lo que permite su apareamiento. Esto supone que, durante la transcripción de esta secuencia de DNA mediante la acción de la enzima RNA polimerasa II, se formen regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla y

generar un RNA bicatenario primario largo conocido como pri-microRNA (Del inglés, primary-microRNA). Posteriormente, se produce la escisión nuclear del pri-micro-RNA mediante la acción de la enzima RNA endonucleasa III conocida con el nombre de Drosha, la cual está asociada con la proteína DGCR8 en mamíferos. Drosha corta de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de tallo-bucle, de forma que el producto resultante es una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada pre-microRNA <sup>175</sup>.

Este pre-microRNA es transportado activamente desde el núcleo al citoplasma por Ran-GTP y el receptor de exportación Exportina-5 <sup>176</sup>, <sup>177</sup>. Una vez en el citoplasma, esta molécula de unos 70 nucleótidos es cortada por la RNA endonucleasa III conocida como Dicer, asociada a las proteínas TRBP (del inglés, transactivation responsive element RNA-binding) y PACT (del inglés, protein kinase RNA activator) en mamíferos, dando lugar a una molécula de doble cadena conocida como microRNA dúplex <sup>178</sup>. De este microRNA dúplex, se separan las dos cadenas y una de ellas da lugar al microRNA maduro de unos 20-25 nucleótidos que se asocia directamente con las proteínas argonauto 1 (AGO1) y argonauto 2 (AGO2), las cuales forman parte del complejo ribonucleoproteico conocido como complejo de silenciamiento inducido por RNA <sup>179</sup> (RISC, del inglés RNA-induced silencing complex), el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del microRNA y/o de la inhibición de la traducción proteica, mientras que la otra cadena es degradada <sup>180</sup>.



**Figura 11. Modelo de biogénesis de un microRNA.** El transcrito primario (pri-microRNA) es generado en el núcleo por la polimerasa II y presenta un extremo 5' y una cola poliA en el extremo 3'. El complejo microprocesador que contiene la enzima Drosha y DGCR8 reconoce la estructura secundaria del pri-microRNA y corta específicamente por la base de la estructura tallo-bucle formándose un pre-microARN de 60-70 nucleótidos, el cual es liberado al citoplasma por la acción de la enzima exportina 5, donde Dicer, otra enzima del proceso, corta la molécula generando finalmente el microRNA maduro, el cual se asocia al complejo RISC, formado por las proteínas argonata 1 y argonata 2 <sup>181</sup>.

El microRNA maduro encuentra una complementariedad exacta con una secuencia en el extremo 3' UTR del mRNA de su gen diana y realiza su acción sobre el mismo <sup>182</sup>.

## 5.2 Clasificación de los microRNA según su nomenclatura

Los microRNA se enumeran para distinguirlos y se clasifican según el orden en el que son descubiertos <sup>183</sup>. Cada uno de ellos se

diferencia de los demás por su secuencia de nucleótidos. Los microRNA se pueden clasificar en tres grandes grupos.

-Grupo 1: Tienen una secuencia casi idéntica por lo que se designan con el mismo número, ya que la secuencia se conserva entre especies <sup>183</sup>.

-Grupo 2: Abarca a los microRNA que tienen secuencias muy similares (con cambios en uno o dos nucleótidos) dentro de una especie, también se nombran con el mismo número, pero son distinguidos por una letra para poder diferenciarlos dentro de la misma especie (por ejemplo microRNA 133a y microRNA 133b) <sup>183</sup>.

-Grupo 3: En el caso de que haya 2 microRNA que se originan de los extremos opuestos de un mismo pre-microRNA (precursor), se añade el sufijo 3p o 5p (por ejemplo microRNA 221-3p y microRNA 221-5p). Normalmente el 5p suele ser el microRNA funcional pues el 3p se degrada después de su formación. A veces, ambos son funcionales <sup>184</sup>.

### **5.3 Papel de los microRNA en la ERC**

Recientes estudios han demostrado el potencial que tiene la determinación de los niveles de microRNA en orina o en plasma como biomarcadores de distintas patologías renales como por ejemplo lesiones de isquemia-reperfusión renal <sup>185</sup>, daño glomerular <sup>186</sup> o fibrosis renal <sup>187</sup>. También, se ha postulado la medida de los niveles urinarios de algunos microRNA como por ejemplo el microRNA 196a como biomarcador para predecir la progresión de la enfermedad renal crónica <sup>188</sup>. Cada vez son más los estudios que confirman un cambio en la expresión de microRNA con el progreso de la ERC <sup>189</sup>.

Hoy día no se dispone de mucha información respecto a la relación entre el fenotipo de las CMLV y los cambios de expresión de

microRNA. Recientemente se han aportado evidencias que conceden particular importancia al papel que desempeñan las variaciones de ciertos microRNAs en muchos de los procesos patológicos vasculares. Estableciendo que el remodelado vascular está acompañado de una disminución de la regulación de varias moléculas, entre ellas los microRNAs.

De esta manera, se ha puesto de manifiesto que cambios en algunos microRNAs, como por ejemplo microRNA 221 y microRNA 222 son responsables de la generación de procesos patológicos en las CMLV que se asocian con patologías como por ejemplo aterosclerosis <sup>190</sup>, CV <sup>191</sup>, disfunción endotelial <sup>192</sup> e hipertrofia cardíaca <sup>193</sup>.

Además, con respecto a otros microRNA, también relacionados con patologías vasculares, se ha demostrado que los microRNA 133, microRNA 143, microRNA 145 y microRNA 29 intervienen en el cambio de fenotipo de las CMLV <sup>194,195</sup>.

Estudios recientes han corroborado la asociación de microRNA 143 y microRNA 145 con enfermedades vasculares humanas como el aneurisma aórtico, la aterosclerosis, la reestenosis y la enfermedad arterial coronaria. De tal manera que la down-regulación de los microRNA 143 y microRNA 145 inducida por estímulos patológicos en las enfermedades vasculares facilita la desdiferenciación de las CMLV <sup>196</sup>. Este hecho indica que la modulación de la expresión de los microRNA 143 y microRNA 145 podría utilizarse potencialmente para el tratamiento de las enfermedades vasculares <sup>197</sup>.

En este sentido, se ha demostrado que el restablecimiento del microRNA 145 down-regulado es suficiente para inhibir la formación de

lesiones neointimales en arterias carótidas de ratas tras una angioplastia <sup>198</sup>.

En la última década, el microRNA 221 y su parálogo microRNA 222, el cual se ha originado por una duplicación y no comparten el último ancestro común, han adquirido relativa importancia en la vasculatura pues intervienen en las propiedades angiogénicas de las células endoteliales <sup>199</sup> y en los cambios fenotípicos de las CMLV <sup>200</sup>. El cluster microRNA 221/222 participa en la regulación de procesos vasculares fisiológicos tales como angiogénesis <sup>201</sup>, reparación del daño vascular <sup>202</sup> y envejecimiento vascular <sup>203</sup>. Además, estos microRNA están implicados en una variedad de mecanismos patológicos relacionados con la vasculatura, incluyendo inflamación aterosclerótica, CV <sup>191</sup>, hipertrofia cardíaca <sup>193</sup> y disfunción endotelial <sup>192</sup> entre otras patologías.

Debido a estas evidencias en torno a estos microRNA y al fenotipo de las CMLV, los microRNA 221 y 222 serán particularmente estudiados en esta tesis doctoral. En el DNA humano, el grupo de genes microRNA 221/222 se encuentra en el brazo corto del cromosoma X en el segmento 11.3 <sup>204</sup>. Los genes microRNA 221 y microRNA 222 están separados por una distancia de 726 pares de bases. Las secuencias nucleotídicas de ambos genes comparten una gran similitud entre sí, debido a que se trata de genes parálogos, surgidos de la duplicación del gen ancestral. Se transcriben como un único precursor de RNA no codificante largo mediante la función de RNA polimerasa II <sup>205</sup>. Posteriormente, continúan el proceso de formación hacia microRNA maduros como se ha descrito en el apartado anterior de biogénesis.

Desde el punto de vista de esta tesis doctoral resulta particularmente interesante valorar si el FGF23 de forma directa o indirecta puede conducir a la alteración de estos u otros microRNAs que promueven cambios en el fenotipo de las CMLV y si estos microRNAs se relacionan con la progresión de la enfermedad renal o con las complicaciones cardiovasculares asociadas a ella como el incremento de la rigidez arterial.



# Hipótesis



Durante las primeras etapas de la enfermedad renal crónica se observa un significativo incremento en los niveles plasmáticos de FGF23. Esta citoquina producida en el hueso está significativamente asociada a un aumento de la mortalidad cardiovascular, en parte atribuida a la hipertrofia del ventrículo izquierdo que FGF23 ejerce directamente sobre el corazón.

Cabe destacar, que los niveles de FGF23 no se pueden medir en la clínica, por lo que es interesante encontrar cuáles son los parámetros clínicos relativos a la absorción de P ingerido que están asociados al incremento de FGF23 para poder identificar así qué pacientes tienen mayor o menor riesgo de tener elevados niveles de FGF23 y disfunción vascular en forma de mayor rigidez arterial.

La hipótesis planteada en esta tesis es que los altos niveles de FGF23 podrían también ejercer efectos perjudiciales en otros elementos del sistema cardiovascular como por ejemplo las CMLV.

Hasta el momento no existen datos que describan un efecto fisiopatológico de FGF23 sobre la pared vascular, por esta razón en esta tesis se explorará si parte de la mortalidad cardiovascular asociada a altos niveles de FGF23 se debe a alteraciones vasculares.

Los estudios propuestos en esta tesis abarcan por un lado la realización de experimentos *in vitro* donde se analizarán los mecanismos y las vías de señalización a través de las cuales FGF23 promueve el cambio fenotípico de CMLV.

Por otro lado, proponemos realizar estudios *in vivo* con modelos animales en rata valorando si las modificaciones inducidas por FGF23 sobre la pared vascular repercuten sobre cambios estructurales en la pared vascular.

Finalmente, se realizará un estudio clínico en pacientes para valorar si los altos niveles de FGF23 se asocian con disfunción vascular y/o rigidez arterial. Además, se valorará una posible relación entre altos niveles de FGF23 y posibles biomarcadores relativos a la absorción de P ingerido que indique qué pacientes serán los que tienen más riesgo de rigidez arterial más elevada.

Si encontramos una relación entre altos niveles de FGF23 y daño vascular y revelamos los mecanismos a través de los cuales se desencadena este efecto, podrían identificarse posibles dianas terapéuticas sobre las que actuar para prevenir la progresión del daño vascular y los efectos negativos sobre la salud.



# Objetivos



Como objetivo general en este proyecto de tesis trataremos de dilucidar si altos niveles de FGF23 se asocian con disfunción vascular. Además, investigaremos parámetros que nos permitan conocer qué pacientes tienen mayor riesgo de tener altos niveles de FGF23 y disfunción vascular.

Los objetivos específicos de la tesis se dividen de acuerdo al tipo de estudio realizado: *In vitro*, *In vivo* o estudio clínico.

### **Estudios *In vitro***

1. Evaluar si altos niveles de FGF23 promueven un cambio de fenotipo en CMLV.
2. Dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales FGF23 promueve su acción sobre CMLV.
3. Comparar el efecto del fragmento intacto del FGF23 con el fragmento C-terminal y con FGF2 sobre el cambio fenotípico de CMLV.
4. Analizar el papel de Klotho sobre el cambio fenotípico de las CMLV en presencia de FGF23 intacto.
5. Estudiar la relación de FGF23, microRNAs y el cambio de fenotipo de CMLV.

### **Estudios *In vivo***

6. Estudiar en ratas con función renal normal una posible relación entre altos niveles de FGF23 y disfunción vascular.
7. Evaluar *ex vivo* si FGF23 promueve rigidez arterial en anillos de aorta de rata.

### **Estudio clínico en pacientes con ERC 2-3**

8. Analizar, en una cohorte de pacientes con enfermedad renal crónica en estadios 2-3 y síndrome metabólico, si los niveles de FGF23 están

asociados con cambios en parámetros hemodinámicos y de disfunción vascular.

9. Estudiar en muestras de plasma de estos pacientes cambios en la expresión de microRNA 221 y microRNA 222.

10. Proponer biomarcadores que relacionen la absorción de P ingerido en la dieta con el incremento de FGF23.



# **Material y métodos**



## **Bloque 1: Estudio *in vitro* del efecto de FGF23 recombinante sobre el fenotipo de CMLV**

### **1. Cultivo de CMLV**

Para este estudio se utilizaron CMLV humanas de aorta. Estas células se obtuvieron de un cultivo celular primario y fueron suministradas por la casa comercial Lonza, Walkersville, Inc. en EE. UU. Las CMLV estudiadas se usaron entre el segundo y quinto pase.

Para la expansión y crecimiento de las CMLV se utilizó el medio de cultivo SmBm (Smooth Muscle Basal Medium), suplementado con SmGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (Lonza, Walkersville, Inc., EE.UU) que contiene factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (hEGF), factor de crecimiento fibroblástico b humano (hFGF-b) además de gentamicina y anfotericina B como antibióticos. El medio de cultivo también fue suplementado con un 15% de suero bovino fetal (FBS) (Lonza, Walkersville, Inc., EE.UU). Para el crecimiento celular se utilizaron frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU). Después de alcanzar aproximadamente el 90% de confluencia, las células fueron subcultivadas.

#### **1.1 Subcultivo celular**

Una vez en confluencia, se procedió al subcultivo celular para lo cual se retiró el medio de cultivo y se lavó la superficie celular dos veces con suero fisiológico. Posteriormente, se añadió una solución de Tripsina/EDTA (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) que se incubó durante 5

minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió medio de cultivo con 20% de FBS 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 4°C. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo y se extrajo una alícuota para el conteo celular.

### **1.2 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). De esta mezcla se cargaron 10 microlitros en la cámara de Neubauer (Figura 12) y a continuación, se contaron en el microscopio óptico las células vivas de cada cuadrante de 1 mm<sup>2</sup>.

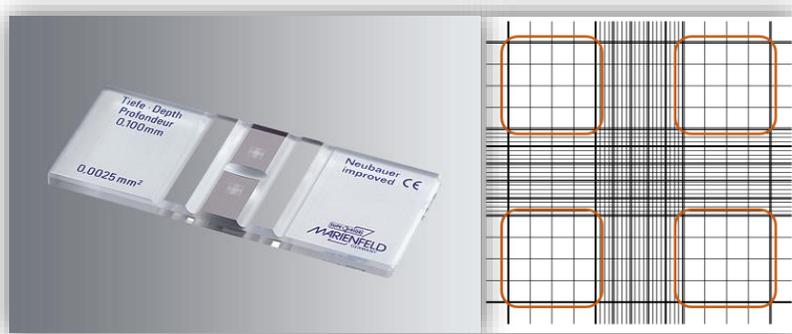
El azul tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células cuando éstas están muertas y tienen la membrana alterada. Por tanto, una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta incorporará el colorante a su citoplasma y se observará azul. De este modo y de acuerdo a la siguiente fórmula se puede determinar la viabilidad celular.

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

La cámara de Neubauer 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 microlitros con las células a contar. 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:

Media de contajes de las cuatro áreas  $\times 2 \times 10^4 \times \text{volumen} =$   
 Número total de células.



**Figura 12. Cámara de Neubauer**

Una vez contadas y lavadas las células se cultivaron en placas de 6 pocillos (Nunc, Denmark) a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> o en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup>.

El medio de cultivo usado para el crecimiento de las CMLV en placa fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich Inc, MO, EE.UU) suplementado con FBS al 20% (Hyclone), piruvato sódico (1 mmol/L), glutamina (4,5 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 mg/mL), fungizona y HEPES (20 mmol/L). En estas condiciones se dejaron crecer las CMLV en un incubador con el 5% de

CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad para su mantenimiento, crecimiento y posterior realización de los experimentos.

## **2. Diseño de experimentos y tratamientos**

Cuando las células en cultivo alcanzaron el 80-90 % de confluencia, se realizaron distintos diseños experimentales de acuerdo al objetivo concreto a desarrollar. Al igual que el crecimiento celular en placa, los distintos experimentos se realizaron con medio de cultivo DMEM conteniendo un 20% de FBS, a excepción de algunos experimentos a los que se les retiró el FBS del medio para que la composición de éste no interfiera en la señalización celular. Los distintos diseños experimentales se describen a continuación siendo el elemento principal la administración de FGF23 intacto recombinante proveniente de la compañía Amgen, Inc, EEUU con quién colaboramos. Se trata de un FGF23 recombinante 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. Aún así, en esta tesis, el efecto de este FGF23 intacto ha sido comparado con el producido por el fragmento c-terminal de FGF23 e incluso con otro FGF distinto del 23 como el FGF2.

### **2.1 Determinación de los efectos de FGF23 intacto sobre la proliferación de CMLV.**

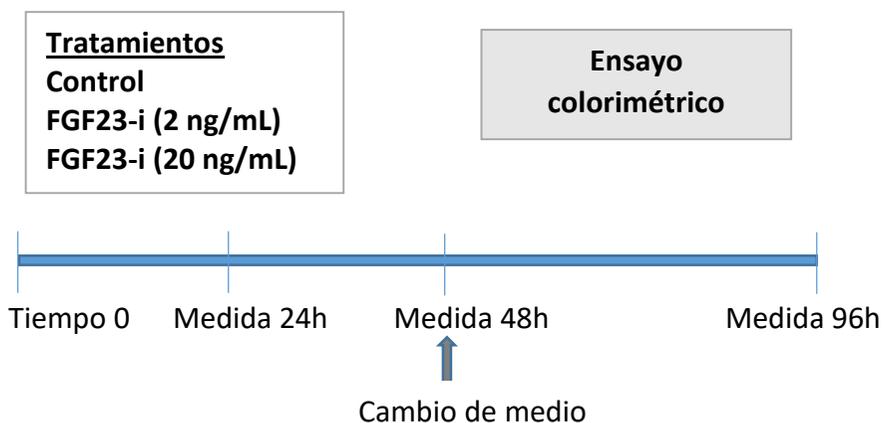
Para determinar los efectos de FGF23 intacto sobre la proliferación de CMLV se sembraron células en placas de 96 pocillos para realizar un ensayo colorimétrico dirigido a valorar el crecimiento celular. Por otro lado, se sembraron CMLV en placas de 6 pocillos para

evaluar mediante western blot la expresión de proteínas implicadas en el proceso de proliferación y división celular como ciclina D1 y PCNA.

Se estudiaron tres grupos experimentales: un grupo control y dos grupos a los que se añadió FGF23 intacto recombinante a distintas concentraciones. Una concentración final en pocillo fue de 2 ng/mL y otra de 20 ng/mL. Estas concentraciones de FGF23 son elevadas y similares a las que podrían observarse en un paciente con enfermedad renal crónica.

### 2.1.1 Ensayo colorimétrico de proliferación celular

Como se muestra en la ilustración 1, para el caso del ensayo colorimétrico, las CMLV estuvieron expuestas a estos tratamientos durante 24, 48 y 96 horas.



**Ilustración 1. Diseño experimental a 24, 48 y 96 horas para el ensayo colorimétrico de proliferación celular en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 72 en cada uno de los grupos experimentales.

El ensayo colorimétrico de proliferación celular está basado en el reactivo WST-1. Se trata de un ensayo muy simple diseñado para medir la tasa de proliferación relativa de las células en cultivo. Se

fundamenta en la conversión de la sal soluble tetrazolio en un colorante rojizo debido a la acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales. Como consecuencia de esta reacción se produce un cambio de color que es directamente proporcional a la cantidad de deshidrogenasa mitocondrial de un cultivo. Cuantas más células hay en cultivo, más deshidrogenasa disponible hay para reducir el reactivo. De esta manera se puede medir la actividad metabólica neta de las células, la cual refleja el número de células en cultivo y la capacidad proliferativa.

Después de cada tiempo de tratamiento (24, 48 y 96 h) se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche, Indianapolis, IN, USA) a cada pocillo M96. Tras una hora de incubación, la absorbancia fue medida con un espectrofotómetro (Biotek PowerWave XS, EE.UU) a 450 nm y normalizada a 675 nm.

### **2.1.2 Western blot de proteínas relativas a proliferación celular**

Para la determinación de la expresión proteica de ciclina D1 y PCNA, las CMLV fueron tratadas durante 6 horas con medio sin FBS tal y como se puede observar en la ilustración 2. A estas células se les retiró el medio con FBS el día anterior.



La fracción nuclear se obtuvo tras incubar este precipitado celular o pellet 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 µg/mL de cocktail de inhibidores de proteasas. Todos los componentes de la solución de lisis también fueron de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). 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 13000 rpm durante 5 minutos a 4º C. El sobrenadante obtenido en este caso es la fracción nuclear. Las muestras se almacenaron a -80º C hasta el momento de su uso.

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

La determinación de la concentración de proteínas de las muestras, en este caso muestras de proteína nuclear y citoplasmática, se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Este método se basa en la interacción del reactivo Bradford con las proteínas formando complejos colorimétricos relativamente estables. 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 curva estándar realizada con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina.

Para esta técnica se utilizó el reactivo denominado solución de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) siguiendo el siguiente protocolo:

Primero se elaboró una recta patrón: preparación de 8 diluciones seriadas de un estándar de proteína sérica de albúmina bovina (BSA, del

inglés bovine serum albumin, Sigma-Aldrich), cuya concentración máxima es de 25 µg/mL. El volumen final tras la preparación de los distintos puntos de la recta patrón fue de 800 µL. Después se diluyeron las muestras de la siguiente manera 50 µl de NaOH 1 N + 2 µl del extracto nuclear + 748 µl de agua destilada. Se añadieron 200 µL del reactivo Bradford a cada eppendorf, tanto de la recta patrón como de las muestras, y se mezcló vigorosamente cada uno de los eppendorf con la ayuda de un vórtex justo antes de cargar en la placa.

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 PowerWave XS, EE.UU) y se cuantificó la concentración de proteína de cada muestra. Posteriormente 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 y la concentración conocida. Dicha ecuación se usó para aplicar los datos de absorbancia de las muestras y calcular las concentraciones de éstas.

### **2.1.2.3 Técnica de western Blot**

Se trata de una técnica de inmunodetección basada en 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. Este anticuerpo secundario se puede marcar de formas muy diversas con el fin de producir una señal.

#### **2.1.2.3.1 Preparación de muestras**

Se utilizaron 20 µg de proteína nuclear, los cuales se diluyeron en agua y en buffer de carga 4X (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) hasta un volumen final de carga de 30 µL. La mezcla se incubó en un termobloque a 70° C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas.

#### **2.1.2.3.2 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE**

La separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis se llevó a cabo en un gel SDS de porcentaje variable de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). Para ello, se añadió Buffer 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 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V y 95 mA durante 1 hora aproximadamente.

#### **2.1.2.3.3 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 el material a utilizar sumergiéndolo en un Buffer 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 equilibrado sobre el dispositivo de transferencia (Transfer) en este

orden: Papel whatman absorbente, gel con las proteínas separadas en función de su peso molecular, membrana de nitrocelulosa y papel whatman absorbente. La transferencia se realizó durante 30 minutos en condiciones constantes de 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. Seguidamente, mediante lavados con Tris tampón salino con Tween-20 (TTBS, del inglés Tween Tris Buffered Saline) (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.

### **2.1.2.3.4 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 en polvo 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.

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

Tras el bloqueo, la membrana se lavó tres veces con TTBS durante 15 min y después se incubó con el anticuerpo primario específico contra las proteínas de interés y contra la proteína de

expresión constitutiva diluido en TTBS. Para la detección de la proteína constitutiva nuclear se utilizó un anticuerpo primario dirigido a la proteína TFIIB (Del inglés, transcription factor IIB). Dicha incubación duró toda la noche y se llevó a cabo en agitación suave a una temperatura de 4°C.

Los anticuerpos primarios usados para este Western Blot son los que se detallan a continuación en la Tabla 5.

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Casa comercial	Referencia
<b>PCNA (PC10)</b>	1/250 TTBS	Ratón	Santa Cruz Biotech.	sc-56
<b>Ciclina D1</b>	1/1000 TTBS + Leche 5%	Conejo	Cell signaling	#2978
<b>TFIIB</b>	1/1000 TTBS + Leche 5%	Ratón	Cell signaling	4169S

**Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados para western blot.** Se utilizaron en muestras de proteína de fracción nuclear.

Después de incubar con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TTBS durante 15 min. A continuación, para reconocer y detectar el anticuerpo primario, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios marcados enzimáticamente a temperatura ambiente durante 1 h y con agitación suave. En concreto, se utilizó anti-IgG conjugado con la enzima HRP que es una peroxidasa obtenida en rábano (HRP, del inglés, horseradish peroxidase), anti-ratón-HRP o anti-conejo-HRP dependiendo del origen del anticuerpo primario (HRP; Santa Cruz Biotechnology) diluido en la solución

bloqueante (TTBS + leche 5%) a una dilución de 1:5000. Tras la incubación, la membrana se lavó 3 veces con TTBS durante 15 minutos.

### 2.1.2.3.6 Revelado

Se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con HRP para hacer visible las proteínas reconocidas por los anticuerpos primarios. La enzima HRP cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciendo así una reacción quimioluminiscente susceptible de ser cuantificada.

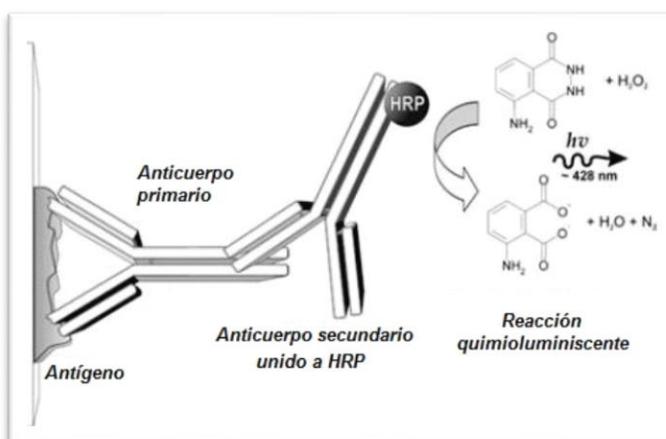


Figura 13. Representación esquematizada de la inmunodetección indirecta de un antígeno y revelado mediante peroxidasa de rábano. Imagen obtenida de Bio-Rad.

Dependiendo del anticuerpo primario utilizado, la proteína inmunomarcada se detecta posteriormente mediante el uso del reactivo ECL plus (Amersham Bioscience, NJ, EE.UU) con el cual se incubaron las membranas sobre un cristal durante 5 minutos a temperatura ambiente o el reactivo ECL Advance. Para la visualización de las bandas se usó el documentador de geles LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia).

Los niveles de las proteínas analizadas se cuantificaron usando el programa de análisis de imágenes ImageJ versión 1.44 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Los resultados se expresaron en términos de densidad óptica (DO) 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.

### **2.2 Estudio del papel de FGF23 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV de contráctil a sintético**

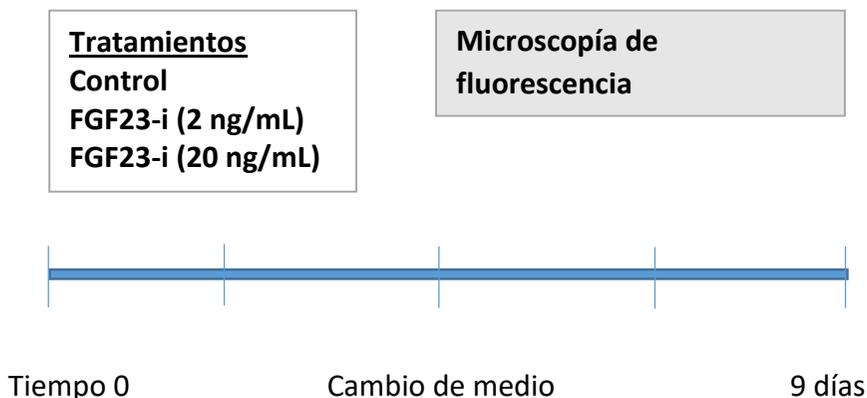
Para estudiar el posible cambio inducido por FGF23 sobre la morfología de las CMLV, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos. Se estudió, en primer lugar, la expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA mediante un marcaje inmunofluorescente. En segundo lugar, se estudió la expresión génica de los principales marcadores de fenotipo contráctil, como elastina y MHC. Finalmente, se hizo un estudio de la expresión proteica de elastina, característica de fenotipo contráctil.

Se estudiaron tres grupos experimentales: un grupo control y dos grupos a los que se añadió FGF23 intacto recombinante a distintas concentraciones. Una concentración final en pocillo de 2 ng/mL y otra de 20 ng/mL.

#### **2.2.1 Microscopía de fluorescencia**

Las CMLV se cultivaron en placas de 6 pocillos sobre un cubre esterilizado situado en cada uno de los pocillos. Para el estudio morfológico y de expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA se realizó un marcaje inmunofluorescente mediante microscopía de fluorescencia. Como se

muestra en la ilustración 3, las CMLV estuvieron expuestas a los tratamientos durante 9 días.



**Ilustración 3. Diseño experimental a 9 días para la detección de la proteína  $\alpha$ -SMA mediante microscopía de fluorescencia en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 3 en cada uno de los grupos experimentales.

Transcurrido el tiempo del experimento, se retiró el medio de cultivo y las CMLV se lavaron 3 veces a temperatura ambiente con una solución salina tamponada de fosfato (PBS, del inglés, phosphate buffered saline) durante 5 minutos por cada lavado. Tras esto, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol (Merck, Madrid, España). Primero incubando con metanol frío al 50% en agua durante 2 minutos y a temperatura ambiente, luego con metanol frío al 100% durante 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y por último con metanol frío al 50% en agua durante 2 minutos. Al finalizar, se lavaron 3 veces durante 5 minutos con abundante volumen de PBS para retirar cualquier resto de metanol. A continuación, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo primario indicado en la Tabla 6.

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Casa comercial	Referencia
$\alpha$ -actina de músculo liso [1A4] (FITC)	1/100 PBS+BSA 1%	Ac conjugado con FITC	GeneTex	GTX72531

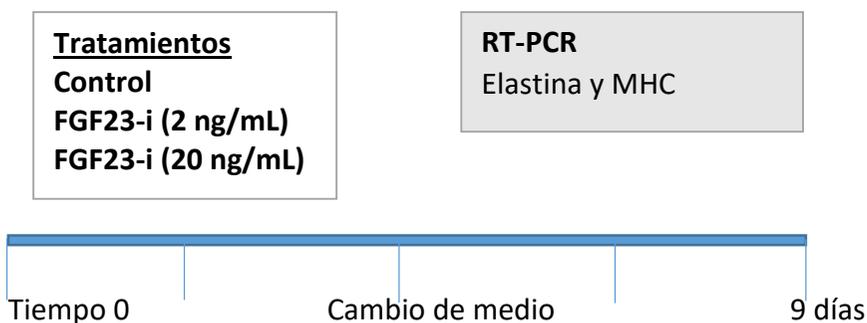
**Tabla 6. Anticuerpo utilizado para microscopía de fluorescencia.**

Después del tiempo de incubación, y en las mismas condiciones de oscuridad hasta el final del protocolo, las células se lavaron 3 veces cada 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a teñir los núcleos con DAPI (4'6' diamidino 2 fenilindol) (Invitrogen, California, USA) durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de proceder al montaje. Para el montaje, se colocó una gota de medio de montaje Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc) sobre el porta. Sobre esta gota se dispuso el cubre con las células hacia abajo con ayuda de unas pinzas de extremo fino. Las muestras se guardaron en frío y en oscuridad hasta ser observadas en el microscopio confocal LSM5 Exciter Zeiss. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

También, se realizó un estudio morfológico de las células con el software Image J. En este estudio se evaluó el ratio longitud/anchura del citoplasma, tanto de las células control como las tratadas con FGF23 a 2 y 20 ng/ml. La proporción longitud/anchura del núcleo de estas mismas células también fue evaluada.

### 2.2.2 RT-PCR

Las CMLV se cultivaron en placas de 6 pocillos para estudiar la expresión génica de los principales genes de fenotipo contráctil tales como, elastina y MHC. Como se puede ver en la ilustración 4, las CMLV estuvieron expuestas a los tratamientos durante 9 días.



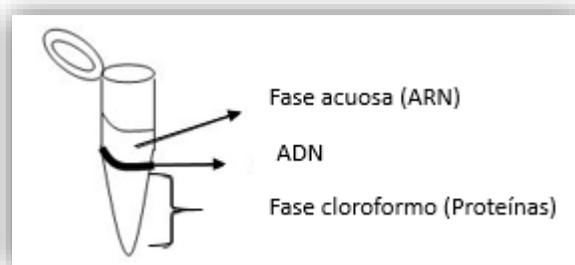
**Ilustración 4.** Diseño experimental de 9 días para la determinación de la expresión génica de elastina y MHC en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante. Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 30 en cada uno de los grupos experimentales.

#### 2.2.2.1 Recogida de muestras de cultivo de CMLV

Finalizado el experimento 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 levantar las células de la superficie de la placa y lisarlas. Esta lisis celular se produjo en frío y seguidamente, las células fueron resuspendidas con una pipeta y la suspensión celular transferida a un eppendorf. Las muestras se sometieron a una agitación vigorosa mediante vórtex durante 10-15 segundos y posteriormente se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 2.2.2.2 Extracción de RNA

Las muestras de trizol se descongelaron a temperatura ambiente durante unos minutos para facilitar la disociación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Tras este tiempo se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo por muestra y se agitó vigorosamente mediante vortex. Después se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 15 minutos y a 4°C, y a continuación se recogió la fase superior acuosa de cada una de las muestras, en la cual permanece el RNA.



**Figura 14. Separación de fases tras la centrifugación con cloroformo.**

Para precipitar el RNA 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 mediante vórtex. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para eliminar los restos de isopropanol y conseguir mayor pureza del RNA extraído, el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Por último, se retiraron los sobrenadantes y el precipitado se dejó secar durante 30 minutos aproximadamente a temperatura ambiente para eliminar los posibles restos de etanol. El precipitado se diluyó en 50  $\mu$ l de agua

estéril libre de RNAsas y se calentó en un termobloque a 55°C durante 5 minutos.

### **2.2.2.3 Cuantificación de RNA**

El RNA de las muestras fue cuantificado mediante la medida de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU). Las unidades de concentración de RNA determinadas estuvieron en el rango de ng/ $\mu$ l.

### **2.2.2.4 Tratamiento con DNAsa**

Para eliminar la posible contaminación con DNA genómico, el RNA total extraído con Trizol fue sometido a un tratamiento con DNAsas, enzimas que digieren fragmentos de DNA. Para ello se utilizó un kit comercial de Sigma-Aldrich (Referencia AMPD1, St. Louis, Missouri, USA).

El protocolo empleado fue el siguiente:

Se trató 1  $\mu$ g de RNA con 1  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 1  $\mu$ l de DNAsa y agua libre de RNAsas y DNAsas hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ l. Esta mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió a la reacción 1  $\mu$ l de solución de stop para parar la reacción y se incubó durante 10 minutos a 70° C en un termobloque.

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

La RT-PCR (del inglés, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), es una técnica utilizada para determinar la expresión de genes de interés. Dicha técnica permite la amplificación específica de

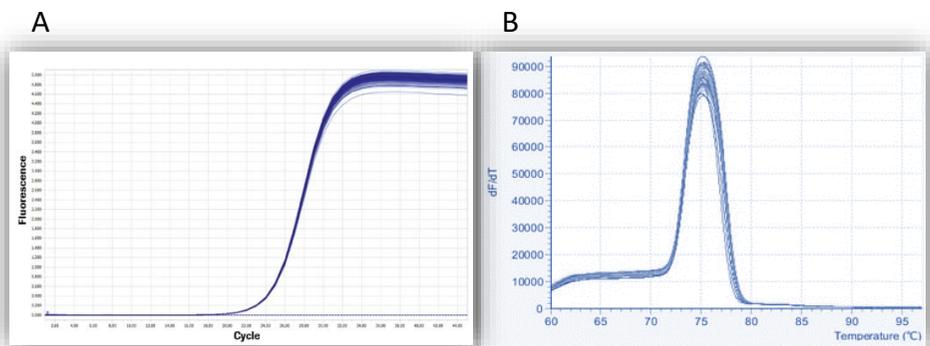
una pequeña cantidad de moléculas de mRNA, primero mediante una retro transcripción (RT) del RNA, produciendo DNA copia (cDNA), y posteriormente amplificando dicho cDNA en sucesivos ciclos de PCR. De esta manera, la RT-PCR es una técnica muy sensible, que requiere poca cantidad de RNA.

Para realizar la RT-PCR en tiempo real utilizamos el sistema Lightcycler<sup>®</sup> 480 de Roche (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, IN, EE.UU), que posibilita estudiar la expresión génica de determinados genes, como se ha indicado anteriormente, además de identificar los productos por su temperatura de fusión en el mismo tubo de reacción. Esta técnica está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de incorporación de fluorocromos (en nuestro caso Sybr-Green I) en el fragmento amplificado por cebadores específicos que permiten cuantificar de forma relativa el grado de expresión del gen diana. De esta manera, el *SYBR Green I*, que se une preferentemente a DNA de doble cadena recién sintetizado, induce la emisión de una fluorescencia proporcional a la concentración de DNA sintetizado. La señal aparece a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida de las muestras y de la eficiencia de los cebadores.

La temperatura de fusión ( $T_m$ , o temperatura de melting) de un fragmento específico corresponde aproximadamente a la mínima temperatura a la cual el producto sintetizado por PCR se separa en dos hebras de DNA monocatenario, y dicha temperatura va a depender de la longitud del fragmento y su contenido en G+C (guanina+citosina), de manera que se obtienen curvas específicas para cada tipo de mRNA analizado. Cuando se utiliza el SYBR Green I se puede confirmar la

amplificación de la diana específica a través de este análisis. Así, unos fragmentos pueden distinguirse de otros a partir de sus distintas  $T_m$ . La derivada de la curva de fusión nos revela un pico máximo correspondiente a la  $T_m$  del producto. El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto.

Las diferencias entre las distintas muestras en el número de copias de los genes de estudio se determinaron a través del ciclo umbral (Ct), que representa el ciclo de la PCR al cual la fluorescencia supera un valor umbral, experimentando un cambio significativo. El valor de Ct establecido corresponde siempre a un valor encuadrado en la fase exponencial de la curva de fluorescencia, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.



**Figura 15. Representación gráfica del valor de Ct y de la temperatura de fusión  $T_m$ .** A) Valor de Ct que representa el ciclo de la PCR al cual la fluorescencia supera un valor umbral experimentando un cambio significativo. B) Temperatura de fusión ( $T_m$ ) que representa la mínima temperatura a la cual el producto sintetizado por PCR se separa en dos hebras de DNA monocatenario. Esta temperatura es específica de cada producto amplificado.

Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos de los distintos genes se elige como referencia un transcrito cuya expresión no se vea modificada a pesar de los distintos tratamientos a los que se

someten las muestras, normalmente un gen constitutivo o housekeeping. Al comparar los valores de Ct del gen de referencia con los del gen problema en los distintos tratamientos experimentales, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema. En nuestro 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 enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH como gen control constitutivo.

La RT-PCR se llevó a cabo en un solo paso usando el kit SensiFAST Sybr No-ROX (Bioline). La mezcla de reacción contenía 5  $\mu$ l de SYBR Green, 0.1  $\mu$ l de enzima retrotranscriptasa, 0,2  $\mu$ l de inhibidores, 50 ng de muestra de RNA total en 1  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ M de cebador en 0.5  $\mu$ l y 3,2  $\mu$ l de agua estéril, sumando un total de 10  $\mu$ l como volumen final de reacción. Para la síntesis del cDNA se hizo primero una incubación a 45°C durante 10 min y después se desnaturalizó a 95°C durante 2 min para separar ambas moléculas (cDNA y RNA). La amplificación se llevó a cabo durante 50 ciclos, y en cada ciclo se llevaba a cabo un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, un anillamiento de 10 segundos a 60°C y un paso de extensión a 72°C durante 5 segundos. La detección de la fluorescencia del producto se realizó al final de cada ciclo de extensión a 72°C.

La cuantificación de la expresión relativa se determinó por la fórmula  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  descrita por Livak y Schmittgen en 2001<sup>206</sup>. Como se ha indicado los cálculos se normalizaron con los datos de Ct del gen GAPDH que posee una expresión constitutiva y no inducible.

La secuencia de los cebadores utilizados en la RT-PCR para estudiar el cambio de fenotipo inducido por FGF23 mediante el estudio

de los principales marcadores contráctiles de las CMLV se muestra en la Tabla 7.

Gen	Forward	Reverse
<b>Elastina</b>	5'-GCTCTGCACCTGTTCTC-3'	5'-CTGCGTCTCCACACCAC-3'
<b>MHC</b>	5'-CGAGCTCTCCGTCATCTTG-3'	5'-GCTGAATGACAACGTGACTTC-3'
<b>GAPDH</b>	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA G-3'	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'

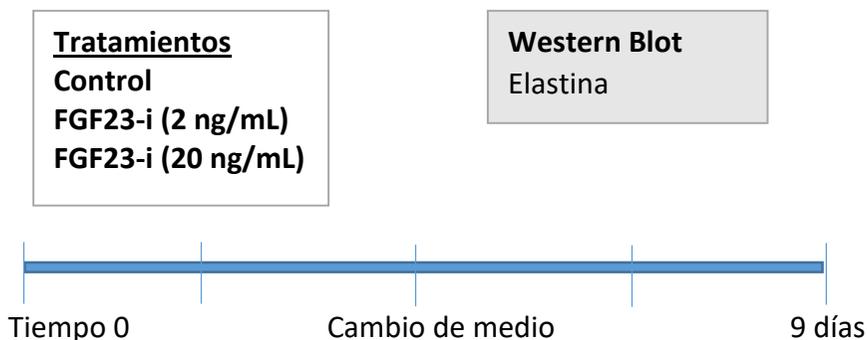
**Tabla 7. Secuencia de cebadores utilizados para estudiar la expresión de genes contráctiles en CMLV mediante RT-PCR.**

Para confirmar que el producto obtenido en la PCR es el resultado específico de los cebadores 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 bajo un potencial eléctrico de 90-110 v. El resultado se visualizó y fotografió en un documentador de geles tipo ChemiDoc XRS de Bio-Rad.

### 2.2.3 Western blot

Para valorar el cambio de fenotipo de las CMLV inducido por FGF23 también se cultivaron CMLV en placas de 6 pocillos para determinar los cambios en la proteína elastina, específica de fenotipo contráctil.

Para ello, las células estuvieron expuestas a los tratamientos durante 9 días como se aprecia en la ilustración 5.



**Ilustración 5. Diseño experimental de 9 días para la determinación de la expresión proteica de elastina en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 18 en cada uno de los grupos experimentales.

Tras finalizar el periodo de tratamiento, las células fueron lisadas para extraer la proteína citoplasmática y nuclear como se ha descrito en el apartado 2.1.2.1.

En este caso, para evaluar la expresión proteica de los principales marcadores de fenotipo contráctil (elastina) se utilizó la fracción citoplasmática la cual fue también cuantificada por el método de Bradford tal como se describe en el apartado 2.1.2.2.

Para el western blot de elastina se cargaron 60  $\mu\text{g}$  de proteína citoplasmática tal y como se expuso en el apartado 2.1.2.3. Para la detección de la proteína constitutiva citoplasmática que actuó como control de carga se utilizó Tubulina.

Los anticuerpos primarios utilizados para este Western Blot son los que se detallan en la Tabla 8.

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Casa comercial	Referencia
Elastina	1/100 TTBS+Leche 5%	Conejo	GenTex	GTX37428
Tubulina	1/5000 TTBS+Leche 5%	Ratón	Abcam	ab7291

**Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para western blot.** Se utilizaron en muestras de proteína de fracción citoplasmática.

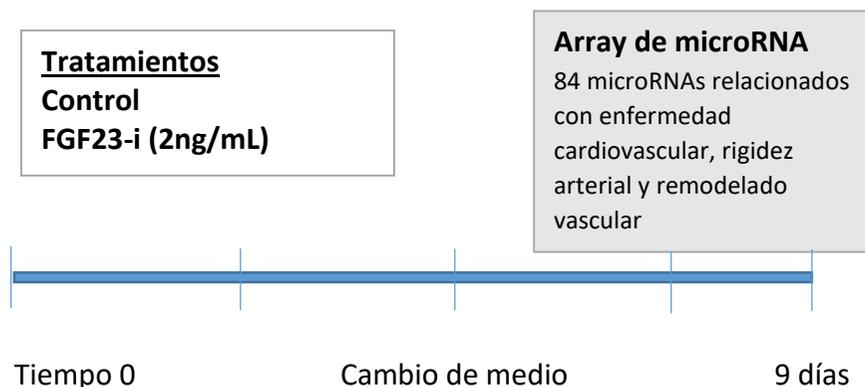
### 2.3 Estudio del papel de FGF23 sobre cambios en el perfil de microRNA relacionados con patologías vasculares

Uno de los objetivos de esta tesis es identificar si el exceso de FGF23 ejerce cambios significativos sobre la expresión de microRNAs relacionados con disfunción vascular y en especial con el incremento de la rigidez arterial y cambios en el remodelado vascular. Para ello en primer lugar, se evaluó el perfil de 84 microRNAs implicados en la generación de patologías cardiovasculares mediante un Array de expresión de microRNAs. En segundo lugar, como consecuencia del resultado del Array, se estudió la expresión de los genes relacionados con la biogénesis de microRNA mediante RT-PCR. Finalmente, se validó el Array estudiando la expresión de los microRNA 221, 222, 26a y 145 mediante RT-PCR.

Se estudiaron dos grupos experimentales: un grupo control y un grupo al que se añadió FGF23 intacto recombinante a una concentración final en pocillo de 2 ng/mL durante 9 días.

### 2.3.1 Evaluación de cambios en el perfil de microRNA

Como se puede ver en la ilustración 6, las CMLV fueron expuestas a los tratamientos durante 9 días.



**Ilustración 6.** Diseño experimental a 9 días para el análisis de un perfil de microRNA relacionados con enfermedad cardiovascular, rigidez arterial y remodelado vascular en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.

#### 2.3.1.1 Extracción de microRNA a partir de RNA Total

Después de los 9 días de tratamiento, las CMLV se lisaron con Trizol (Sigma-Aldrich), se extrajo el RNA y se cuantificó tal y como se indicó en el apartado 2.2.2. Para la obtención de las muestras de microRNA a partir de RNA total se usó el kit Universal RT microRNA PCR cDNA (EXIQON). Para ello, la mezcla de reacción contenía 2  $\mu$ L de buffer de reacción (5X), 5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 1  $\mu$ L de enzima transcriptasa y 2  $\mu$ L de muestra con 10 ng/ $\mu$ L RNA. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto y luego estuvieron 60 minutos a 42  $^{\circ}$ C y por último 5 minutos a 95  $^{\circ}$ C para inactivar la enzima retrotranscriptasa por calor.

Una vez obtenido el cDNA, éste se diluyó 40 veces y se utilizó para la medición de los microRNAs presentes en el Array.

### **2.3.1.2 Ensayo Array de microRNA**

El Array utilizado fue el miScript miRNA PCR Array Human Cardiovascular disease de Qiagen. Esta matriz perfila la expresión de 84 microRNAs conocidos por mostrar una expresión alterada durante la enfermedad cardiovascular, permitiendo la evaluación de los microRNA más relevantes para la enfermedad cardíaca, algunos de ellos involucrados con la rigidez arterial y el remodelado vascular.

Para ello se utilizaron dos placas de Array de 96 pocillos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ambas placas incluían 12 pocillos con microRNA de control interno (entre ellos el microRNA U6) y 84 pocillos con diferentes microRNA relacionados con la enfermedad cardiovascular (84 microRNA), como se puede observar en la Tabla 9.

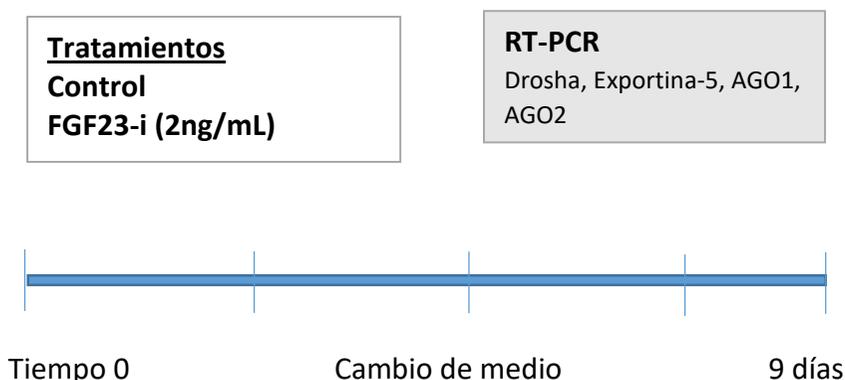
La muestra de RNA que se añadió a cada pocillo de cada una de las placas del Array fue un pool de 5 muestras de microRNA procedentes de 5 cultivos diferentes, con la diferencia de que a una placa se le añadió un pool de microRNA extraído de células control y a otra placa se añadió un pool de microRNA extraído de células tratadas con FGF23 recombinante (2 ng/mL). El contenido de RNA de cada una de las muestras procedentes de cada cultivo fue el mismo. De manera que se mezclaron 50 ng de RNA de cada muestra de los que 200 fueron utilizados para la realización del array de expresión siguiendo las instrucciones del fabricante.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	let-7a-5p	let-7b-5p	let-7c-5p	let-7d-5p	let-7e-5p	let-7f-5p	miR-1-3p	miR-100-5p	miR-103a-3p	miR-107	miR-10b-5p	miR-122-5p
B	miR-124-3p	miR-125a-5p	miR-125b-5p	miR-126-3p	miR-130a-3p	miR-133a-3p	miR-133b	miR-140-5p	miR-142-3p	miR-143-3p	miR-144-3p	miR-145-5p
C	miR-146a-5p	miR-149-5p	miR-150-5p	miR-155-5p	miR-15b-5p	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-181a-5p	miR-181b-5p	miR-182-5p	miR-183-5p	miR-185-5p
D	miR-18b-5p	miR-195-5p	miR-199a-5p	miR-206	miR-208a-3p	miR-208b-3p	miR-21-5p	miR-210-3p	miR-214-3p	miR-22-3p	miR-221-3p	miR-222-3p
E	miR-223-3p	miR-224-5p	miR-23a-3p	miR-23b-3p	miR-24-3p	miR-25-3p	miR-26a-5p	miR-26b-5p	miR-27a-3p	miR-27b-3p	miR-29a-3p	miR-29b-3p
F	miR-29c-3p	miR-302a-3p	miR-302b-3p	miR-30a-5p	miR-30c-5p	miR-30d-5p	miR-30e-5p	miR-31-5p	miR-320a	miR-328-3p	miR-342-3p	miR-365b-3p
G	miR-378a-3p	miR-423-3p	miR-424-5p	miR-451a	miR-486-5p	miR-494-3p	miR-499a-5p	miR-7-5p	miR-92a-3p	miR-93-5p	miR-98-5p	miR-99a-5p
H	Control 01	Control 02	Control 03	Control 04	Control 05	Control 06	Control 07	miR-U6 Control 08	Control 09	Control 10	Control 11	Control 12

**Tabla 9. Array utilizado con 84 microRNAs conocidos por mostrar una expresión alterada durante la enfermedad cardiovascular.** Se utilizaron 200 ng de RNA de CMLV control y tratadas con FGF23 recombinante (2 ng/mL).

### 2.3.2 Expresión de genes relacionados con la biogénesis de microRNA

Para evaluar la expresión de genes específicos relacionados con la biogénesis de microRNA, como Drosha, Exportina 5, Argonauta 1 (AGO1) y Argonauta 2 (AGO2), se cultivaron CMLV en placas de 6 pocillos. Como se puede ver en la ilustración 7, las CMLV fueron expuestas a los tratamientos durante 9 días.



**Ilustración 7. Diseño experimental a 9 días para el análisis de la expresión de genes relacionados con la biogénesis de microRNA, como son Drosha, Exportina-5, AGO1 y AGO2, en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.**

La muestra de RNA que se utilizó para evaluar la expresión de estos genes fue procedente de 5 cultivos diferentes. El RNA se extrajo como se indica en el apartado 2.2.2, realizándose una RT-PCR como se indica en el mismo apartado.

Como gen constitutivo se utilizó GAPDH, cuya secuencia se puede ver en la Tabla 7. Las secuencias de los cebadores utilizados en la RT-PCR para estudiar la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de microRNA se muestra a continuación en la Tabla 10.

Gen	Forward	Reverse
Human AGO1	5-GCGTAGCCATTCCAAGA-3'	5-GCAGCTCATTATTGTCATCCT-3'
Human AGO2	5-ACCTGAAGATGCGATCCTTG-3'	5'-AGAATCTATACACAGCCATGCC-3'
Human Exportin 5	5'-TGGCCACAGAGGTCACCCCC-3'	5'-GGGGCGCAGTGCCTCGTAT-3'
Human Drosha	5-ÁCCGTTACTTCTCGTCTCATTG-3'	5'-GCCACCTCCTAGCAAATAGTC-3'

Tabla 10. Secuencia de cebadores utilizados para estudiar la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de microRNA mediante RT-PCR.

### 2.3.3 Validación del ensayo Array de microRNA

Para validar los datos del Array de microRNA se evaluó la expresión de algunos de los principales microRNAs relacionados con disfunción vascular y en especial rigidez arterial como microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y microRNA 145. Como se puede ver en la ilustración 8, las CMLV fueron expuestas a los tratamientos durante 9 días.

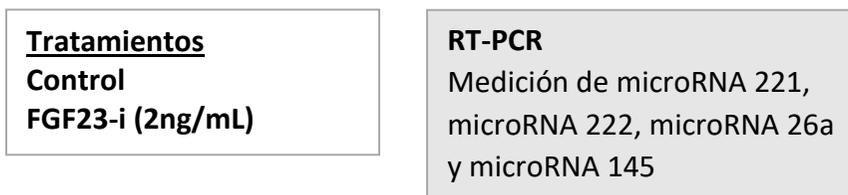


Ilustración 8. Diseño experimental a 9 días para el análisis de la expresión de microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y microRNA 145 en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.

Tras 9 días de tratamiento, las CMLV se lisaron con Trizol (Sigma-Aldrich), se extrajo y cuantificó el RNA tal y como se indicó en el apartado 2.2.2. Para la obtención de las muestras de microRNA a partir de RNA total se procedió tal y como se indica en el apartado 2.3.1.1.

La expresión de los microRNA anteriormente citados fueron validados en muestras Control y tratadas con FGF23 procedentes de cinco cultivos celulares independientes.

Una vez obtenido el cDNA y diluído 40 veces, se procedió a la medición específica de los microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y microRNA 145 mediante una RT-PCR utilizando Sybergreen GoTaq qPCR Master Mix de Promega. En cada reacción se utilizaron 5 µL de Sybergreen, 1 µL de cebador y 4 µL de la muestra de ADNc diluido. Las muestras se sometieron a 40 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C cada uno. El método  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  se utilizó para calcular la abundancia relativa de microRNAs en comparación con la expresión del gen constitutivo microRNA U6.

La secuencia de los microRNA validados se muestra en la Tabla 11. Todos ellos fueron adquiridos de la casa comercial EXIQON.

microRNA	Secuencia
hsa-microRNA 221-3p	5'-AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC-3'
hsa-microRNA 222-3p	5'-AGCUACAUCUGGCUACUGGGU-3'
hsa-microRNA 26a-5p	5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
hsa-microRNA 145-5p	5'-GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU3-'
hsa-microRNA U6	5'-CACGAATTTGCGTGTCATCCTT-3'

**Tabla 11. Secuencia de cebadores para los microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y microRNA 145, incluida la secuencia del cebador para microRNA U6.**

## **2.4 Determinación de la señalización inducida por FGF23 en CMLV**

Para determinar la señalización que promueve el exceso de FGF23 intacto en las CMLV, se procedió a su cultivo en placas de 6 pocillos con los siguientes grupos experimentales:

Un grupo control, otro con FGF23 intacto recombinante a una concentración final en pocillo de 2 ng/mL y otros dos grupos con FGF23 a la misma concentración (2 ng/mL) más un inhibidor distinto en cada caso; por un lado AZD4547 (150 nM), inhibidor selectivo del receptor FGF (FGFR) específico para FGFR1/2/3 (Selleckchem) y otro grupo con FGF23 y PD98059 (10  $\mu$ M) (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA), un inhibidor específico de la ruta MEK/ERK.

En primer lugar, para los estudios de señalización celular inducida por FGF23, se estudió la expresión proteica del receptor FGFR1 y del intermediario ERK1/2 en presencia de los inhibidores comentados anteriormente. Posteriormente, también se estudió la expresión génica de los marcadores de fenotipo contráctil en presencia de ambos inhibidores. Finalmente, se estudió también la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222 en presencia de los inhibidores estudiados.

### **2.4.1 Western blot en experimentos con inhibidores**

Para los estudios de señalización celular sobre FGFR1 y ERK1/2 las CMLV fueron expuestas a los tratamientos durante 6 horas como se puede ver en la ilustración 9. Los tratamientos se añadieron con medio



trasladó a un eppendorf, se agitó la muestra de forma vigorosa con la ayuda de un vórtex y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4º C. El sobrenadante obtenido es la proteína total. Las muestras se almacenaron a -80º C hasta el momento de su uso.

La proteína total se cuantificó mediante el método Bradford (ver apartado 2.1.2.2). Utilizándose también 2 µL de muestra. Para llevar a cabo la técnica western blot como se ha descrito en el apartado 2.1.2.3 se cargaron 60 µg de proteína y para la cuantificación relativa se utilizó Tubulina como proteína constitutiva.

Los anticuerpos primarios, referencia y dilución usados para el análisis por western Blot de esta sección se muestran en la Tabla 12.

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Casa comercial	Referencia
<b>FGFR1p</b>	1/200 TTBS	Conejo	Invitrogen	44-1140G
<b>FGFR1 total</b>	1/200 TTBS	Conejo	Sigma Aldrich	SAB4300488
<b>ERK 1/2p</b>	1/2000 TTBS+BSA 5%	Conejo	Cell signaling	#4370S
<b>ERK 1/2 total</b>	1/1000 TTBS+BSA 5%	Conejo	Cell signaling	#4695S
<b>Tubulina</b>	1/5000 TTBS+Leche 5%	Ratón	Abcam	ab7291

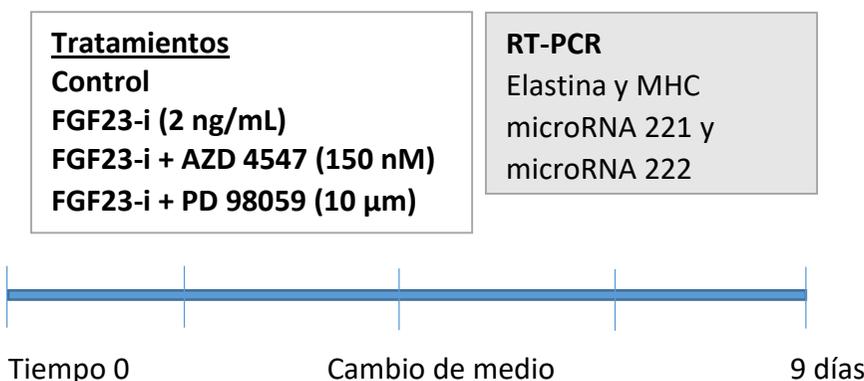
**Tabla 12. Anticuerpos primarios utilizados para western blot.** Se utilizaron en muestras de proteína total.

Hay que destacar una diferencia en el paso de bloqueo de la membrana con respecto al protocolo descrito en el apartado 2.1.2.3.4. En este caso, para estudiar la expresión de la proteína ERK1/2 tanto en su forma fosforilada como no fosforilada, la membrana no se bloqueó con leche sino con TTBS + BSA al 5%. En consecuencia, el anticuerpo

secundario utilizado para ambos casos estaba diluido también en TTBS + BSA 5%, al igual que la solución bloqueante utilizada.

#### 2.4.2 RT-PCR en experimentos con inhibidores

Para la evaluación de los cambios en la expresión génica de los principales marcadores de fenotipo contráctil en presencia de los inhibidores estudiados, las CMLV fueron tratadas durante 9 días como se puede ver en la ilustración 10. Los tratamientos se añadieron con medio DMEM con FBS al 20%. Al igual que en el estudio relativo a la expresión proteica para asegurar el efecto de los inhibidores de FGFR y p-ERK se procedió a administrarlos 30 minutos antes de la posterior adición de FGF23 recombinante.



**Ilustración 10. Diseño experimental a 9 días para la determinación de la expresión de elastina y MHC en presencia de los inhibidores de FGFR1 y ERK en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 15 en cada uno de los grupos experimentales.

Tras finalizar el experimento se procedió al lisado celular para la obtención de RNA y posterior estudio de la expresión génica de los principales marcadores de fenotipo contráctil de las CMLV (elastina y MHC) como se indica en el apartado 2.2.2. La secuencia de los

cebadores utilizados para el estudio de la expresión génica de los marcadores de fenotipo contráctil se muestra en la Tabla 7.

Por último, para evaluar la expresión de los microRNA en presencia de los inhibidores estudiados, las CMLV fueron tratadas durante 9 días como se puede ver, también, en la ilustración 10. Para la obtención de las muestras de microRNA a partir de RNA total se procedió tal y como se indica en el apartado 2.3.1.1. Y una vez obtenido el cDNA diluido 40 veces, el protocolo continuó como se indica en el apartado 2.3.3. La secuencia de los cebadores de los microRNA 221 y microRNA 222 puede consultarse en la Tabla 11.

### **2.5 Papel de la modulación de los microRNA 221 y microRNA 222 sobre el fenotipo de las CMLV tratadas con FGF23**

Del conjunto de microRNAs que mostraron una menor expresión tras el tratamiento con FGF23 recombinante durante 9 días y en base a la bibliografía se obtiene que los microRNAs 221 y 222 podrían ser de especial relevancia en el control del remodelado vascular y el fenotipo de las CMLV<sup>207, 190</sup>. Por esta razón y para evaluar de forma específica el efecto de FGF23 mediado por los microRNAs 221 y 222 se procederá a realizar experimentos en los que se transfectarán mimic 221 y 222 para evaluar el efecto sobre el cambio de fenotipo de las CMLV.

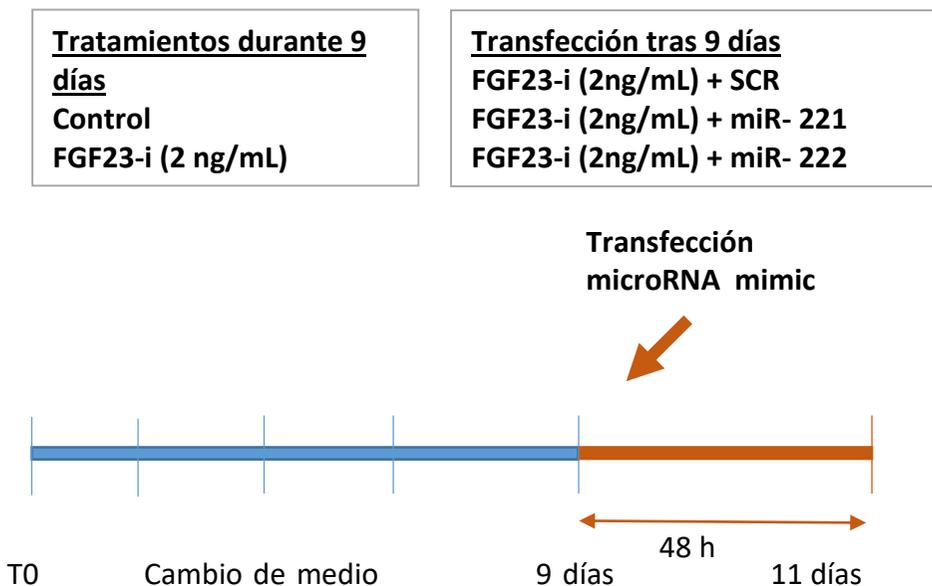
#### **2.5.1 Transfección de mimics microRNA 221 y 222**

Para determinar si la sobreexpresión de los microRNA 221 y microRNA 222 interfieren en la transdiferenciación de las CMLV hacia el fenotipo sintético se realizó la transfección de mimic microRNA

específicos de microRNA 221 y microRNA 222. Con esto conseguimos incrementar excesivamente los niveles de estos microRNAs.

Como se puede ver en la ilustración 11, las células estuvieron en presencia de FGF23 (2 ng/mL) durante 9 días con medio DMEM al 20% FBS. El día noveno de tratamiento se hizo la transfección de los mimic microRNA y las células estuvieron 48 horas transfectadas con el mimic microRNA transfectado 221 ó 222 (100 nM) en presencia de FGF23 (2 ng/mL). También se transfectó un Scramble (SCR) como control de la transfección. Los mimic microRNA que se transfirieron fueron hsa-microRNA 221-3p (Ref: MC10337), hsa-microRNA 222-3p (Ref: MC11376) y control negativo (Ref: 4464058).

El medio de transfección es un medio específico, llamado Optimem el cual no lleva antibióticos (Life Technologies, Madrid, España).



**Ilustración 11.** Diseño experimental a 11 días para estudiar los cambios en la expresión génica de elastina y MHC después de transfectar las CMLV con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 junto con la adición de FGF23 intacto

**recombinante en las últimas 48 horas del experimento.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 3 en cada uno de los grupos experimentales.

Transcurridos los primeros 9 días de tratamiento, se procedió a transfectar las CMLV. Para cada transfección (microRNA 221 y microRNA 222) se prepararon dos soluciones por separado y posteriormente fueron añadidas a cada pocillo a transfectar.

Primero, para cada transfección, se prepararon 2,5  $\mu$ L (50  $\mu$ M) del microRNA a transfectar (mimic microRNA 221 ó mimic microRNA 222) (Ambion) y 62,5  $\mu$ L de medio Opti-MEM, específico para la transfección (Solución 1). Se mezcló vigorosamente con un spin final y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se prepararon 4  $\mu$ L del agente de transfección siPORT NeoFX (Life Technologies, Madrid, Spain) más 58,5  $\mu$ L de medio Opti-MEM para cada transfección (Solución 2). Posteriormente se unieron las dos soluciones y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, la solución final se vorteo seguido de un spin. La preparación de la transfección se completó con medio Opti-MEM más FGF23 (2ng/ml). Finalmente se añadió a cada pocillo la solución de transfección y se cultivaron las CMLV en estas condiciones durante 48 horas.

### **2.5.2 Evaluación de la efectividad de la transfección de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 por RT-PCR**

Tras finalizar las 48 horas de la transfección de ambos tipos de mimic microRNA (Ilustración 11), se procedió al lisado celular para la obtención de RNA, como se indica en el apartado 2.2.2. En primer lugar, se comprobó que la transfección había ido correctamente y para ello se

midieron los microRNA tal y como se indica en el apartado 2.3.3. La secuencia de los cebadores de los microRNA 221 y microRNA 222 utilizados fue la mostrada en la Tabla 11.

### 2.5.3 Efecto de FGF23 sobre la expresión de MAP3K2: Papel de los microRNA 221 y 222

Según bases de datos como TargetScan o mirDB, uno de los targets de los microRNA 221 y 222 es la proteína Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2, conocida como MAP3K2 o MEKK2. Por lo tanto, altos niveles de estos microRNAs se corresponderán con una inhibición de la expresión de MAP3K2 y viceversa.

#### 2.5.3.1 RT-PCR para evaluar la expresión génica de MAP3K2 en presencia de los microRNA 221 y microRNA 222

En primer lugar, se evaluó la expresión génica de MAP3K2 en células tratadas con FGF23 recombinante (2 ng/mL) durante 9 días sin transfectar, como se puede observar en la ilustración 12.

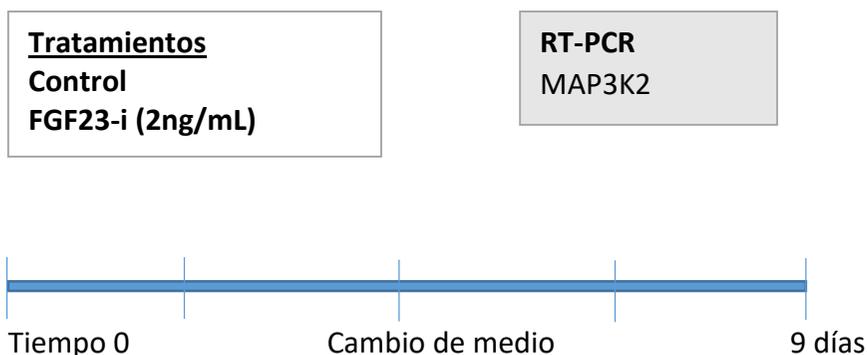


Ilustración 12. Diseño experimental a 9 días para el análisis de la expresión de MAP3K2 en CMLV tratadas con FGF23 intacto recombinante (2 ng/mL).

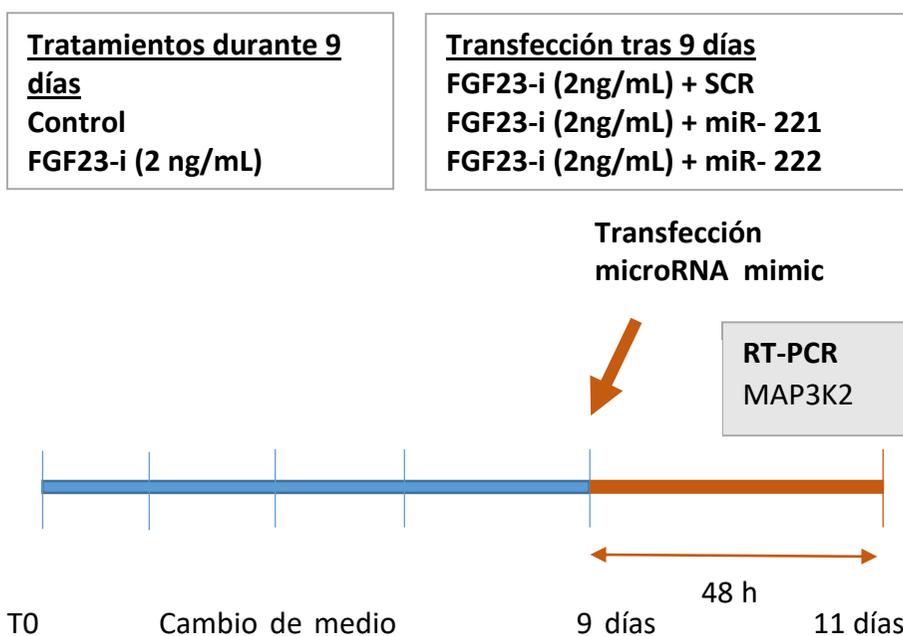
El RNA se extrajo como se indica en el apartado 2.2.2, realizándose una RT-PCR como se indica en el mismo apartado.

Como gen constitutivo se utilizó GAPDH, cuya secuencia se puede ver en la Tabla 7. La secuencia del cebador de MAP3K2 utilizado se muestra en la Tabla 13.

Gen	Forward	Reverse
<b>MAP3K2</b>	5'TGTGTGTGTGTGTGGTTAGAG3'	5'GGAAGGTGAGTATGGGAAGAT3'

**Tabla 13. Secuencia del cebador utilizados para estudiar la expresión del gen MAP3K2 mediante RT-PCR.**

Finalmente, persiguiendo el objetivo de este apartado, evaluamos la expresión génica de MAP3K2 en células tratadas con FGF23 recombinante (2 ng/mL) durante 9 días y transfectadas el día noveno de tratamiento con mimic microRNA 221 ó mimic microRNA 222 en combinación con FGF23 recombinante (2 ng/mL) durante 48 horas más, como se puede observar en la ilustración 13.

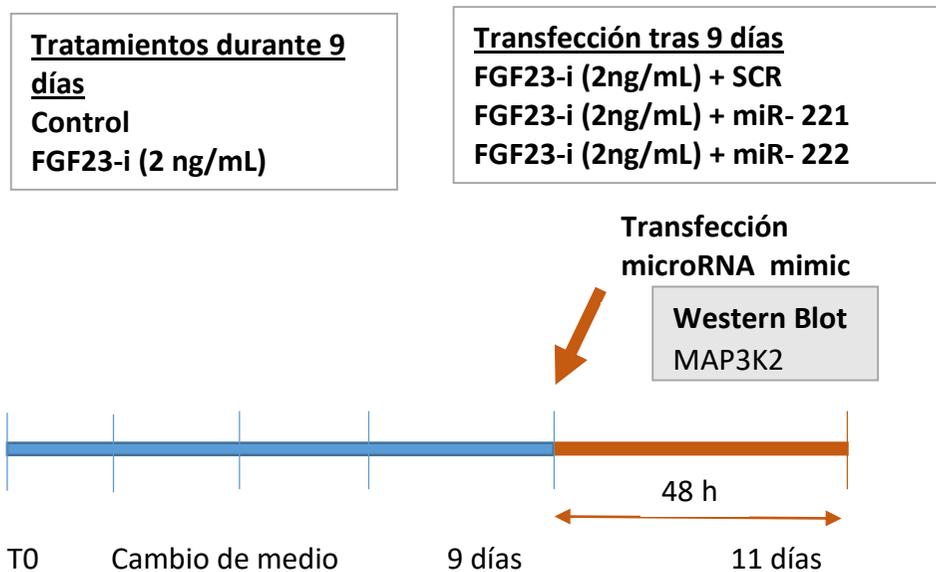


**Ilustración 13.** Diseño experimental a 11 días para estudiar los cambios en la expresión génica de MAP3K2 después de transfectar las CMLV con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 junto con la adición de FGF23 intacto recombinante (2 ng/mL) en las últimas 48 horas del experimento.

El RNA se extrajo como se indica en el apartado 2.2.2, realizándose una RT-PCR como se indica en el mismo apartado. Como gen constitutivo se utilizó GAPDH, cuya secuencia se puede ver en la Tabla 7. La secuencia del cebador de MAP3K2 utilizado se muestra en la Tabla 13.

### 2.5.3.2 Western Blot para evaluar la expresión proteica de MAP3K2 en presencia de microRNA 221 y microRNA 222

Se evaluaron los cambios de expresión proteica de MAP3K2 en células transfectadas con mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 en combinación con FGF23 recombinante (2 ng/mL), como se puede observar en la ilustración 14.



**Ilustración 14.** Diseño experimental a 11 días para estudiar los cambios en la expresión proteica de MAP3K2 después de transfectar las CMLV con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 junto con la adición de FGF23 intacto recombinante (2 ng/mL) en las últimas 48 horas del experimento.

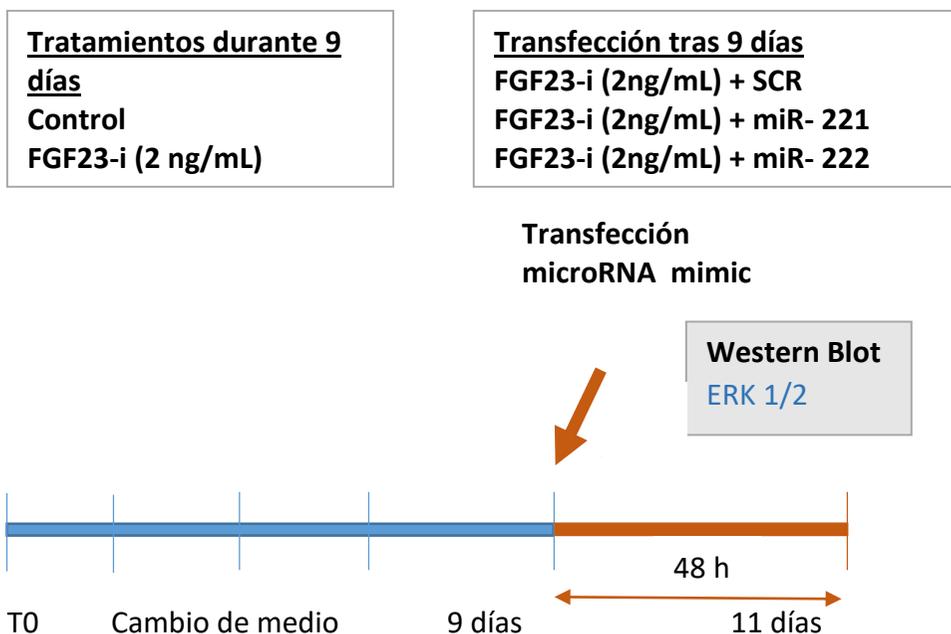
Las CMLV tratadas 9 días antes de la transfección de los microRNA se lisaron para obtener proteína total como se indica en el apartado 2.4.1.1. Los anticuerpos primarios, la referencia y dilución utilizados para el análisis por western Blot, tanto de la proteína MAP3K2 como la proteína constitutiva utilizada  $\beta$ -actina se muestran en la Tabla 14.

Anticuerpo	Dilución	Fuente	Casa comercial	Referencia
<b>MAP3K2</b>	1/5000 TTBS	Ratón	Santa cruz Biotechnology	sc-398091
<b><math>\beta</math>-actina</b>	1/5000 TTBS	Ratón	Santa cruz Biotechnology	sc-47778

**Tabla 14.** Anticuerpos primarios utilizados para western blot. Se utilizaron en muestras de proteína total.

#### **2.5.4 Efecto de la transfección de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 sobre la fosforilación de ERK 1/2.**

También se evaluaron los cambios de expresión proteica de ERK 1/2 en células transfectadas con mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 en combinación con FGF23 recombinante (2 ng/mL), como se puede observar en la ilustración 15.



**Ilustración 15.** Diseño experimental a 11 días para estudiar los cambios en la expresión proteica de ERK 1/2 después de transfectar las CMLV con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 junto con la adición de FGF23 intacto recombinante (2 ng/mL) en las últimas 48 horas del experimento.

Las CMLV tratadas 9 días antes de la transfección de los microRNA se lisaron para obtener proteína total como se indica en el apartado 2.4.1.1. Los anticuerpos primarios, la referencia y dilución utilizados para el análisis por western Blot, tanto de la proteína ERK 1/2 fosforilada como ERK 1/2 total se muestran en la Tabla 12.

## 2.6 Estudio comparativo del efecto de la molécula intacta de FGF23 y del fragmento C-terminal de FGF23 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV

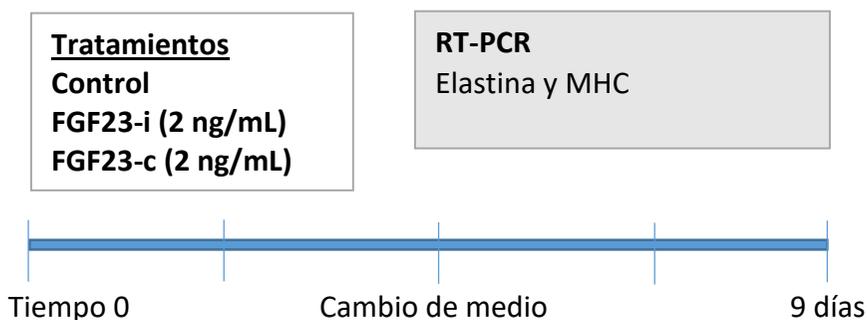
Para realizar el estudio comparativo entre el efecto de la molécula intacta y el fragmento C-terminal de FGF23 sobre las CMLV se

realizaron dos experimentos diferentes. El primero fue dirigido a evaluar a través de RT-PCR diferencias, en la expresión génica de los principales marcadores contráctiles, entre los dos tipos de moléculas de FGF23. El segundo tipo de experimento se realizó para detectar posibles diferencias en las rutas de señalización.

Los grupos experimentales estudiados fueron: un grupo control, un grupo al que se añadió FGF23 intacto recombinante (FGF23-i) (2 ng/mL) y otro grupo al que se añadió el fragmento C-terminal de FGF23 recombinante (FGF23-c) (2 ng/mL) (Biomol, Hamburgo, Alemania)

### 2.6.1 Análisis comparativo de los efectos de FGF23 intacto y c-terminal sobre la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil

Se evaluó a través de RT-PCR la expresión génica de los principales marcadores contráctiles de las CMLV. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y fueron tratadas durante 9 días tal y como se puede observar en la ilustración 16.



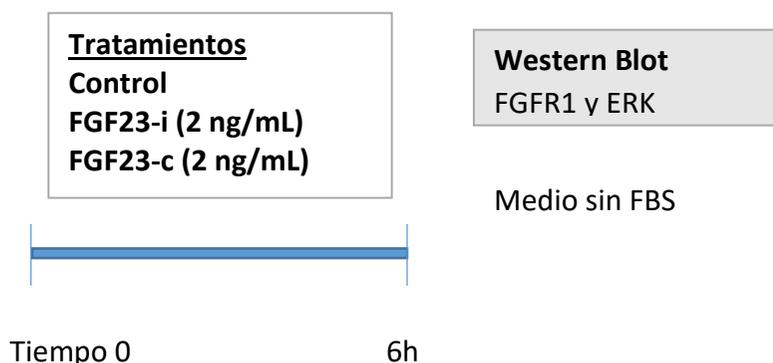
**Ilustración 16. Diseño experimental a 9 días para comparar el efecto de FGF23 intacto recombinante y FGF23 c-terminal sobre la expresión génica de elastina y MHC en CMLV.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 30 en cada uno de los grupos experimentales.

Tras finalizar el experimento se procedió al lisado celular para la obtención de RNA y posterior estudio de la expresión génica de los principales marcadores de fenotipo contráctil de las CMLV (elastina y MHC) como se indica en el apartado 2.2.2.

### 2.6.2 Cambios sobre la señalización celular

Para evaluar y comparar la señalización que activa tanto FGF23-i como FGF23-c para promover el fenotipo sintético en las CMLV se realizaron estudios de Western Blot para estudiar el papel de la activación de FGFR1 y la ruta ERK 1/2.

Para ello, las CMLV se cultivaron en placas de 6 pocillos tal y como se indica en la ilustración 17. Las células estuvieron expuestas a los tratamientos durante 6 horas y en ausencia de FBS para poder determinar la expresión proteica de FGFR1 y de ERK.



**Ilustración 17. Diseño experimental de 6 horas para comparar el efecto de FGF23 intacto recombinante y FGF23 c- terminal sobre la expresión proteica del receptor FGFR1 y el intermediario ERK en CMLV.** Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 3 en cada uno de los grupos experimentales.

La lisis de proteína total, la cuantificación y el western blot fueron realizados tal y como se ha descrito en los apartados anteriores (2.4.1.1), (2.1.2.2) y (2.1.2.3), respectivamente.

## **2.7 Comparación del efecto de FGF23 intacto con el de FGF2 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV**

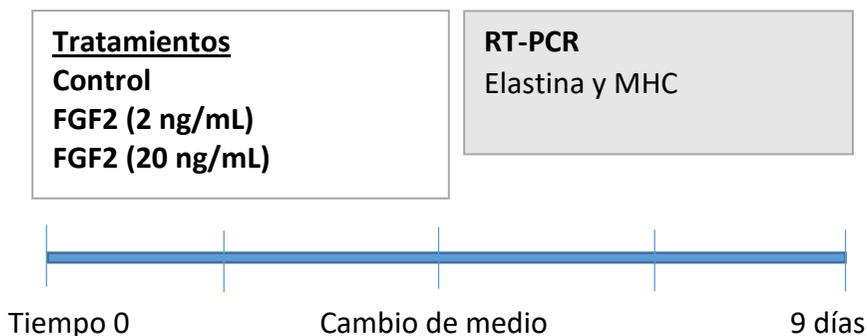
Para conocer si el efecto de FGF23 es común a otras citoquinas de la misma familia o si por el contrario se trata de una acción exclusiva del mismo, evaluamos y comparamos el efecto de FGF2 recombinante (PeproTech, London, UK) sobre el cambio de fenotipo de las CMLV.

En primer lugar, se evaluó a través de RT-PCR, la expresión génica de los principales marcadores contráctiles de este tipo celular y en segundo lugar, se estudió la fosforilación de FGFR1 y la activación de la ruta ERK 1/2.

Para llevar a cabo este estudio, se diseñaron los siguientes grupos experimentales: un grupo control y dos grupos a los que se añadió FGF2 recombinante a distintas concentraciones. Una concentración final en pocillo de 2 ng/mL y otra de 20 ng/mL. Se trata de las mismas concentraciones que se utilizaron con FGF23 intacto recombinante.

### **2.7.1 Cambios en la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil inducidos por FGF2**

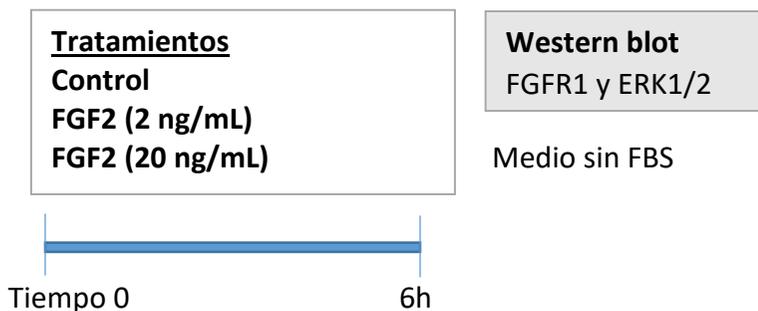
La expresión génica de los principales marcadores contráctiles de las CMLV se evaluó a través de RT-PCR. Las células fueron tratadas durante 9 días tal y como se puede ver en la ilustración 18.



**Ilustración 18.** Diseño experimental a 9 días para la determinación de la expresión génica de elastina y MHC en CMLV tratadas con FGF2 recombinante. Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 30 en cada uno de los grupos experimentales.

### 2.7.2 Cambios en la señalización inducida por FGF2

Se estudió la fosforilación de FGFR1 y la activación de la ruta ERK 1/2 para evaluar la señalización inducida por FGF2. Los estudios se realizaron tras 6 h de tratamiento y en ausencia de FBS como se puede ver en la ilustración 19.



**Ilustración 19.** Diseño experimental a 6 horas para la determinación de la señalización a través de la expresión proteica del receptor FGFR1 y del intermediario ERK1/2 en CMLV tratadas con FGF2 recombinante. Se realizaron 3 experimentos independientes con una N final de 3 en cada uno de los grupos experimentales.

### **3. Análisis estadístico del Bloque de células**

Los resultados de este estudio se han representado como la media  $\pm$  el error estándar. La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes ha sido evaluada mediante el test T-student para muestras independientes. Los valores  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism (versión 6.0).

## **Bloque 2: Estudio *in vivo* de los cambios vasculares promovidos por altos niveles de FGF23**

### **4. Modelo experimental en ratas**

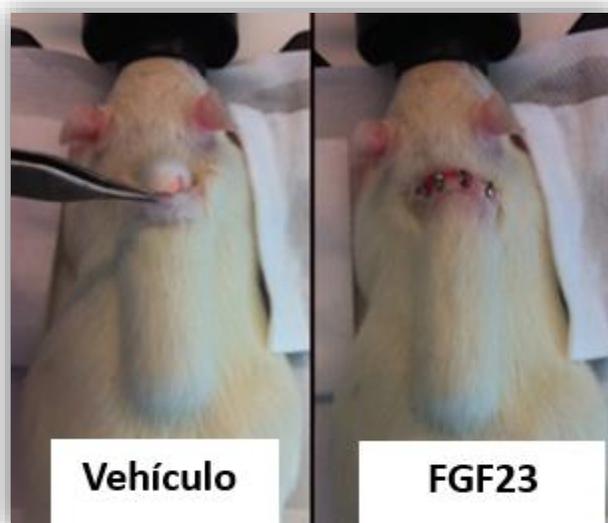
Se utilizaron ratas Wistar macho de 250 g de peso aproximadamente, alimentadas *ad libitum* y mantenidas en jaulas individuales bajo condiciones de temperatura y humedad controladas, y con ciclos de 12h luz/oscuridad. Los procedimientos quirúrgicos en los animales y los tratamientos experimentales se realizaron en las instalaciones acreditadas para tal fin en el animalario del IMIBIC. Los procedimientos experimentales en los animales cumplieron con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo, y con los protocolos de cuidado y uso de experimentación de IMIBIC y la Universidad de Córdoba.

Se realizó un modelo experimental dirigido a obtener altos niveles de FGF23 en plasma de forma primaria, es decir con independencia de cambios en la función renal o de alteraciones en cualquier otro parámetro del metabolismo mineral. Para ello se procedió a infundir a través de bombas Alzet colocadas subcutáneamente, altos niveles de FGF23 recombinante donado por AMGEN. Como se ha indicado ya anteriormente se trata de un FGF23 recombinante con una mutación en la región R176Q que impide su posterior degradación y pérdida de función. Derivado de los altos niveles de FGF23 se espera que aumente la fosfaturia y que disminuyan los niveles de calcitriol y probablemente la fosfatemia. Para corregir estas posibles variables se procedió a administrar una dieta con niveles

moderadamente altos de fósforo (0.9%) y a administrar cada 48 horas calcitriol 8ng/rata ip tal y como se indica en el siguiente apartado.

## 5. Diseño experimental

Se utilizaron 12 ratas Wistar macho, las cuales se dividieron en dos grupos. Un grupo control o vehículo (N=6) y otro grupo experimental o con alto FGF23 (N=6). A cada una de las ratas se le colocó en condiciones asépticas una bomba miniosmótica, modelo Alzet 2004 (Charles River Laboratories, Barcelona, España) en la parte dorsal de forma subcutánea entre los hombros. La bomba fue cargada con FGF23 recombinante para el grupo experimental o con un vehículo para el grupo control.



**Figura 16.** Localización de la bomba Alzet en la parte dorsal de la rata.

La bomba Alzet administra 15  $\mu\text{g}/\text{día}$  de FGF23 o vehículo durante 14 días. En ese periodo de tiempo, las ratas fueron alimentadas

con una dieta moderadamente alta en fósforo (0,9%) para evitar la hipofosfatemia inducida por el FGF23 recombinante. Para prevenir un descenso de calcitriol causado por el exceso de FGF23, todas las ratas recibieron un suplemento de calcitriol (8 ng/rata, 3 veces en semana). Transcurridos 14 días, los animales se sacrificaron bajo anestesia inhalatoria a través de punción aórtica y exanguinación. Posteriormente, se midieron distintos parámetros de metabolismo mineral con el objetivo de validar el modelo experimental.

### 5.1 Recogida de muestras sanguíneas y de orina

La sangre se recolectó en el mismo momento del sacrificio de los animales en tubos específicos para plasma (EDTA Vacutainer, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4º C. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a -80º C hasta su utilización. Para validar el modelo experimental se analizaron los niveles de FGF23 y fósforo en plasma. Además, también se recolectó orina de 24 horas antes del sacrificio para medir la fracción de excreción de fósforo (FeP) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{FeP} = \frac{\text{P (orina)} \times \text{Creatinina (plasma)}}{\text{P (plasma)} \times \text{Creatinina (orina)}} \times 100$$

Para tal fin, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas que permitieron la recogida completa de la diuresis.

### **5.1.1 Cuantificación de FGF23 intacto**

Se midió FGF23 intacto en las muestras de plasma de ambos grupos experimentales mediante la técnica ELISA (Kainos, Alemania).

Para ello se utilizaron 50  $\mu$ L tanto de la muestra de plasma como de los estándares y controles del kit. Posteriormente se añadieron 50  $\mu$ L de anticuerpo FGF23 biotinilado a cada uno de los pocillos de la placa y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación lenta. A continuación, se lavaron los pocillos 5 veces con una solución de lavado y se añadieron 100  $\mu$ L de anticuerpo FGF23 HRP conjugado. Después se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación lenta. De nuevo se lavaron los pocillos 5 veces con la misma solución de lavado y se añadieron 100  $\mu$ L del sustrato HRP del ELISA. Se incubó la placa en oscuridad por última vez durante 30 minutos a temperatura ambiente 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 50  $\mu$ L de una solución de stop y se volvió a leer la absorbancia a 450 nm.

### **5.1.2 Medición de fósforo**

Se utilizaron muestras de plasma y de orina de ambos grupos experimentales para obtener la medición de fósforo mediante un kit comercial (BioSystems, Barcelona, España).

Para ello se añadieron 10  $\mu$ L de muestra o de la curva estándar realizada con concentraciones conocidas de fósforo. A continuación, se añadió 1 mL de reactivo de trabajo en una proporción 7:3 de los reactivos A y B del kit. La mezcla se agitó vigorosamente. Finalmente, se

midió la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro de cubetas UV mini-1240 (Shimadzu, Europa).

### 5.1.3 Medición de creatinina

Se utilizaron muestras de plasma y de orina de ambos grupos experimentales para obtener la medición de creatinina mediante un kit comercial (BioSystems, Barcelona, España).

Para ello se añadieron 10 µL de muestra o del patrón de creatinina proporcionado por el kit. A continuación, se añadió 1 mL de reactivo de trabajo mezclado en volúmenes iguales de reactivo A y de reactivo B procedentes del kit. La mezcla se agitó, se introdujo en el espectrofotómetro y se puso el cronómetro en marcha. Finalmente, se midió la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro de cubetas UVmini-1240 (Shimadzu, Europa) después de 30 segundos y 90 segundos. La concentración de creatinina en cada una de las muestras se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{A2 - A1 \text{ (muestra)}}{A2 - A1 \text{ (patrón)}} \times C \text{ (patrón)}$$

Siendo A2 la medida de la absorbancia a 90 segundos, A1 la medida de la absorbancia a 30 segundos y C la concentración de estándar.

### 5.1.4 Cuantificación de PTH

Se midió PTH en las muestras de plasma de ambos grupos experimentales mediante la técnica ELISA (Immutopics, San Diego, CA, USA).

Para ello se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  tanto de la muestra de plasma como de los estándares y controles del kit. Posteriormente, se añadió a cada uno de los pocillos 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de la solución sustrato. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la solución de stop y finalmente se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Biotek PowerWave XS, EE.UU.).

### **5.1.5 Cuantificación de calcitriol**

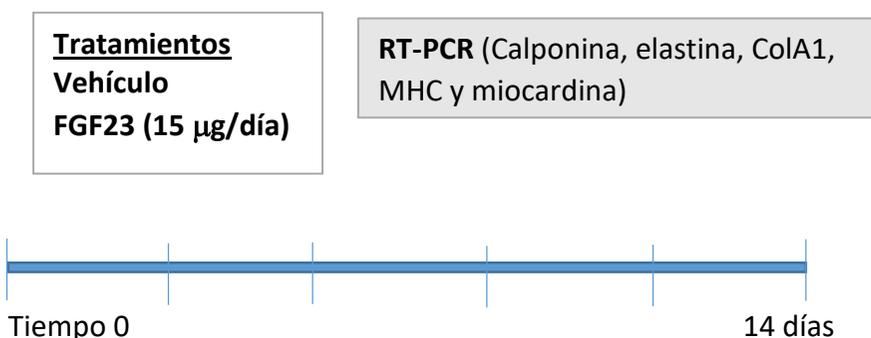
El calcitriol es la molécula activa de la vitamina D. Se midió mediante un ensayo completo dirigido a la purificación de 1,25-dihidroxivitamina D (1,25D) por inmunoextracción a partir de muestras de plasma y cuantificación posterior por radioinmunoensayo con  $^3\text{H}$ .

Para ello se siguieron las instrucciones del kit comercial Gamma-B 1,25-Dihydroxy Vitamin D RIA (IDS, Boldon, Reino Unido). Se utilizaron 500  $\mu\text{L}$  de muestra de plasma de ambos grupos experimentales. Las muestras se deslipidan y posteriormente la 1,25D se extrae separándose del resto de moléculas que pudieran presentar reacción cruzada por incubación durante 3 horas con un anticuerpo monoclonal anti-1,25D altamente específico en fase sólida. El producto de inmunoextracción se lava y la 1,25D purificada se eluye directamente en un tubo de ensayo de cristal. Los eluidos reconstituidos y los

calibradores utilizados en el ensayo se incuban toda la noche con un anticuerpo ovino anti-1,25D altamente específico. Se añade 1,25D- $I^{125}$  y se incuba durante 2 horas más. La separación entre 1,25D libre y unida se consigue tras una corta incubación con otro reactivo del kit denominado Sac.Cel, el cual está constituido por anticuerpos anti-IgG unidos a celulosa y suspendidos en tampón con azida sódica. Posteriormente se procede a la centrifugación, decantación y recuento. La cantidad de 1,25D radiactiva unida es inversamente proporcional a la concentración de 1,25D presente en la muestra.

## 5.2 Análisis de genes contráctiles por RT-PCR a partir de RNA de aorta torácica

Tras la medición de los parámetros de metabolismo mineral y función renal se procedió al análisis de expresión de genes en tejido aórtico. Como se puede ver en la ilustración 20, de cada una de las ratas se extrajo la aorta torácica para extraer RNA y medir la expresión génica de los genes de fenotipo contráctil calponina, elastina, ColA1, MHC y miocardina.



**Ilustración 20. Diseño experimental a 14 días para evaluar la expresión génica de calponina, Elastina, ColA1, MHC y miocardina.** Se realizó 1 experimento independiente con una N final de 6 en cada uno de los grupos experimentales.

### **5.2.1 Recogida del tejido: aorta torácica**

Tras la extracción de la aorta torácica, ésta se limpió con suero fisiológico para eliminar restos de sangre y grasa adheridos a la adventicia. Una vez limpia se procedió a alicuotar en dos partes; una para estudios de expresión de genes y otra para estudios de histología. La porción para estudios de genómica se congeló en nitrógeno líquido para una congelación rápida y posteriormente se trasladó a  $-80^{\circ}\text{C}$  donde se mantuvo guardada hasta el momento de su utilización. La porción para histología se introdujo en formaldehído 4% y posteriormente fue montada en un bloque de parafina.

### **5.2.2 Extracción de RNA a partir de aorta abdominal**

Para extraer el RNA, se cortó una pequeña porción de aorta aún congelada con ayuda de un bisturí. La aorta obtenida se pesó y se trituró en un mortero al que se añadió nitrógeno líquido. Posteriormente se trasladó a un eppendorf con trizol para que se produzca la lisis tisular mezclando vigorosamente la muestra con ayuda de un vortex. Después se continuó con la extracción de RNA como se indica en el apartado 2.2.2.2 del bloque 1 hasta el final de la técnica: cuantificación de RNA (apartado 2.2.2.3), tratamiento con DNAsa (apartado 2.2.2.4) y RT-PCR a tiempo real (2.2.2.5).

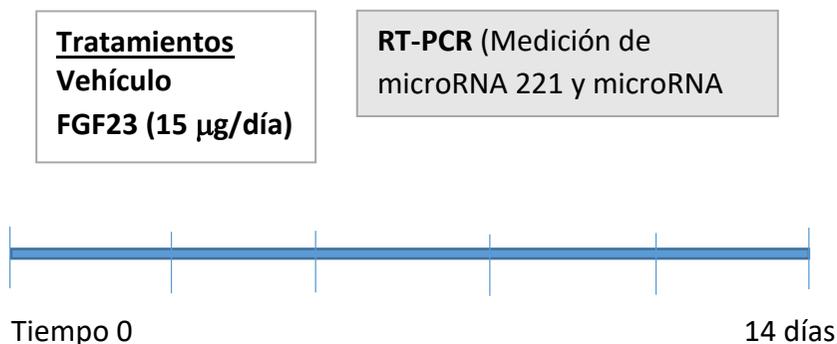
Los genes de fenotipo contráctil que se estudiaron en este caso fueron calponina, ColA1, miocardina, MHC y ACTA2. Como constitutivo o housekeeping se utilizó la expresión de GAPDH. La secuencia de los cebadores utilizados se puede ver en la Tabla 15.

Gen	Fordward	Reverse
<b>Calponina</b>	5'-GCATGTCTTCCGCACACTT-3'	5'-CAAAGAATGATCCCGTCCT-3'
<b>Elastina</b>	5'-CAGCTAAAGCAGCGAAGTATG-3'	5'-CCTGTAATGCCTCCAATCCC-3'
<b>ColA1</b>	5'-GCAAGAACAGCGTAGCCTACATGG-3'	5'-CAAGTTCGGGTGTGACTCGTGCAG-3'
<b>ACTA2</b>	5'-GACACCAGGGAGTGATGGTT-3'	5'-GTTAGCAGGGYCGGATGCTC-3'
<b>Miocardina</b>	5'-CTCGGAGTCAGCAGATGGATG-3'	5'-CCTCACTGTCGGTGGCATAGT-3'
<b>MHC</b>	5'-GAGAATGAGAAGAAAGCCAAGAG-3'	5'-CATCCAGCTCCCGCTGCAGCT-3'
<b>GAPDH</b>	5'-CATGGAGAAGGCTGGGGCTCA-3'	5'-GTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'

**Tabla 15. Secuencia de cebadores de rata utilizados.** Se utilizaron para estudiar la expresión de genes contráctiles en muestras de RNA procedentes de aorta torácica de rata.

### 5.3 Medición de microRNA 221 y microRNA 222 a partir de aorta torácica de rata

Como se puede ver en la ilustración 21, también se extrajo RNA de la arteria torácica extraída de cada una de las ratas para medir, en este caso, los microRNA 221 y microRNA 222.



**Ilustración 21. Diseño experimental a 14 días para evaluar los niveles de microRNA 221 y microRNA 222.** Se realizó 1 experimento independiente con una N final de 6 en cada uno de los grupos experimentales.

Tras descongelar los criotubos, que almacenamos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con la aorta torácica ya extraída (cuyo protocolo se puede ver en el apartado 5.2.1) se procedió a la extracción de RNA tal como se ha indicado en el apartado 5.2.2 con la excepción de no realizar el tratamiento con DNAsa, sino que en ese momento del protocolo se procede a medir los microRNA 221 y microRNA 222 tal como se indicó en el apartado 2.3.1.1 del bloque 1. Y una vez obtenido el cDNA diluido 40 veces, el protocolo continuó como se indica en el apartado 2.3.3 del mismo bloque 1. Los primers utilizados son los mismos que se utilizaron para medir estos mismos microRNAs en las CMLV, pues su secuencia es aplicable tanto para humanos como para rata, ver Tabla 11.

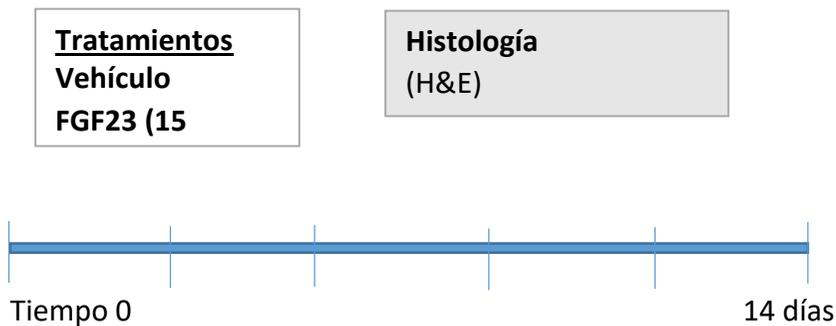
#### **5.4 Medición de microRNA 221 y microRNA 222 en plasma de rata**

También se midieron los microRNA 221 y microRNA 222 en muestras de plasma de cada una de las ratas de ambos grupos experimentales. Para medir ambos microRNA se utilizó una muestra de

200 uL de plasma de cada rata y se extrajo RNA total, utilizando el kit QIAzol miRNeasy (Qiagen). La lisis se produjo con 1 mL de reactivo de lisis y después se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Debido a la ausencia de un microRNA control endógeno en plasma, se añadió a cada una de las muestras un 1 µL de microRNA sintético no humano como un control interno (*C. elegans* microRNA 39 mimic: 5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3') (Qiagen). Se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó la muestra vigorosamente. Tras 3 minutos de incubación se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadió etanol en una proporción 1.5 (650 µL fase acuosa y 950 µL etanol). Posteriormente se procedió a lavar la muestra con distintos buffers procedentes de este kit de extracción. Finalmente, el RNA total se eluyó en 14 uL de agua libre de RNAsa. Posteriormente se procedió a realizar una PCR en transcripción reversa para retrotranscribir RNA a cDNA usando las indicaciones del kit Universal RT microRNA PCR cDNA (EXIQON) expuesto en el apartado 2.3.3 del bloque 1. Con la diferencia de que se utilizan 3 uL de RNA sin cuantificar, pues la cantidad de RNA es muy pequeña. Se midieron los microRNA 221 y microRNA 222, además del microRNA utilizado como housekeeping, que en este caso fue hsa-microRNA 39 (EXIQON). El método  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  se utilizó para calcular la abundancia relativa de microRNA en comparación con la expresión del control endógeno microRNA 39. Los primers utilizados de microRNA 221 y microRNA 222 son los mismos que se utilizaron para medir estos mismos microRNAs en las CMLV, pues su secuencia es aplicable tanto para humanos como para rata, ver Tabla 11 del bloque 1.

## 5.5 Estudio histológico

Como se ha indicado anteriormente, una porción de la arteria torácica extraída se reservó para estudios histológicos como se puede ver en la ilustración 22.



**Ilustración 22. Diseño experimental a 14 días para la realización de un estudio histológico de la aorta torácica de ambos grupos de ratas.** Se realizó 1 experimento independiente con una N final de 6 en cada uno de los grupos experimentales.

La sección de aorta torácica destinada al estudio histológico se lavó con suero fisiológico para retirar los restos sanguíneos, y a continuación se fijó con paraformaldehído al 4% para conservar la arquitectura y composición tisular. Posteriormente se colocó el tejido en un cassette y se deshidrató usando un sistema automático de preparación de muestras histológicas (Leyca TP1020, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). La deshidratación consistió en baños de aproximadamente 1 h a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4%, siguiendo una serie ascendente de alcoholes: Etanol 70%, 80%, 95% (2 baños) hasta 100% (3 baños) y finalmente en xilol (2 baños). Para finalizar, las muestras fueron incluidas en parafina líquida. Todos los reactivos utilizados en este procesador fueron de la casa comercial

Merck (Madrid, España). Al terminar la secuencia, el tejido se traspasó a un molde de plástico que se llenó de parafina líquida mediante un dispensador Leyca EG1120 (Leyca, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Este molde se solidificó en una placa fría. Finalmente, los bloques se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 24 h antes de comenzar a realizar los cortes.

Estos cortes histológicos se realizaron en un microtomo RM2255 (Leyca, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Primero se devastó el bloque a  $20\ \mu\text{m}$  y una vez llegado al tejido se realizaron secciones con un grosor de  $4\ \mu\text{m}$ . Los cortes se colocaron en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y se recogieron con un portaobjetos de vidrio recubierto con poli-L-lisina. Posteriormente, se secaron en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

### **5.5.1 Tinción Hematoxilina y eosina**

Esta tinción colorea los núcleos celulares con la hematoxilina y el citoplasma con la eosina. En primer lugar, se eliminó la parafina de los portas tras una incubación en xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se hidrató el tejido en una secuencia descendente de alcoholes: Etanol 100% (2 baños), 95%, 70% y un baño final de agua destilada. Cada incubación fue de 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 20 minutos en Hematoxilina de Harris (MERCK, Madrid, España) a temperatura ambiente. A continuación, se introdujeron durante breves segundos en una solución de HCl (1 N) 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. Las muestras terminaron con dos baños de xilol hasta su montaje añadiendo unas gotas de medio de montaje (EUKITT) sobre el porta y colocando encima un cubre hasta quedar sellado.

### **5.6 Medición de la contractilidad en anillos arteriales**

Para explorar el efecto específico del FGF23 sobre la contractibilidad de las CMLV se limpiaron, en la aorta torácica, las arterias de tejido conjuntivo y se cortaron en anillos (de 2 mm de longitud), los cuales se montaron en un miógrafo de hilo. Los anillos se colocaron en cámaras llenas de la solución de Krebs (119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ , 24  $\text{NaHCO}_3$ , 2,5  $\text{CaCl}_2$ , 1,17  $\text{MgSO}_4$  y 5,5 glucosa) y se burbujearon con 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  a pH 7,4. Los anillos arteriales se normalizaron inicialmente para medir la tensión pasiva de la pared, es decir, la fuerza ejercida por la pared del vaso en ausencia de activación del músculo liso. Para ello, se introducen dos cables a través del lumen del vaso; uno de ellos se fija a un transductor de fuerza sensible para medir los cambios en la tensión de la pared y el otro se fija a un microposicionador que permite un control preciso de la distancia entre los dos cables. Los segmentos de los vasos intactos se estiraron sucesivamente con pasos de 200  $\mu\text{m}$  hasta que la presión transmural alcanzó los 100 mmHg, y posteriormente se realizaron los experimentos

al 90% de la presión transmural de 100 mmHg para obtener registros óptimos.

Después de la normalización, los anillos arteriales se estabilizaron durante una hora, y tras este tiempo se midió la tensión activa de la pared. Se utilizó noradrenalina (NA, 3  $\mu$ M) y solución de alto K (70 K) para inducir la contracción del músculo liso a través de la activación del receptor alfa1-adrenoceptor y de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, respectivamente. La solución de 70 K se obtuvo sustituyendo 70 mM de NaCl por KCl en la solución extracelular. La NA y la 70 K se añadieron directamente a las cámaras, mientras se monitorizaba la tensión del vaso. Los experimentos se realizaron a 37 °C.

### **6. Análisis estadístico en los experimentos *in vivo***

Los resultados de este estudio se han representado como la media  $\pm$  el error estándar. La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes fue evaluada mediante el test T-student para muestras independientes. Los valores  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism (versión 6.0).

### **Bloque 3: Estudio de la relación entre FGF23 y daño vascular en pacientes con estadios tempranos (2-3) de ERC**

#### **7. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio**

Se trata de un estudio transversal en donde un total de 71 pacientes, 51 hombres y 20 mujeres derivados de la consulta de nefrología del Hospital Universitario Reina Sofía, fueron incluidos en el estudio. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético de dicho hospital y todos los participantes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. La referencia del ensayo clínico y su número EudraCt es 2015-000619-42.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron los siguientes:

1. Sujetos de ambos sexos con rango de edad entre 18 y 85 años.
2. Filtrado glomerular, estimado por la fórmula CKD-EPI, entre 30 y 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Valores que corresponden con los estadios 2 y 3 de la clasificación de ERC.
3. Cumplir al menos tres de los cinco criterios de síndrome metabólico propuestos por la Federación Internacional de la Diabetes<sup>208</sup>:
  - Perímetro abdominal elevado (en hombres  $\geq$  102 cm y en mujeres  $\geq$  88 cm).
  - Triglicéridos elevados ( $\geq$  150 mg/dL) o uso de medicación específica.
  - Lipoproteína de alta densidad (HDL, del inglés high density lipoprotein) reducida (hombres  $<$  40 mg/dL y mujeres  $<$  50 mg/dL) o uso de medicación específica.

- Glucosa en ayunas elevada ( $\geq 100$  mg/dL) o uso de medicación antidiabética.
- Hipertensión arterial (Presión arterial sistólica (PAS) o Presión arterial diastólica (PAD)  $\geq 130$  mmHg o  $\geq 85$  mmHg respectivamente o uso de medicación antihipertensiva.

Los criterios de exclusión para este estudio fueron los siguientes:

1. Pacientes con sospecha de enfermedad renal crónica secundaria a glomerulonefritis, poliquistosis hepato-renal, nefropatía túbulo-intersticial, uropatías obstructivas o nefropatía diabética.
2. Pacientes con excreción urinaria de proteínas elevadas, definida por un cociente albúmina/creatinina en orina superior a 300 mg/g.
3. Pacientes con hiperfosfatemia, definida como concentración de fósforo superior a 5 mg/dL.
4. Pacientes con manifestación clínica de insuficiencia cardíaca congestiva.
5. Infecciones activas dentro de los 30 días anteriores al inicio del estudio.
6. Pacientes con enfermedad inflamatoria sistémica.
7. Infección por VIH, virus de la Hepatitis C o Hepatitis B.
8. Historia de cáncer dentro de los 5 años anteriores.
9. Hepatopatía crónica.
10. Terapia inmunosupresora.
11. Mujeres embarazadas, en lactancia o con planes de quedar embarazadas.
12. Adicción a drogas o alcohol.

13. Cambios superiores al 5% en el filtrado glomerular respecto a la función renal disponible previa a la inclusión en el estudio.

Una vez seleccionada la población de estudio, se hizo un recuento del número de pacientes que están siendo tratados como consecuencia de presentar algún tipo de comorbilidad. Para ello se utilizó la base de datos del servicio de nefrología del hospital Reina Sofía, distinguiendo entre aquellos pacientes que están tratándose con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueantes de receptores de angiotensina, diuréticos, bloqueantes de los canales de calcio, betabloqueantes o alfa bloqueantes. También se ha tenido en cuenta el número de pacientes con tratamiento antidiabético o dislipidémico así como si eran o no fumadores.

## **8. Recogida de muestras de sangre y orina**

Tras la visita de selección que aseguraba la idoneidad del paciente para el estudio, los pacientes visitaron en ayunas las consultas de ensayos clínicos de IMIBIC para realizar la toma de muestras de sangre. Esta se realizó sobre el brazo izquierdo y se recogió en tubos para la obtención de plasma (EDTA Vacutainer, Becton Dickinson, New Jersey, USA). En ese momento, los participantes del estudio entregaron tanto muestras de orina de esa misma mañana como la recogida durante las 24 h previas a la visita.

Los parámetros bioquímicos de rutina en sangre y orina fueron analizados en la unidad de análisis clínicos del Hospital Reina Sofía, tales como filtrado glomerular (estimado por la fórmula CKD-EPI) y los siguientes parámetros séricos: creatinina sérica, fósforo sérico, urea,

glucosa, sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio, triglicéridos, colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL, albúmina, proteína C reactiva (PCR), hierro y ferritina. También se analizaron los siguientes parámetros en la orina de 24 horas: creatinina, excreción urinaria de nitrógeno (UUN, del inglés, urinary urea nitrogen), sodio, potasio y calcio. Además de los siguientes otros parámetros relativos al P en orina de 24 horas, como son excreción de fósforo, fracción de excreción de fósforo, ratio excreción de fósforo/FG, ratio fósforo/creatinina y ratio fósforo/UUN.

### **9. Medición de fósforo en plasma**

Se utilizaron muestras de plasma y de orina de los pacientes para obtener la medición de fósforo mediante un kit comercial (BioSystems, Barcelona, España). Se utilizaron 10  $\mu$ L de muestra y se realizó la medición como se indica en el apartado 5.1.2 del bloque 2.

### **10. Medición de creatinina plasmática**

Se utilizaron muestras de plasma y de orina de los pacientes para obtener la medición de creatinina mediante un kit comercial (BioSystems, Barcelona, España). Se utilizaron 10  $\mu$ L de muestra y se realizó la medición como se indica en el apartado 5.1.3 del bloque 2.

Otros tubos de sangre y orina fueron procesados y almacenados en las instalaciones de IMIBIC. Para ello los tubos de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4<sup>o</sup> C. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a -80<sup>o</sup> C hasta su utilización para medir PTH y FGF23 séricos. La orina de la mañana y de las 24 horas anteriores se almacenó en diferentes alícuotas a -80<sup>o</sup> C hasta su utilización.

## **11. Medición de PTH en plasma**

Se midió PTH en las muestras de plasma de los pacientes mediante la técnica ELISA (Immutopics, San Diego, CA, USA).

Para ello se utilizaron 50  $\mu$ L de muestra y se realizó la medición como se indica en el apartado 5.1.4 del bloque 2.

## **12. Cuantificación de FGF23 C-terminal**

Se descongelaron muestras de plasma de todos los pacientes y se midió FGF23 C-terminal mediante la técnica ELISA (Kit de Immutopics, San Diego, CA, USA). Para ello se utilizaron 100  $\mu$ L tanto de la muestra de plasma como de los estándares y controles del kit.

Posteriormente se añadieron 50  $\mu$ L a cada uno de los pocillos de la placa de una solución de 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  $\mu$ L del sustrato HRP del ELISA.

Después se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación lenta. La lectura de la absorbancia de las muestras se realizó en un espectrofotómetro a 620 nm. Inmediatamente después se paró la reacción con la adición de 50  $\mu$ L de una solución de stop y se volvió a leer la absorbancia a 450 nm.

### **13. Medición de microRNA 221 y microRNA 222 en RNA total a partir de plasma**

De toda la población de estudio, se seleccionaron 14 pacientes para medir la abundancia de los microRNA 221 y microRNA 222 a partir de plasma. Se seleccionaron los 7 pacientes con los niveles más bajos de FGF23 C-terminal correspondientes al decil más bajo (D1) y otros 7 pacientes con los niveles de FGF23 c-terminal más altos, correspondientes al decil más alto (D10).

Para medir los microRNA 221 y microRNA 222 en estos 14 pacientes se siguió el mismo protocolo utilizado para medir los microRNA en plasma de rata como se indica en el apartado 5.4 del bloque 2. Los primers utilizados son los mismos que se utilizaron para medir estos mismos microRNA en las CMLV, ver Tabla 11 del bloque 1.

### **14. Otros parámetros evaluados en consulta**

En el mismo día de la recogida de muestras, a los pacientes se les midió el perímetro abdominal, se les tomó la altura y se pesaron en una báscula para poder obtener el índice de masa corporal.

A continuación, fueron sometidos en primer lugar a un test que permite calcular la velocidad de onda de pulso así como otros parámetros hemodinámicos medidos con el dispositivo mobil-O-graph.

#### **14.1 Medición de la velocidad de onda de pulso y parámetros hemodinámicos centrales**

Para realizar esta prueba se necesitan recoger previamente los siguientes datos del paciente: edad, talla, peso, sexo y si es o no fumador. Tras esto se coloca un manguito de presión en el brazo

derecho y se procede a realizar la medición para obtener los parámetros hemodinámicos que recoge el aparato Mobil-O-Graph como sístole, diástole, tensión arterial media, frecuencia cardíaca, tensión diferencial, sístole central, diástole central, tensión diferencial central, gasto cardíaco, resistencia vascular periférica total, índice cardíaco, área de superficie corporal, tensión de aumento, índice de aumento, coeficiente de reflexión y velocidad de onda de pulso. Esta medición se realizó 3 veces, y los valores fueron recogidos por el software con el programa HMS (Hypertension Mangment Software Client Server (Stolberg, Alemania). La medida con la que trabajamos para los análisis posteriores fue la media de la segunda y tercera medición, pues la primera se descartó en todos los pacientes por ser considerada de ajuste y puesta a punto.

### **15. Análisis estadístico en los experimentos en pacientes**

Los resultados de este estudio se han representado como la media  $\pm$  el error estándar. La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes ha sido evaluada mediante el test T-student para muestras independientes. Los valores  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism (versión 6.0).

Además, con las muestras biológicas de los pacientes de este estudio y con algunos parámetros vasculares, se ha realizado un estudio estadístico utilizando el programa SPSS (versión 24.0) y considerando los valores  $<0,05$  como estadísticamente significativos. Los datos categóricos se han expresado como frecuencias o proporciones según el parámetro evaluado. La distribución normal de cada variable se analizó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov de muestra con

corrección de significación de Lilliefors. Las comparaciones paramétricas se realizaron utilizando un test T-student. Sin embargo, las comparaciones no paramétricas para las variables cuantitativas se utilizaron para evaluar las diferencias entre los diferentes grupos mediante el uso de las pruebas de Mann-Whitney. La correlación entre dos variables continuas se analizó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. También se han realizado estudios de regresión lineal para examinar los factores que pueden afectar a los valores de la presión de pulso periférica en el estudio clínico. Las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariado y otras consideradas clínicamente relevantes se incluyeron en un análisis multivariado.

La edad, que está estrechamente correlacionada con la presión de pulso, tanto periférica como central, y la velocidad de onda del pulso, se incluyó en el análisis multivariante como variable continua y también como variable binaria (mayor y menor de 60 años), ya que las personas mayores de 60 años tienen un mayor riesgo de presentar valores elevados de presión del pulso y velocidad de onda del pulso <sup>209</sup>. También se comprobó la interacción entre el fragmento c-terminal del FGF23 y la presión arterial media (PAM) en los modelos de regresión.

#### **Bloque 4: Estudio clínico en pacientes con enfermedad renal crónica 2-3 y síndrome metabólico para estudiar la relación entre FGF23 y la ingesta de P**

Para evaluar la relación entre FGF23 y la ingesta de P se utilizó la misma cohorte de pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 2-3 y síndrome metabólico, la cual ha sido descrita en el bloque 3 de esta tesis doctoral.

Dado que el FGF23 no es una medida clínica de rutina disponible en la mayoría de servicios de análisis clínicos de hospitales nos hemos centrado en buscar alguna relación entre los niveles de FGF23 y parámetros relacionados con la ingesta y excreción de P. Por tanto, se valorarán parámetros clínicos que nos permitan conocer cuándo hay un mayor riesgo de rigidez arterial.

#### **16. Valoración de la ingesta de P ingerido**

Los pacientes se sometieron a una encuesta dietética detallada de los 3 días previos a la extracción de muestras de sangre y orina con el objetivo de estimar la cantidad media diaria y la fuente de P ingerida.

La ingesta de P se estimó a partir de una base de datos de la sociedad española de nutrición que recoge la composición de los alimentos usualmente consumidos en España, especialmente en el sur<sup>210</sup>. Esta extensa tabla ha sido muy útil para obtener el contenido de P especialmente de muchos platos caseros que son comunes en esta región. La información sobre el contenido de P mostrada en esta tabla coincidía y ha sido comparada con los valores indicados en otra fuente de información alimentaria, la Base de Datos Española de Composición

de Alimentos (BEDCA) <sup>211</sup> desarrollada por la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB) y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Los valores de composición de los alimentos recogidos en esta base de datos se han obtenido de diferentes fuentes, incluyendo laboratorios, industria alimentaria y publicaciones científicas. Esta base de datos está construida según los estándares europeos desarrollados por la Red Europea de Excelencia EuroFIR, y está incluida en la lista de bases de datos de composición de alimentos de la Asociación EuroFIR <sup>212</sup>. El registro dietético se ha utilizado como método de evaluación adecuado para una encuesta dietética paneuropea de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Sin embargo, con la información disponible, no es posible estimar con precisión la cantidad de P inorgánico contenida en la dieta; los datos recogidos y los valores comunicados son solo una estimación basada en la cantidad de alimentos procesados ingeridos (autodeclarados) por los pacientes. Antes de obtener la información dietética, los pacientes recibieron formación sobre cómo describir adecuadamente los alimentos, las cantidades consumidas, los métodos de cocción, etc. El consumo de alimentos se registró diariamente tanto por comida como entre comidas. Las cantidades de alimentos se evaluaron mediante la descripción de los utensilios utilizados habitualmente para cocinar y servir e indicando la cantidad consumida de cada producto <sup>213</sup>. Se pidió a los pacientes que informaran si, independientemente de la cantidad consumida, la dieta incluía alimentos procesados. La encuesta se revisó con el paciente durante la

visita a la clínica con el fin de aclarar las entradas y añadir los artículos y cantidades omitidas.

### **17. Recogida de muestras de sangre y orina**

Tanto la recogida de muestras de sangre y orina como los parámetros analizados en dichas muestras se pueden observar en el apartado 8 del bloque 3.

### **18. Medición de fósforo, creatinina y PTH en plasma**

Las mediciones de fósforo y creatinina se realizaron mediante un kit comercial como se puede observar en los apartados 9 y 10, respectivamente, del bloque 3. La medición de PTH se realizó mediante la técnica ELISA, la cual se puede observar en el apartado 11 del bloque 3.

### **19. Cuantificación de FGF23 C-terminal**

Para llevar a cabo la cuantificación de FGF23 c-terminal de este estudio se realizó la técnica ELISA, la cual se puede observar en el apartado 12 del bloque 3.

### **20. Análisis estadístico en los experimentos en pacientes**

Los resultados de este estudio se han representado como la media  $\pm$  el error estándar. La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes ha sido evaluada mediante el test T-student para muestras independientes. Los valores  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism (versión 6.0).

Además, con las muestras biológicas de los pacientes de este estudio, se ha realizado un estudio estadístico utilizando el programa SPSS (versión 24.0) y considerando los valores  $<0,05$  como estadísticamente significativos. Los datos categóricos se han expresado como frecuencias o proporciones según el parámetro evaluado. La distribución normal de cada variable se analizó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov de muestra con corrección de significación de Lilliefors. Las comparaciones paramétricas se realizaron utilizando un test T-student. Sin embargo, las comparaciones no paramétricas para las variables cuantitativas se utilizaron para evaluar las diferencias entre los diferentes grupos mediante el uso de las pruebas de Mann-Whitney. La correlación entre dos variables continuas se analizó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.



## **Resultados**

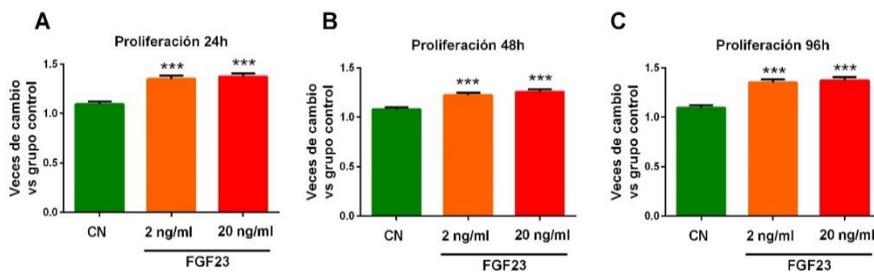


## Bloque 1: Estudios *in vitro* acerca del efecto de altos niveles de FGF23 sobre el fenotipo de CMLV

### 1. Efecto de altos niveles de FGF23 sobre la proliferación de CMLV

#### 1.1 Ensayo colorimétrico de proliferación celular

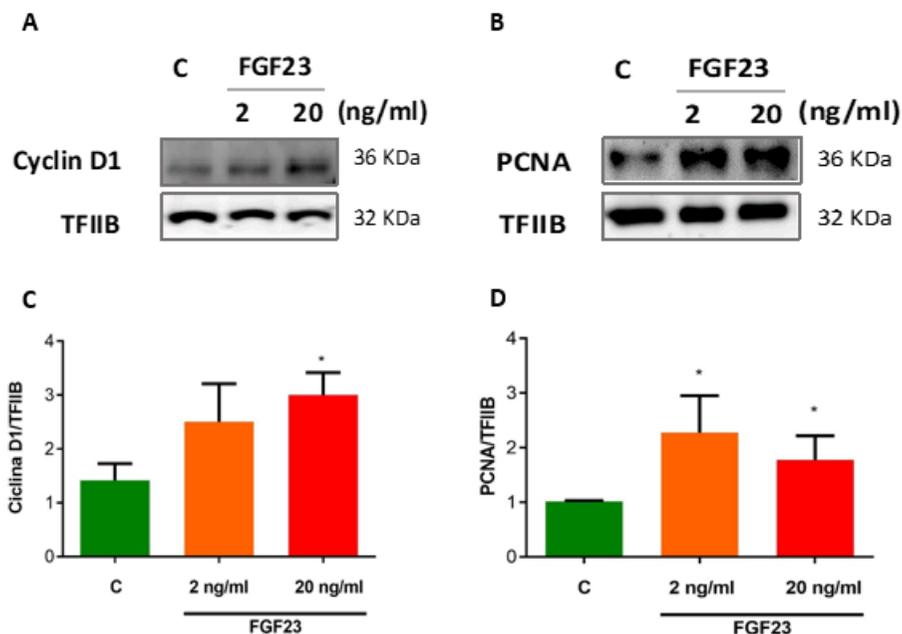
Antes de realizar el ensayo colorimétrico para determinar la proliferación celular, las CMLV fueron tratadas con dos dosis de FGF23 (2 y 20 ng/ml) durante 24, 48 y 96 horas. Como se observa en la Figura 17, respecto de células control, la adición de FGF23 tanto la concentración de 2 ng/ml como la de 20 ng/ml incrementó significativamente la proliferación de las CMLV. En ninguno de los tiempos estudiados se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de FGF23 estudiadas.



**Figura 17. Cambios en la proliferación celular de CMLV inducidos por FGF23.** Proliferación celular en A) 24 h, B) 48h y C) 96 h de tratamiento con 2 y 20 ng/ml de FGF23. Los datos son representados con el valor medio  $\pm$  el error estándar de la media (N=72/grupo procedentes de 3 experimentos independientes, \*\*\*p<0,001 vs grupo control).

## 1.2 Expresión proteica de marcadores de proliferación celular

Las CMLV fueron tratadas en presencia de FGF23 (2 ng/ml y 20 ng/ml) durante 6 horas y sin FBS. Tras este tiempo se procedió a estudiar la expresión de las proteínas ciclina D1 y PCNA, conocidos marcadores de proliferación celular. Los geles de acrilamida analizados por western blot muestran que tanto la expresión de ciclina D1 (Figura 18A) como la de PCNA (Figura 18B) fue más alta en aquellas células tratadas con FGF23 que en las células control. La expresión de ambas proteínas fue también cuantificada a través de Image J en todos los geles realizados. La cantidad de Ciclina D1 (Figura 18C) tuvo una tendencia a incrementar en presencia de FGF23 que fue significativa con la concentración de FGF23 de 20ng/ml. En el caso de PCNA (Figura 18D) la presencia de ambas dosis de FGF23 (2 ng/ml y 20 ng/ml) fue significativamente más alta que en el grupo control.



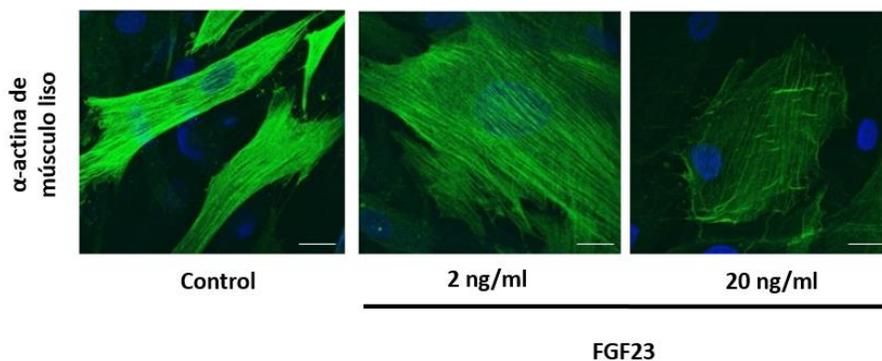
**Figura 18.** Expresión proteica de los marcadores de ciclina D1 y PCNA en presencia de FGF23. Los niveles de ciclina D1 (A) y PCNA (B) fueron evaluados mediante western blot a partir de extractos proteicos nucleares. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. Se utilizó TFIIB como proteína constitutiva en todos los casos. Todos los geles de ciclina D1 (C) y PCNA (D) fueron cuantificados evaluando la densidad óptica integrada (DOI) normalizada con TFIIB a través del software Image J. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$  vs grupo control). Las células fueron cultivadas durante 6 horas en presencia de FGF23 a distintas concentraciones (2 ng/ml y 20 ng/ml).

## 2. Estudio del cambio de fenotipo en CMLV inducido por altos niveles de FGF23

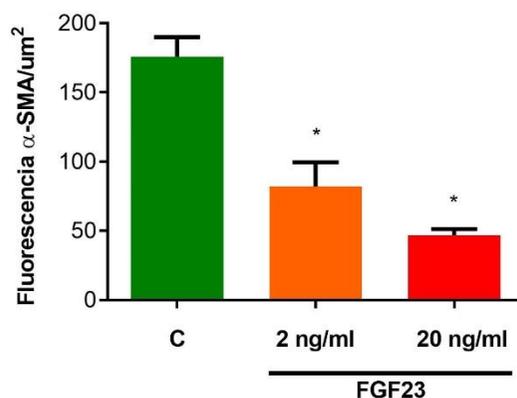
### 2.1. Efecto de FGF23 sobre el cambio en la morfología de las CMLV

Las CMLV fueron tratadas durante 9 días con FGF23 a 2 y 20 ng/ml. Tras este periodo de tiempo se procedió a realizar un estudio de

inmunofluorescencia para detectar los niveles de la proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular. Dado que esta proteína está ampliamente expresada en las CMLV y a que se expresa en los filamentos responsables de mantener la estructura celular, esta inmunofluorescencia resulta también especialmente adecuada para detectar cambios morfológicos en estas células. Como se puede observar en la figura 19, la morfología de las células tratadas con FGF23 cambió desde una forma fusiforme, presente en las células control, a una forma globular, encontrada tras el tratamiento con ambas dosis de FGF23. Además, como se observa en la figura 20, el marcaje de la  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular, específica de fenotipo contráctil, fue también significativamente menos intenso en las células tratadas con ambas concentraciones de FGF23.



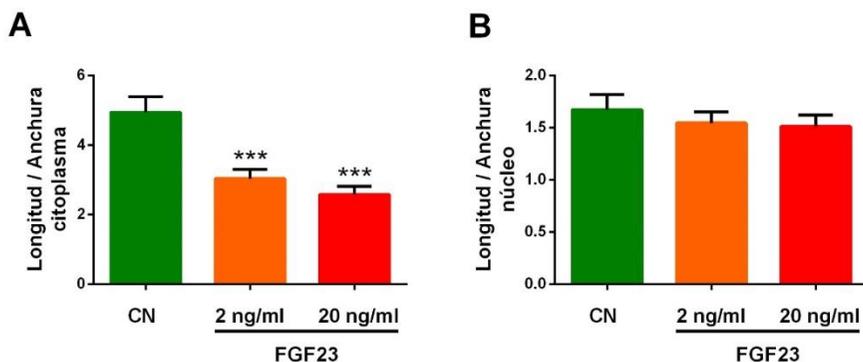
**Figura 19. Detección mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular.** Las CMLV fueron cultivadas durante 9 días en presencia de FGF23 2 ng/ml y 20 ng/ml. Se muestra la  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular, en el citoplasma de las células, en verde y la tinción con DAPI en azul para los núcleos. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes.



**Figura 20. Fluorescencia de la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular.** Las CMLV fueron cultivadas durante 9 días en presencia de FGF23 2 ng/ml y 20 ng/ml. El marcaje de la  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular fue significativamente menos intenso en las células tratadas con ambas concentraciones de FGF23. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes.

Tras realizar un estudio morfológico de las células con el software Image J observamos cambios significativos en las proporciones celulares. De esta manera el ratio longitud/anchura del citoplasma de las células tratadas con FGF23 a 2 y 20 ng/ml descendió significativamente al compararlo con el ratio del grupo control (Figura 21A). Sin embargo, la proporción longitud/anchura del núcleo de las células se mantuvo invariable entre los distintos tratamientos estudiados (Figura 21B).

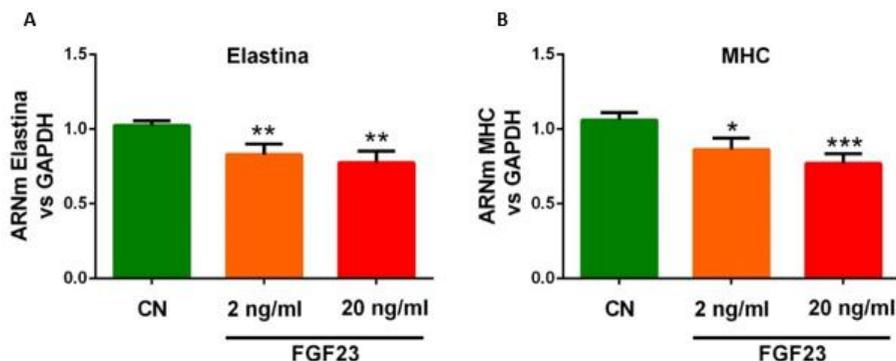
De esta manera, se observa que altos niveles de FGF23 promueven el desarrollo de una morfología globular en detrimento de la disposición fusiforme propia de las CMLV de fenotipo contráctil.



**Figura 21. Efecto de FGF23 sobre la morfología celular (citoplasma y núcleo) de las CMLV tratadas o no con FGF23.** A) Ratio longitud/anchura del citoplasma celular. B) Ratio longitud/ anchura del núcleo celular. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=18/grupo, 3 experimentos independientes, \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo control).

## 2.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil de CMLV

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar la influencia que tiene el FGF23 sobre los marcadores de fenotipo contráctil de las CMLV. Para ello, las células fueron tratadas durante 9 días en presencia de altos niveles de FGF23 y a continuación se evaluó mediante RT-PCR los cambios en la expresión génica de marcadores específicos de fenotipo contráctil. Los resultados mostrados en la Figura 22 revelan que la adición de altos niveles de FGF23 desciende significativamente la expresión génica de los siguientes marcadores de fenotipo contráctil estudiados: elastina y MHC.

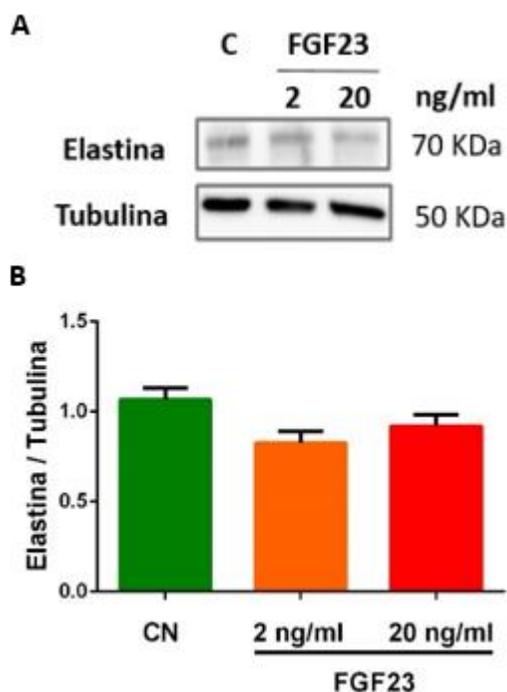


**Figura 22. Efecto de FGF23 sobre la expresión génica de los principales marcadores de fenotipo contráctil de CMLV.** La expresión génica de los distintos marcadores de fenotipo contráctil A) Elastina y B) MHC fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=30/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo control). Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF23 2 ng/mL.

En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de FGF23.

### 2.3 Efecto de FGF23 sobre la expresión proteica de algunos marcadores de fenotipo contráctil

Además de la actina, ya analizada en la Figura 19, los cambios a nivel proteico inducidos por la adición de FGF23 se comprobaron analizando la cantidad de elastina. Los resultados de la Figura 23 muestran que ambas concentraciones de FGF23 disminuyeron la expresión proteica de la proteína elastina, específica de fenotipo contráctil.



**Figura 23. Efecto de FGF23 sobre la expresión proteica de algunos marcadores de fenotipo contráctil de CMLV.** La expresión proteica de los marcadores contráctiles A) Elastina fue evaluada mediante western blot a partir de extractos citoplasmáticos. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. Se utilizó tubulina como proteína constitutiva en todos los casos. Las bandas de Elastina B) fueron cuantificadas evaluando la densidad óptica integrada (DOI) normalizada con tubulina a través del software Image J. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \*p<0,05 vs grupo control). Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF23 a distintas concentraciones (2 ng/ml y 20 ng/ml).

A partir de este punto, dado que no se observaron grandes diferencias estadísticas entre las dos concentraciones de FGF23 intacto utilizadas, se decidió continuar los estudios solo con una concentración de FGF23 recombinante que fue la de 2 ng/ml, más similar además a la detectada en pacientes con ERC avanzada.

### 3. Evaluación de FGF23 sobre un perfil de microRNA relacionado con patologías vasculares

#### 3.1 Evaluación de cambios en el perfil de microRNA

Para explorar los mecanismos por los que altos niveles de FGF23 promueven el cambio fenotípico de las CMLV, se realizó un array de PCR de microRNA en células tratadas con FGF23 (2 ng/mL). Este array incluía el análisis de 84 microRNA implicados en enfermedades cardiovasculares.

Los resultados mostraron que FGF23 promueve cambios en la expresión de microRNA específicos relacionados con enfermedades cardiovasculares. Considerando un coeficiente de cambio de expresión de 1,75 veces entre las células tratadas con FGF23 frente a las células control, pudimos observar que de los 84 microRNA analizados, 21 no cambiaron y 63 fueron down-regulados por FGF23 en diferentes niveles como se muestra en la Tabla 16.

microRNA		microRNA		microRNA	
<b>let-7a-5p</b>	-	miR-15b-5p	=	miR-29b-3p	=
<b>let-7b-5p</b>	-	miR-16-5p	-	miR-29c-3p	=
<b>let-7c-5p</b>	-	miR-17-5p	-	miR-302a-3p	-
<b>let-7d-5p</b>	-	miR-181a-5p	-	miR-302b-3p	-
<b>let-7e-5p</b>	-	miR-181b-5p	-	miR-30a-5p	-
<b>let-7f-5p</b>	-	miR-182-5p	=	miR-30c-5p	-
<b>miR-1-3p</b>	-	miR-183-5p	-	miR-30d-5p	-
<b>miR-100-5p</b>	-	miR-185-5p	-	miR-30e-5p	-
<b>miR-103a-3p</b>	=	miR-18b-5p	=	miR-31-5p	-
<b>miR-107</b>	=	miR-195-5p	-	miR-320a	-
<b>miR-10b-5p</b>	-	miR-199a-5p	-	miR-328-3p	-
<b>miR-122-5p</b>	=	miR-206	=	miR-342-3p	-
<b>miR-124-3p</b>	=	miR-208a-3p	-	miR-365b-3p	-

<b>miR-125a-5p</b>	-	miR-208b-3p	-	miR-378a-3p	-
<b>miR-125b-5p</b>	-	miR-22-3p	=	miR-423-3p	-
<b>miR-126-3p</b>	=	miR-221-3p	-	miR-424-5p	-
<b>miR-130a-3p</b>	-	miR-222-3p	-	miR-451a	=
<b>miR-133a-3p</b>	=	miR-223-3p	-	miR-486-5p	-
<b>miR-133b</b>	-	miR-224-5p	-	miR-494-3p	=
<b>miR-140-5p</b>	-	miR-23a-3p	-	miR-499a-5p	=
<b>miR-142-3p</b>	=	miR-23b-3p	-	miR-7-5p	-
<b>miR-143-3p</b>	-	miR-24-3p	-	miR-92a-3p	-
<b>miR-144-3p</b>	-	miR-25-3p	-	miR-93-5p	-
<b>miR-145-5p</b>	-	miR-26a-5p	-	miR-98-5p	-
<b>miR-146a-5p</b>	=	miR-26b-5p	-	miR-99a-5p	=
<b>miR-149-5p</b>	-	miR-27a-3p	=	miR-21-5p	-
<b>miR-150-5p</b>	-	miR-27b-3p	-	miR-210-3p	=
<b>miR-155-5p</b>	-	miR-29a-3p	-	miR-214-3p	-

**Table 16. Array de PCR de microRNA específico de enfermedades cardiovasculares en CMLV tratadas con FGF23 (2 ng/mL) vs CMLV control.** La expresión de microRNA down-regulados vs las células control se representa con el signo (-), mientras que la expresión de microRNA sin cambios vs las células control se representa con el signo (=).

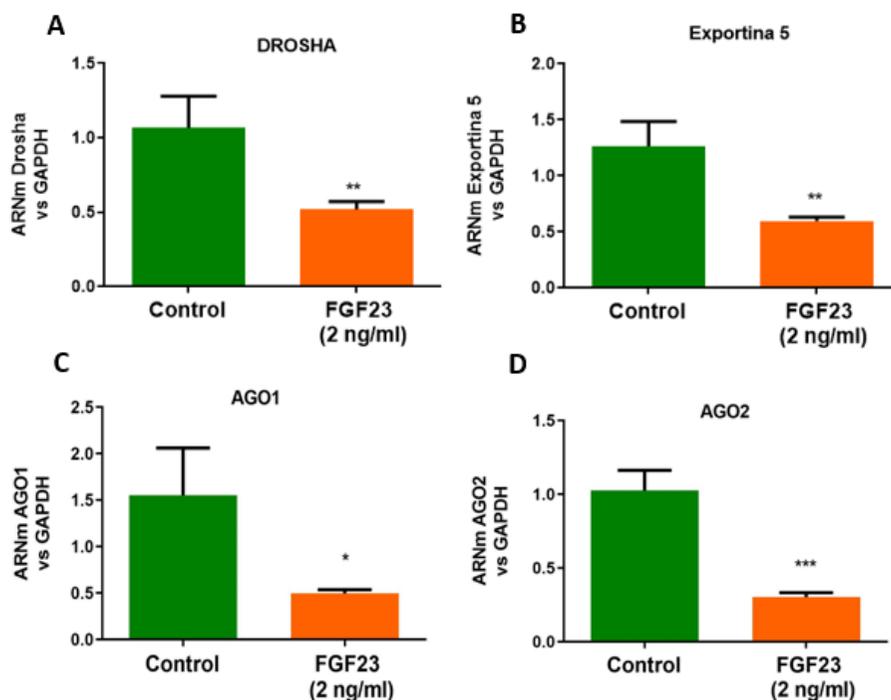
Algunos de estos microRNA down-regulados, como micro 23b-3p, micro 26a-3p, microRNA 124-3p, microRNA 125a, microRNA 130a-3p, microRNA 133b, microRNA 145-5p, microRNA 181a, microRNA 181b, microRNA 221 o microRNA 222 se han relacionado previamente con la rigidez arterial y el cambio fenotípico de las CMLV.

### **3.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión de genes relacionados con la biogénesis de microRNA**

Al observar que la administración de FGF23 a las CMLV descendió un amplio número de microRNAs, pensamos que el FGF23 podría estar implicado en la alteración de algunos elementos relacionados con la biogénesis de microRNA. Para comprobar esta hipótesis se analizó la expresión de ARNm de los principales genes

relacionados con la biogénesis de microRNA, como son Drosha, Exportina 5, AGO1 y AGO 2 en células tratadas con FGF23 2 ng/mL.

Como se indica en la figura 24, los resultados mostraron que la expresión de estos genes descendió significativamente tras el tratamiento con FGF23.



**Figura 24. Efecto de FGF23 sobre la expresión de genes relacionados con la biogénesis de microRNA.** La expresión génica de los genes A) Drosha, B) Exportina 5, C) AGO1 y D) AGO2 fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=8/grupo, 2 experimentos independientes, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs grupo control). Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF23 2 ng/ml.

### 3.3. Validación de la expresión de microRNA en CMLV en presencia de FGF23

Para evaluar si realmente la administración de FGF23 conduce a modificaciones en la expresión de los microRNA down-regulados observados en el ensayo Array, validamos algunos de ellos. Los microRNA validados fueron microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y microRNA 145. Las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2 ng/ml) durante 9 días y posteriormente se evaluó la expresión de estos microRNA.

La Figura 25 muestra que en comparación con la expresión de los microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y microRNA 145 en el grupo control, los niveles de expresión de estos mismos microRNA descendieron de forma significativa en presencia de FGF23.

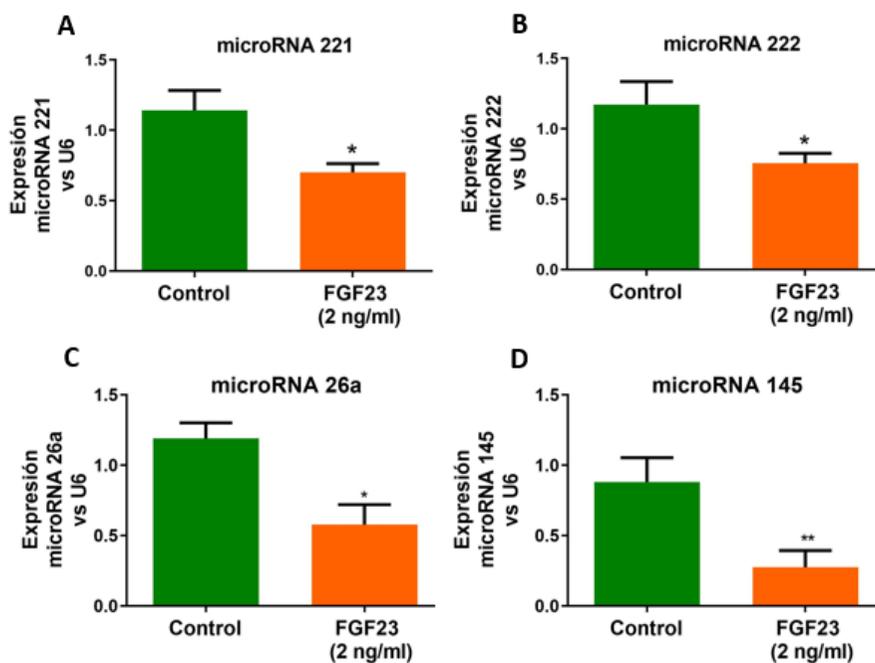


Figura 25. Efecto de FGF23 sobre la expresión de microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a y D) microRNA 145 en CMLV. Cambios en la expresión del A) microRNA

221, B) microRNA 222, c) microRNA 26a y D) microRNA 145 en CMLV tratadas con FGF23 (2 ng/ml) durante 9 días. La expresión de los microRNA fue normalizada con la expresión de U6 y comparada con las células control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=6/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$  vs grupo control, \*\* $p < 0,01$  vs grupo control).

Estos cambios en los microRNA estudiados podrían estar relacionados con el cambio de fenotipo de las CMLV inducido por FGF23. Para comprobar esta posible relación se procedió a realizar experimentos de transfección de los microRNA 221 y microRNA 222 debido a que estos dos microRNA tienen un especial interés en el contexto de la rigidez arterial y en el cambio de fenotipo de las CMLV.

#### **4. Efecto de altos niveles de FGF23 intacto sobre la señalización intracelular en CMLV**

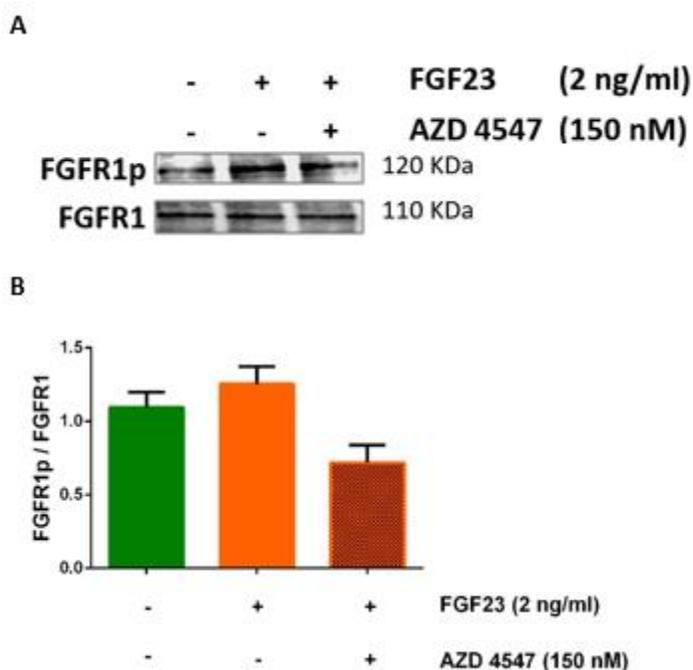
Para estudiar la señalización intracelular activada por la administración de FGF23, las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2ng/ml) durante 6 horas con medio de cultivo y sin FBS.

En primer lugar se analizó, si las acciones de FGF23 están mediadas por la activación del receptor FGFR1. Para ello se comprobó por western blot, como se puede observar en la figura 26A, que la adición de FGF23 aumentó la expresión del receptor transmembrana FGFR1 en su forma fosforilada en comparación con la expresión del receptor en las células control.

Para comprobar el papel del inhibidor de FGFR1 sobre el cambio de fenotipo de las CMLV, las CMLV fueron también tratadas con FGF23 (2ng/ml) en presencia del inhibidor de FGFR1 (AZD4547, 150 nM inhibidor específico de FGFR1, FGFR2 y FGFR3). Como se muestra en la

misma figura 26A, la combinación de FGF23 con el inhibidor AZD4547 disminuyó ligeramente la fosforilación del receptor FGFR1.

La figura 26B muestra la cuantificación de la expresión proteica de FGFR1, la cual aumenta en presencia de FGF23 y disminuye en presencia de FGF23 en combinación con el inhibidor AZD4547, aunque no de forma significativa.

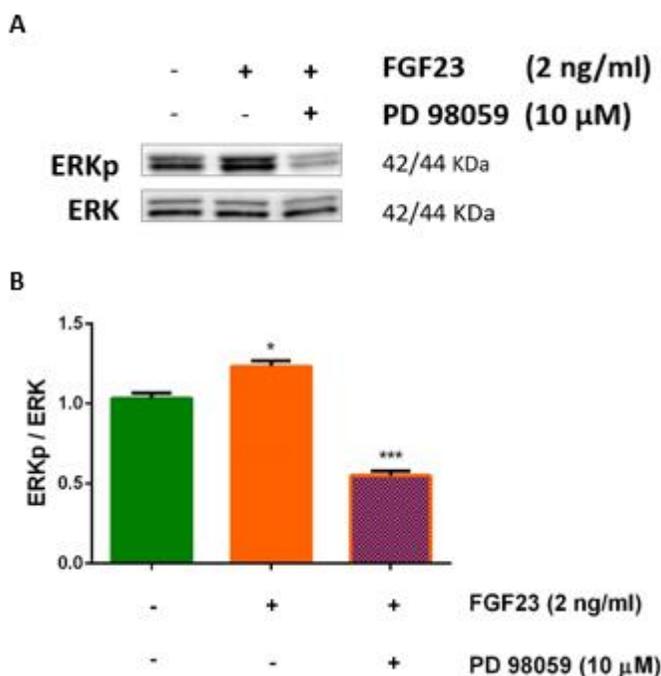


**Figura 26. Efecto de FGF23 sobre el receptor FGFR1 en CMLV.** A) Cambios en la expresión proteica de FGFR1 en células tratadas con FGF23 solo o en combinación con AZD 4547 (150 nM). Los niveles de FGFR1 fueron evaluados mediante western blot a partir de extractos de proteína total. Se utilizó FGFR1 en sus formas no fosforiladas como proteína constitutiva y control de carga. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. B) Cuantificación de la densidad óptica integrada (DOI) normalizada con la proteína de estudio en su forma no fosforilada. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes). Las células fueron tratadas con FGF23 (2 ng/ml) en presencia o no del inhibidor de estudio durante 6 horas con medio y sin FBS.

Posteriormente, estudiamos posibles cambios en la fosforilación de la proteína de señalización celular ERK 1/2. La Figura 27A muestra que la adición de FGF23 aumentó significativamente la fosforilación de ERK1/2 en comparación con células control.

Para comprobar el papel del inhibidor de ERK sobre el cambio de fenotipo de las CMLV, las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2ng/ml) en presencia del inhibidor de ERK1/2 (PD 98059, 10  $\mu$ M). Como se muestra en la misma figura 27A, la fosforilación de ERK disminuyó drásticamente tras la administración del inhibidor PD 98059.

La figura 27B muestra la cuantificación de la expresión proteica de ERK 1/2, la cual aumenta de forma significativa en presencia de FGF23 y disminuye, también de forma significativa, en presencia de FGF23 en combinación con el inhibidor PD98059.

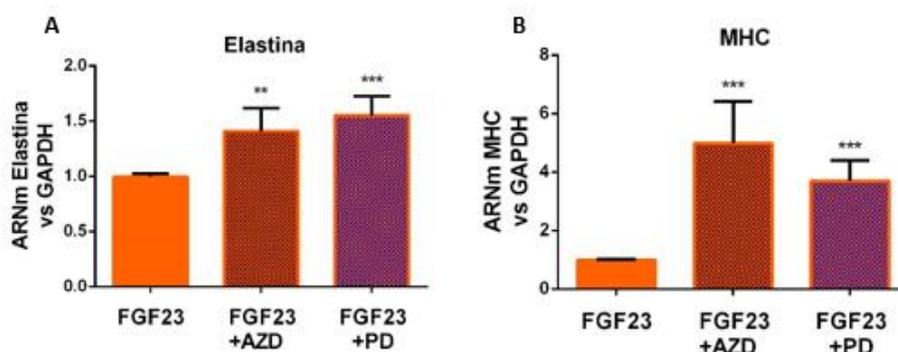


**Figura 27. Efecto de FGF23 sobre el intermediario ERK en CMLV.** A) Cambios en la expresión proteica de ERK en células tratadas con FGF23 solo o en combinación con PD 98059 (10  $\mu$ M). Los niveles de ERK fueron evaluados mediante western blot a partir de extractos de proteína total. Se utilizó ERK en sus formas no fosforiladas como proteína constitutiva y control de carga. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. B) Cuantificación de la densidad óptica integrada (DOI) normalizada con la proteína de estudio en su forma no fosforilada. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,001 vs grupo control). Las células fueron tratadas con FGF23 (2 ng/ml) en presencia o no del inhibidor de estudio durante 6 horas con medio y sin FBS.

Después de comprobar que los efectos de FGF23 están mediados por su interacción con el receptor FGFR1 y la posterior fosforilación de ERK1/2 procedimos a evaluar el efecto de la inhibición de ambas rutas sobre la expresión génica de los marcadores de fenotipo contráctil en CMLV. Para ello, las CMLV fueron igualmente tratadas con

FGF23 2 ng/ml en combinación con AZD 4547 (150 nM) o con PD 98059 (10  $\mu$ M) durante 9 días.

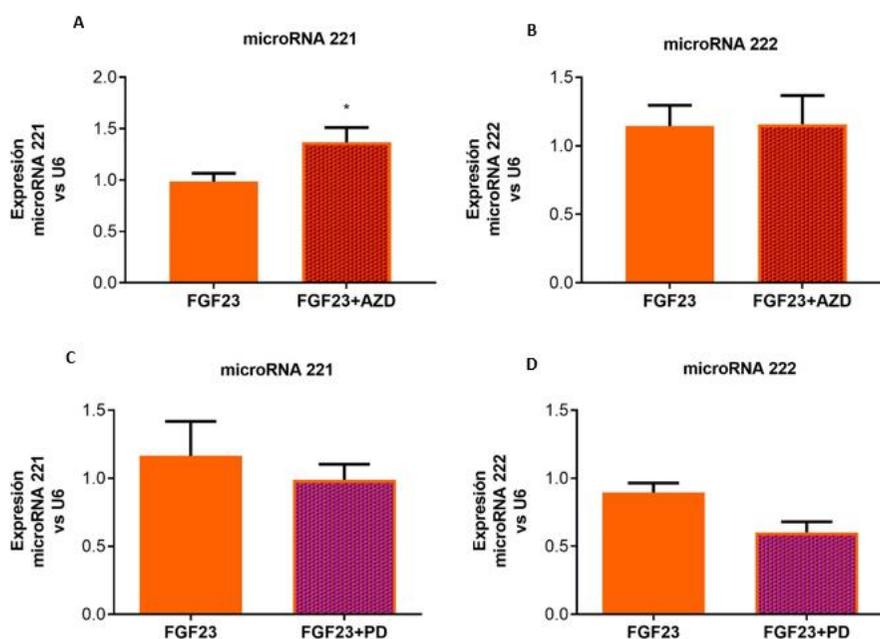
Los resultados mostrados en la Figura 28 revelan que respecto a células tratadas con FGF23, la administración, tanto de inhibidores de FGFR1 como de ERK 1/2 incrementó de forma significativa la expresión génica de todos los marcadores de fenotipo contráctil estudiados, como son elastina y MHC.



**Figura 28.** Efecto de la inhibición de FGFR1 y ERK1/2 sobre la expresión génica de genes marcadores de fenotipo contráctil en CMLV tratadas con altos niveles de FGF23. La expresión génica de los distintos marcadores de fenotipo contráctil A) Elastina y B) MHC fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células tratadas solo con FGF23. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=15/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo control (FGF23)). Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF23 (2 ng/ml) en combinación con AZD 4547 (150 nM) ó PD 98059 (10  $\mu$ M).

Finalmente, para evaluar si los cambios observados en la fosforilación de FGFR1 y ERK 1/2 tras la administración de FGF23 dependen de la down-regulación de los microRNA 221 y microRNA 222, también se evaluó la expresión de estos microRNA en las CMLV tratadas con FGF23 en combinación con los inhibidores de FGFR1 (AZD4547) y ERK 1/2 (PD98059). Como se puede ver en la figura 29, la

inhibición de FGFR1 mediante la administración de AZD4547 aumentó significativamente la expresión de microRNA 221. Sin embargo, no hubo diferencias significativas respecto a la expresión de microRNA 222. La administración de PD98059 (inhibidor de ERK 1/2) no modificó la expresión de ninguno de los dos microRNA estudiados.



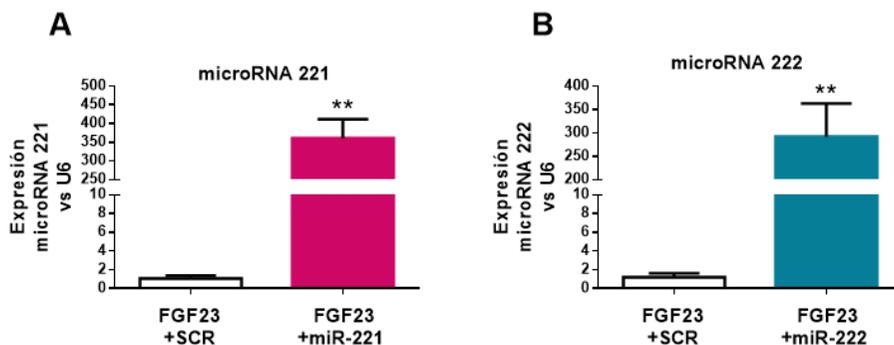
**Figura 29. Efecto de la inhibición de FGFR1 y ERK1/2 sobre la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222 en CMLV tratadas con altos niveles de FGF23.** Expresión de A) microRNA 221 y B) microRNA 222 en células tratadas con FGF23 e inhibidas con AZD4547. Expresión de C) microRNA 221 y D) microRNA 222 en células tratadas con FGF23 e inhibidas con PD98059. La expresión de los microRNA fue normalizada con la expresión de U6 y comparada con las células tratadas con FGF23. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \*p<0,05 vs grupo control (FGF23)). Las CMLV fueron incubadas durante 6 horas en presencia de FGF23 (2 ng/ml) en combinación con AZD 4547 (150 nM) ó PD 98059 (10 µM).

## **5. Papel de la modulación de los microRNA 221 y microRNA 222 sobre el fenotipo de las CMLV tratadas con FGF23**

### **5.1 Transfección y evaluación de la efectividad de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222**

Las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2 ng/ml) durante 9 días. Tras este periodo se realizó la transfección del mimic microRNA 221 (100 nM) y mimic microRNA 222 (100 nM) en las células en combinación con FGF23 (2 ng/ml). Las células estuvieron transfectadas durante 48 horas. Tras las 48 h, la primera determinación realizada fue comprobar la efectividad de la transfección, para lo cual se procedió a evaluar la expresión de los niveles de microRNA 221 y microRNA 222.

Como se puede observar en la figura 30, la expresión de microRNA 221 aumentó de forma significativa en aquellas células transfectadas con mimic microRNA 221 ( $361,2 \pm 50,25$ ) en comparación con la expresión de las células control ( $1,08 \pm 0,31$ ). Del mismo modo, la expresión de microRNA 222 aumentó también muy significativamente ( $292,4 \pm 70,53$ ) con respecto a la expresión de las células control ( $1,20 \pm 0,42$ ).



**Figura 30. Expresión de microRNA 221 y microRNA 222 tras la transfección de los mimics de microRNA 221 y microRNA 222.** Las CMLV fueron tratadas con FGF23 durante 9 días antes de realizar la transfección de los mimics de microRNA. Las células estuvieron transfectadas durante 48 h. A) Expresión de microRNA 221 después de la transfección con mimics de microRNA 221. B) Expresión de microRNA 222 después de la transfección con mimics de microRNA 222. La expresión de los microRNAs fue normalizada con la expresión del microRNA U6 y comparada con las células control transfectadas con un escramble negativo (SCR). Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \*\*p<0,01 vs grupo control).

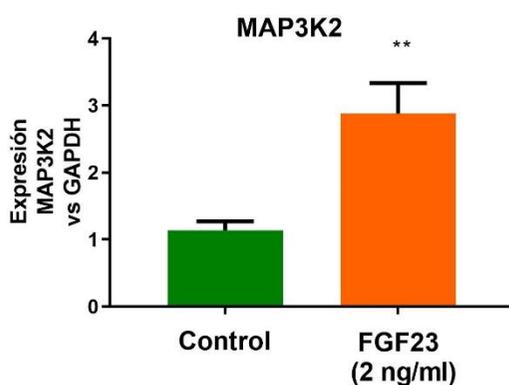
## 5.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión de MAP3K2 en CMLV transfectadas con mimics de microRNA 221 y mimics de microRNA 222

Después de comprobar la eficiencia de la transfección de microRNA 221 y microRNA 222, se procedió a evaluar el efecto de estos altos niveles de microRNA sobre la expresión de MAP3K2 (diana de los microRNAs de estudio) en CMLV transfectadas con microRNA 221 y microRNA 222 en combinación con FGF23 recombinante (2 ng/mL).

### 5.2.1 Efecto de FGF23 sobre la expresión génica de MAP3K2 en CMLV transfectadas

Antes de realizar la evaluación de la expresión génica de MAP3K2 en CMLV transfectadas con microRNA 221 y microRNA 222, se

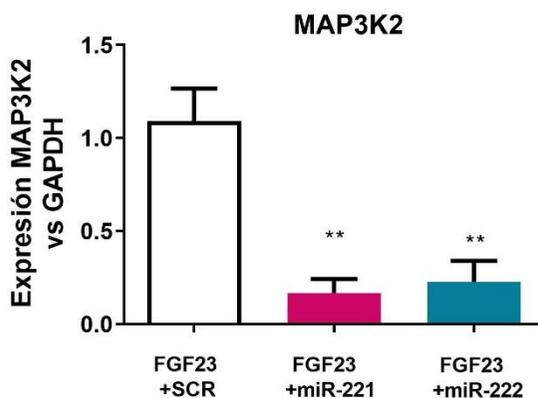
comprobó el efecto que produce la administración de FGF23 recombinante (2 ng/mL), el cual disminuye la expresión de microRNA 221 y microRNA 222, sobre la expresión génica de MAP3K2, gen diana de ambos microRNA. Como se puede ver en la figura 31, después de 9 días de cultivo, la administración de FGF23 aumentó de forma significativa la expresión de ARNm de MAP3K2.



**Figura 31. Efecto de FGF23 sobre la expresión génica de MAP3K2 en CMLV.** La expresión génica de MAP3K2 fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media. (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \*\*p<0,01 vs grupo control). Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF23 2 ng/mL.

A continuación, persiguiendo el objetivo de este apartado, se evaluó el efecto potencial de los microRNA 221 y microRNA 222 sobre la acción de los intermediarios MAP3K2 y ERK1/2 en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 y tratadas con FGF23 recombinante (2 ng/mL).

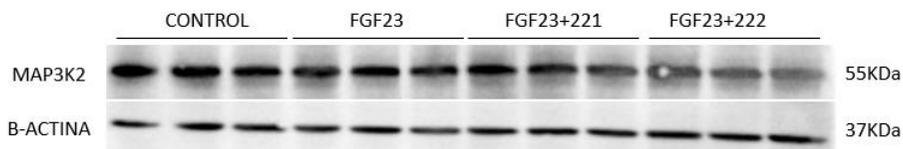
Como se puede ver en la figura 32, el incremento de microRNA 221 y microRNA 222 produjo una disminución significativa de la expresión de MAP3K2 en células tratadas con FGF23.



**Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de microRNA 221 y microRNA 222 en CMLV tratadas con FGF23 sobre la expresión génica de MAP3K2.** Las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2 ng/mL) durante 9 días antes de realizar la transfección de mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222. Las células estuvieron transfectadas durante 48 h y después se procedió a la cuantificación de la expresión génica de MAP3K2. La expresión fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control, las cuales están transfectadas con un escramble negativo (SCR). Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes, \*\*p<0,01 vs grupo control).

### 5.2.2 Efecto de FGF23 sobre la expresión proteica de MAP3K2 en CMLV transfectadas

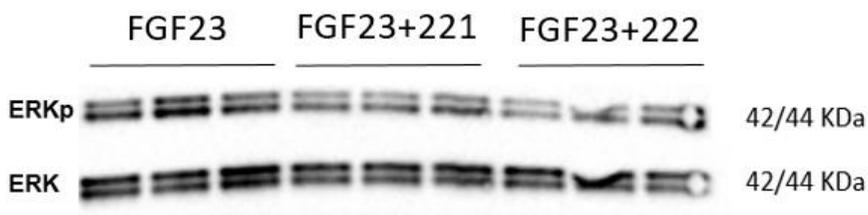
Los resultados de la expresión proteica de MAP3K2 en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 en combinación con FGF23 (2 ng/mL) mostraron una disminución de la expresión de MAP3K2, como se puede ver en la figura 33.



**Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de microRNA 221 y microRNA 222 en CMLV tratadas con FGF23 sobre MAP3K2.** Las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2 ng/mL) durante 9 días antes de realizar la transfección de mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222. Las células estuvieron transfectadas durante 48 h y después se procedió a la cuantificación de la expresión de MAP3K2 mediante western blot a partir de extractos de proteína total. Se utilizó  $\beta$ -actina como proteína constitutiva y control de carga. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

### 5.3 Efecto de FGF23 sobre la expresión de ERK 1/2 en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222

Los resultados de la expresión proteica de ERK1/2 en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222 en combinación con FGF23 (2 ng/mL) mostraron una disminución de la fosforilación del intermediario ERK 1/2, como se puede ver en la figura 34.

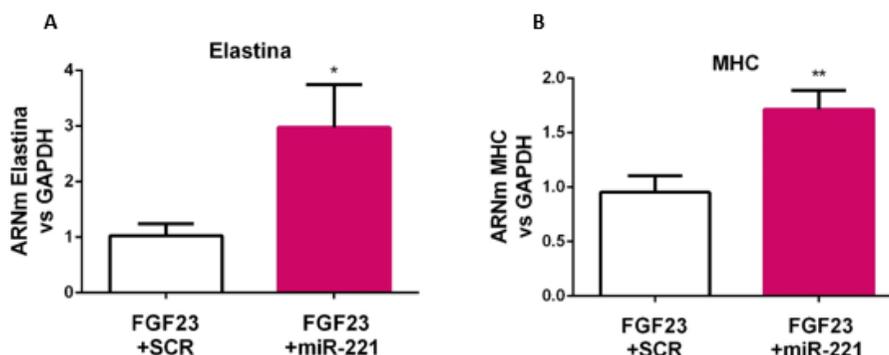


**Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de microRNA 221 y microRNA 222 en CMLV tratadas con FGF23 sobre el intermediario ERK 1/2.** Las CMLV fueron tratadas con FGF23 (2 ng/mL) durante 9 días antes de realizar la transfección de mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222. Las células estuvieron transfectadas durante 48 h y después se procedió a la cuantificación de la expresión de ERK1/2 mediante western

blot a partir de extractos de proteína total. Se utilizó ERK en su forma no fosforilada como proteína constitutiva y control de carga. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

#### 5.4 Análisis de los marcadores de fenotipo contráctil en CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 o mimic microRNA 222

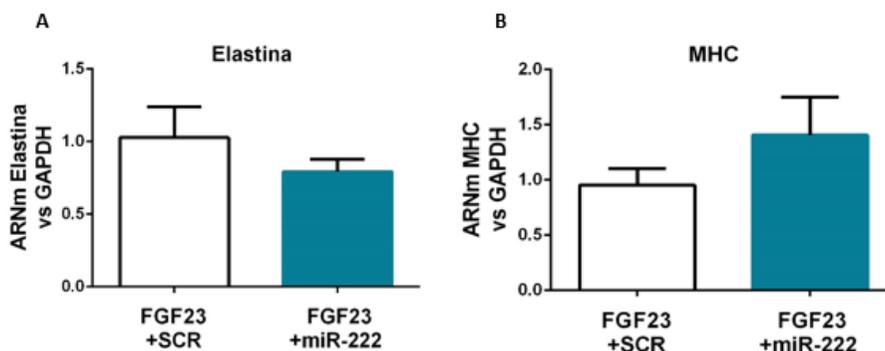
Como se muestra en la figura 35, tras la administración de FGF23 y la transfección del microRNA 221 la expresión de genes específicos de fenotipo contráctil como Elastina y MHC aumentó de forma significativa en comparación con las células control transfectadas con FGF23 y el escramble negativo.



**Figura 35. Efecto de la sobreexpresión de microRNA 221 en CMLV sobre la expresión de los marcadores de fenotipo contráctil.** Las CMLV fueron tratadas con FGF23 durante 9 días antes de realizar la transfección de mimic microRNA 221. Las células estuvieron transfectadas durante 48 h y después se procedió a la cuantificación de la expresión génica de A) elastina y B) MHC. La expresión fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control, las cuales están transfectadas con un escramble negativo (SCR). Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=6/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs grupo control).

Como se muestra en la figura 36, las células transfectadas con mimic microRNA 222 en combinación con FGF23 solo tuvieron una

tendencia a aumentar la expresión de MHC aunque no llegó a alcanzar diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 36. Efecto de la sobreexpresión de microRNA 222 en CMLV sobre la expresión de los marcadores de fenotipo contráctil.** Las CMLV fueron tratadas con FGF23 durante 9 días antes de realizar la transfección de mimic microRNA 222. Las células estuvieron transfectadas durante 48 h y después se procedió a la cuantificación de la expresión génica de A) elastina y B) MHC. La expresión fue normalizada respecto a la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control, las cuales están transfectadas con un escramble negativo (SCR). Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=6/grupo, 3 experimentos independientes, \* $p < 0,05$  vs grupo control).

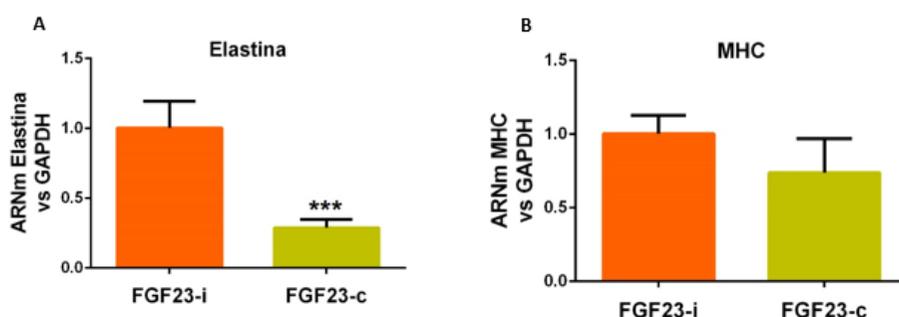
## 6. Estudio comparativo de los efectos de la molécula de FGF23 intacta vs su fragmento C-terminal sobre el cambio de fenotipo de las CMLV

Después de obtener los resultados con la molécula intacta de FGF23, los cuales se han comentado anteriormente, nos preguntamos si el fragmento C-terminal de FGF23 (FGF23-c) podría también promover el cambio de fenotipo de las CMLV. Por esta razón, comparamos los efectos sobre el cambio de fenotipo de las CMLV de la adición de FGF23 intacto con los de la adición de FGF23-c a las mismas concentraciones.

## 6.1 Cambios sobre la expresión génica de genes contráctiles de CMLV

Las células fueron tratadas durante 9 días en presencia de FGF23 (2 ng/ml) ó FGF23-c (2 ng/mL) y a continuación se compararon los niveles de expresión génica de marcadores específicos de fenotipo contráctil como elastina y MHC.

La Figura 37 muestra que la administración de FGF23-c induce un descenso significativo en la expresión de Elastina en comparación con CMLV tratadas con FGF23. En el caso de MHC solo se detectó una tendencia no significativa a disminuir la expresión.



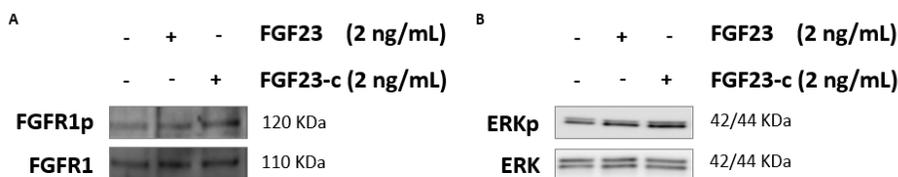
**Figura 37. Efecto de FGF23-c comparado con el de FGF23 sobre la expresión de marcadores de fenotipo contráctil de CMLV.** La expresión génica de los distintos marcadores de fenotipo contráctil de CMLV A) Elastina y B) MHC fue normalizada con la expresión génica de GAPDH y comparada con las células tratadas con FGF23. Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF23 (2 ng/mL) o FGF23-c (2 ng/mL). Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=30/grupo, 3 experimentos independientes, \*p<0,05 ; \*\*\*p<0,001 vs grupo FGF23).

## 6.2 Estudio comparativo de la señalización promovida por FGF23 intacto y FGF23 C-terminal en CMLV

Para evaluar y comparar la señalización que activa tanto FGF23 como FGF23-c para promover el fenotipo sintético en las CMLV se

realizaron estudios de Western Blot para estudiar el papel de la activación de FGFR1 y la ruta ERK 1/2 y. Para ello las células fueron tratadas durante 6 horas en presencia de FGF23 ó FGF23-c.

Tanto la adición de FGF23 (2 ng/mL) como la de FGF23-c (2 ng/mL) promovieron la fosforilación del receptor FGFR1. En este caso observamos en la Figura 38 que el grado de fosforilación del receptor FGFR1 fue mayor tras la administración del fragmento C-terminal que con la molécula intacta. Además, observamos que tanto la administración de FGF23 como la de FGF23-c promueven la fosforilación de ERK 1/2, siendo mayor también la activación en el grupo tratado con FGF23-c.



**Figura 38. Efecto de FGF23 y FGF23-c sobre la activación de receptor FGFR1 y la ruta ERK 1/2 en CMLV.** Las células fueron tratadas con FGF23 (2 ng/ml) ó FGF23-c (2 ng/ml) durante 6 horas con medio sin FBS. A) Expresión proteica de FGFR1. B) Expresión proteica de ERK 1/2. Los niveles de FGFR1 y ERK 1/2 fueron evaluados mediante western blot a partir de extractos de proteína total. Se utilizó FGFR1 y ERK en su forma no fosforilada como proteína constitutiva. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes).

## 7. Efecto de FGF2 recombinante sobre el cambio de fenotipo de las CMLV

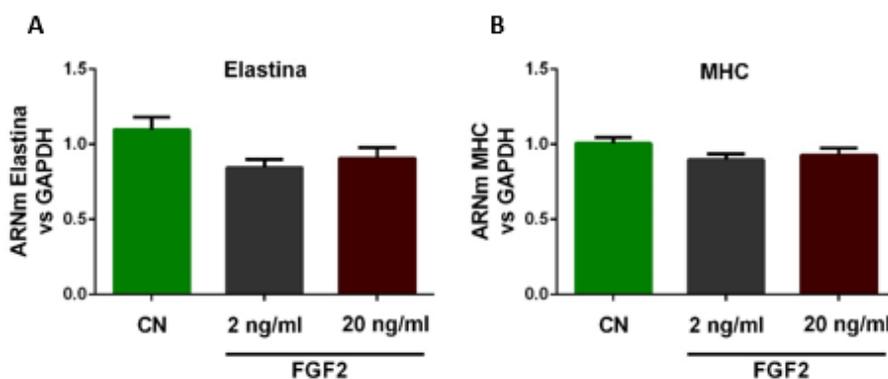
Por último, para conocer si el efecto de FGF23 es común a otras citoquinas de la familia FGF o si es una acción exclusiva del mismo,

comparamos el efecto de FGF2 recombinante sobre el cambio de fenotipo de las CMLV. En primer lugar se evaluó la expresión génica de algunos marcadores de fenotipo contráctil. Posteriormente, se estudió la fosforilación de FGFR1 y la activación de la ruta ERK 1/2.

### 7.1 Cambios sobre la expresión génica de genes contráctiles de CMLV

Las células fueron tratadas durante 9 días en presencia de FGF2 a dos concentraciones diferentes, 2 ng/mL ó 20 ng/mL. A continuación, se evaluó la expresión génica de los marcadores contráctiles habituales mediante RT-PCR.

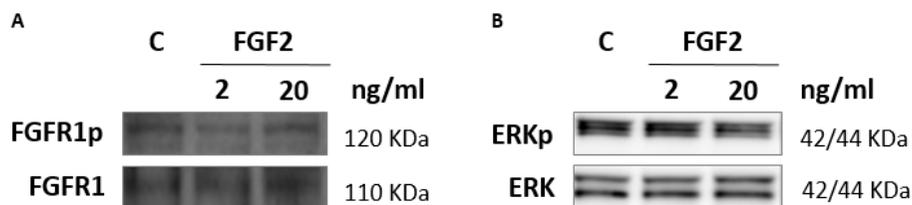
La Figura 39 muestra que la adición de FGF2 no modifica significativamente la expresión de genes contráctiles específicos de CMLV.



**Figura 39. Efecto de FGF2 sobre la expresión génica de los principales marcadores de fenotipo contráctil.** Las CMLV fueron incubadas durante 9 días en presencia de FGF2 (2 ng/mL ó 20 ng/mL). La expresión génica de los distintos marcadores de fenotipo contráctil A) Elastina y B) MHC fue normalizada con la expresión génica de GAPDH y comparada con las células control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=30/grupo, 3 experimentos independientes).

## 7.2 Efecto de FGF2 recombinante sobre activación de FGFR1 y ERK 1/2

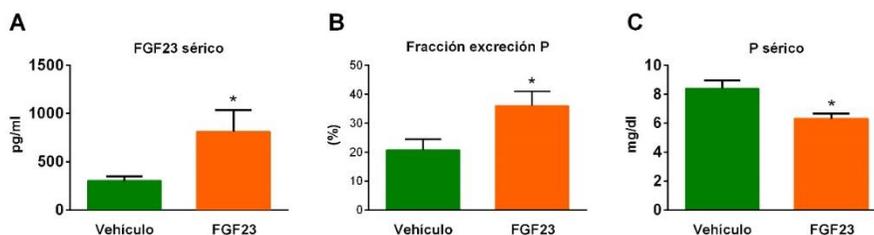
Para evaluar el efecto de FGF2 sobre la activación del receptor FGFR1 y la fosforilación de ERK 1/2, las CMLV se cultivaron en placas de 6 pocillos y fueron tratadas durante 6 horas con medio y sin FBS. Como se observa en la figura 40, la adición de FGF2 no indujo la activación del receptor FGFR1 respecto al grupo control en ninguna de las dos concentraciones estudiadas. Del mismo modo, y respecto a células control, la fosforilación de ERK 1/2 tampoco se vio afectada por la presencia de FGF2.



**Figura 40. Efecto de FGF2 sobre la expresión del receptor FGFR1 y el intermediario ERK 1/2.** Las CMLV fueron tratadas con FGF2 a distintas concentraciones (2 ng/mL ó 20 ng/mL) durante 6 horas con medio sin FBS. A) Fosforilación de FGFR1 y B) Fosforilación de ERK 1/2. Los niveles de FGFR1 y ERK fueron evaluados mediante western blot a partir de extractos de proteína total. Se utilizó FGFR1 y ERK en su forma no fosforilada como proteína constitutiva. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=3/grupo, 3 experimentos independientes).

## Bloque 2: Efecto de altos niveles de FGF23 sobre el cambio de fenotipo de CMLV en aortas de rata

Para este bloque se utilizaron 12 ratas Wistar macho divididas en grupo control (Vehículo, N=6) y grupo experimental (rFGF23, N=6). Tras 14 días de infusión de Vehículo ó FGF23, se midieron distintos parámetros de metabolismo mineral con el objetivo de validar el modelo experimental. En primer lugar, se midieron los niveles plasmáticos de FGF23, la fracción de excreción de fósforo y los niveles de fósforo sérico. Los resultados de la Figura 41 revelan que tras 14 días de tratamiento hubo un incremento significativo en los niveles de FGF23 acompañado de un incremento en la fracción de excreción de P y un descenso en los niveles de P sérico.



**Figura 41. Evaluación de parámetros bioquímicos relativos al modelo experimental de alto FGF23.** Tras finalizar el experimento se utilizó una muestra de suero y otra de orina de cada una de las ratas de ambos grupos para realizar las siguientes mediciones: A) FGF23 sérico, B) Fracción de excreción de fósforo y C) Fósforo sérico. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=6/grupo, 1 experimento independiente, \*p<0,05).

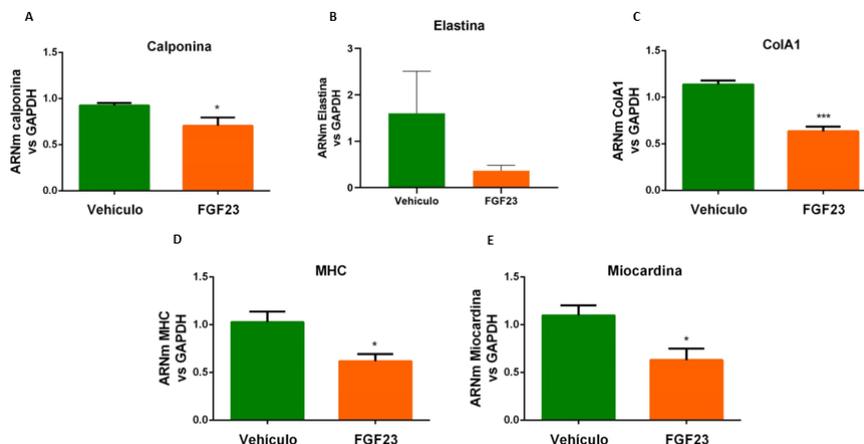
Con respecto a los niveles de creatinina sérica y los valores plasmáticos de PTH y CTR, como se puede observar en la Tabla 17, no hubo ninguna diferencia significativa entre ambos grupos experimentales.

Tratamiento	Creatinina sérica	PTH	CRT
Vehículo	0.52 ± 0.22	52 ± 18.2	215 ± 32
FGF23	0.48 ± 0.14	50 ± 10.9	183 ± 45

**Tabla 17. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal y el metabolismo mineral.**

## **8. Efecto de altos niveles de FGF23 sobre la expresión de marcadores de fenotipo contráctil en aorta torácica de rata**

Para determinar el efecto del elevado FGF23 sobre la expresión de marcadores de fenotipo contráctil se evaluó la expresión de calponina, elastina, ColA1, MHC y miocardina en la aorta torácica de los diferentes grupos estudiados. Como se puede observar en la figura 42, en comparación con las ratas del grupo control, la administración de FGF23 disminuyó significativamente la expresión de calponina, elastina, ColA1, MHC y miocardina en el grupo de ratas con infusión de FGF23.

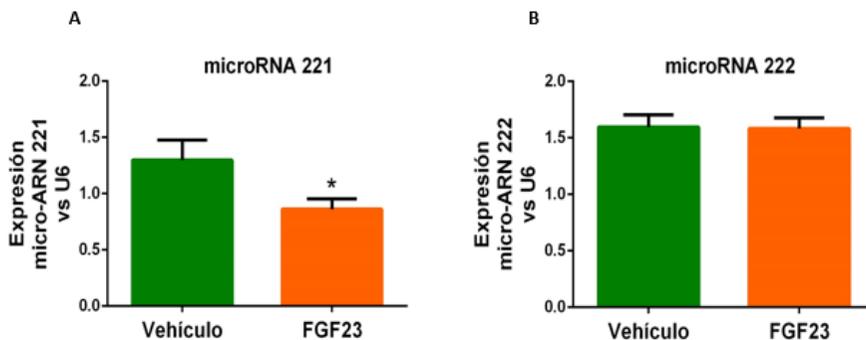


**Figura 42. Efecto de la infusión de altos niveles de FGF23 sobre la expresión génica de marcadores de fenotipo contráctil en células de músculo liso de aorta abdominal de rata.** Las ratas fueron divididas en dos grupos, un grupo control y otro experimental (FGF23: 15 ug/día), durante 14 días. Se midieron los marcadores de fenotipo contráctil mediante RT-PCR de los siguientes genes A) calponina, B) Elastina, C) ColA1 D) MHC y E) Miocardina. La expresión relativa de los genes diana fue normalizada con la expresión génica de GAPDH y comparada con la del grupo control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=6/grupo, 1 experimento independiente, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo control).

## 9. Análisis de los niveles de expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en aorta torácica y en plasma en el modelo experimental de alto FGF23 en ratas

En nuestro modelo animal evaluamos la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222 en aorta torácica. Como se puede observar en la figura 43, encontramos que la expresión de microRNA 221 en aorta abdominal fue disminuida significativamente en las ratas del grupo experimental a las que se les administró FGF23.

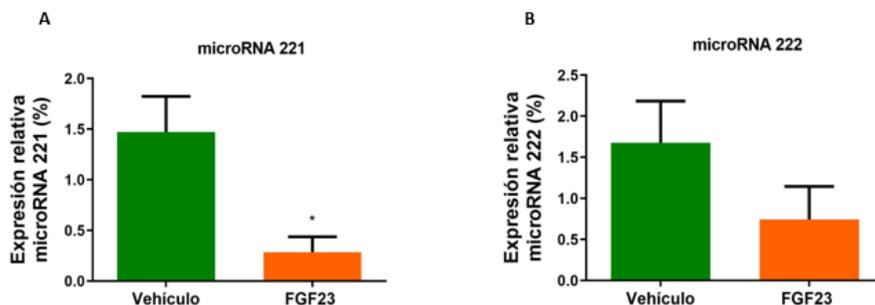
Respecto a la expresión del microRNA 222, observamos que en aorta abdominal claramente se observó que no existían diferencias significativas entre los dos grupos experimentales estudiados.



**Figura 43. Efecto de la infusión de FGF23 sobre la expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en aorta torácica de rata.** Las ratas fueron divididas en dos grupos, un grupo control y otro grupo experimental tratado durante 14 días con FGF23 (15  $\mu\text{g}/\text{día}$ ). En secciones de aorta torácica se evaluó tanto la expresión del A) microRNA 221 como la del B) microRNA 222. La expresión de los microRNAs fue normalizada respecto a la expresión del microRNA U6 y comparada con el grupo de ratas control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=6/grupo, 1 experimento independiente, \* $p < 0,05$  vs grupo control).

Como se puede observar en la figura 44, en nuestro modelo animal también evaluamos la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222 en plasma encontrando que la expresión de microRNA 221 en plasma fue disminuida significativamente en las ratas del grupo experimental a las que se les administró FGF23.

Respecto a la expresión del microRNA 222, observamos que en plasma hubo una tendencia no significativa a disminuir la expresión del microRNA 222 entre los dos grupos experimentales estudiados.

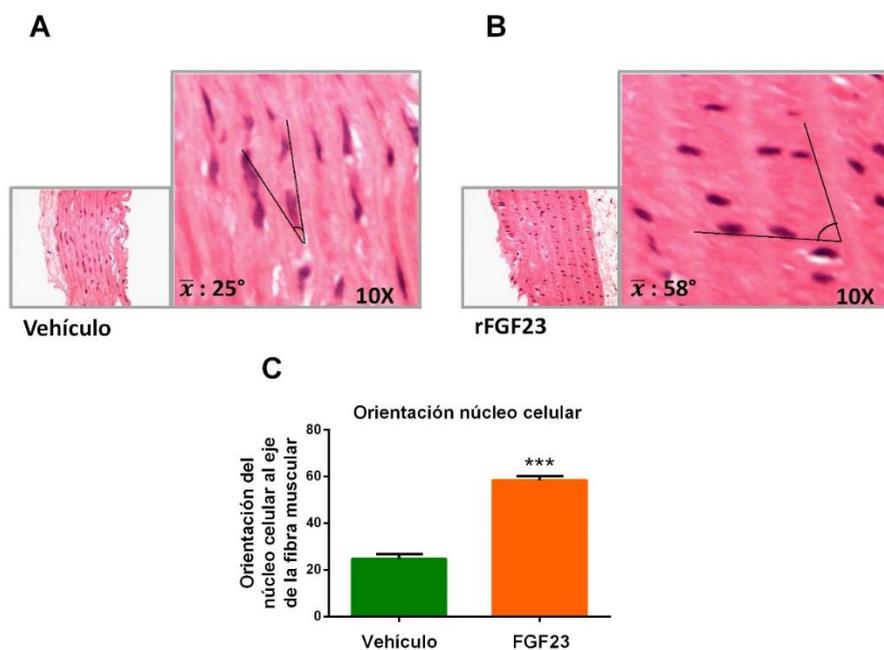


**Figura 44. Efecto de la infusión de FGF23 sobre la expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en plasma de rata.** Las ratas fueron divididas en dos grupos, un grupo control y otro grupo experimental tratado durante 14 días con FGF23 (15 µg/día). En el plasma de cada una de las ratas de ambos grupos se evaluó tanto la expresión del A) microRNA 221 como la del B) microRNA 222. La expresión de los microRNA fue normalizada con la expresión de microRNA 39 y comparada con el grupo de ratas control. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=4/grupo, 1 experimento independiente, \*p<0,05 vs grupo control).

## 10. Cambios histológicos inducidos por el exceso de FGF23 sobre la aorta torácica

Tras realizar una tinción de hematoxilina y eosina en un corte histológico de aorta torácica de rata pudimos observar cambios estructurales entre los dos grupos experimentales estudiados. En primer lugar, como se observa en la Figura 45 en el grupo de ratas tratadas con FGF23 se observó a nivel celular cambios significativos en la orientación de los núcleos de las CMLV dentro de la túnica media. De esta manera, en el grupo control (Vehículo), se observó una orientación de los núcleos de forma paralela a las fibras elásticas de la aorta con un ángulo medio de aproximadamente 25°. Sin embargo, en las ratas tratadas con FGF23 se observó un gran número de núcleos dispuestos de forma no paralela a estas fibras, sino más bien con una orientación

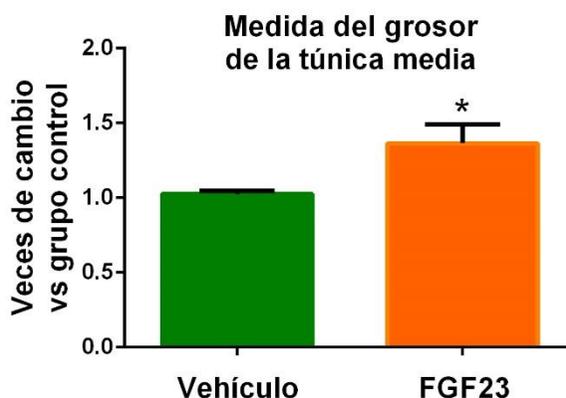
perpendicular a las fibras elásticas y el endotelio. La amplitud media de este ángulo con respecto a las fibras elásticas en los animales con alto FGF23 fue de 58°.



**Figura 45. Análisis histológico del efecto de FGF23 sobre las CMLV de aorta torácica.** Las ratas fueron divididas en dos grupos, un grupo control y otro grupo experimental tratado con FGF23 (15 ug/día) durante 14 días. Se realizaron cortes histológicos de una muestra de aorta torácica (sección proximal) de cada una de las ratas y se tiñeron con hematoxilina y eosina. A) Imagen representativa de rata control e B) imagen representativa de ratas con altos niveles de FGF23. C) Orientación del núcleo celular al eje de la fibra muscular (N=200/grupo, 1 experimento diferente, \*\*\*p<0,001 vs grupo control).

Del mismo modo, como se puede observar en la figura 46, se detectó un incremento del grosor de la túnica media de las aortas correspondientes a animales con infusión de rFGF23. Este incremento

fue estadísticamente significativo representando una aorta torácica de hasta un 30% más ancha que la correspondiente a ratas control.



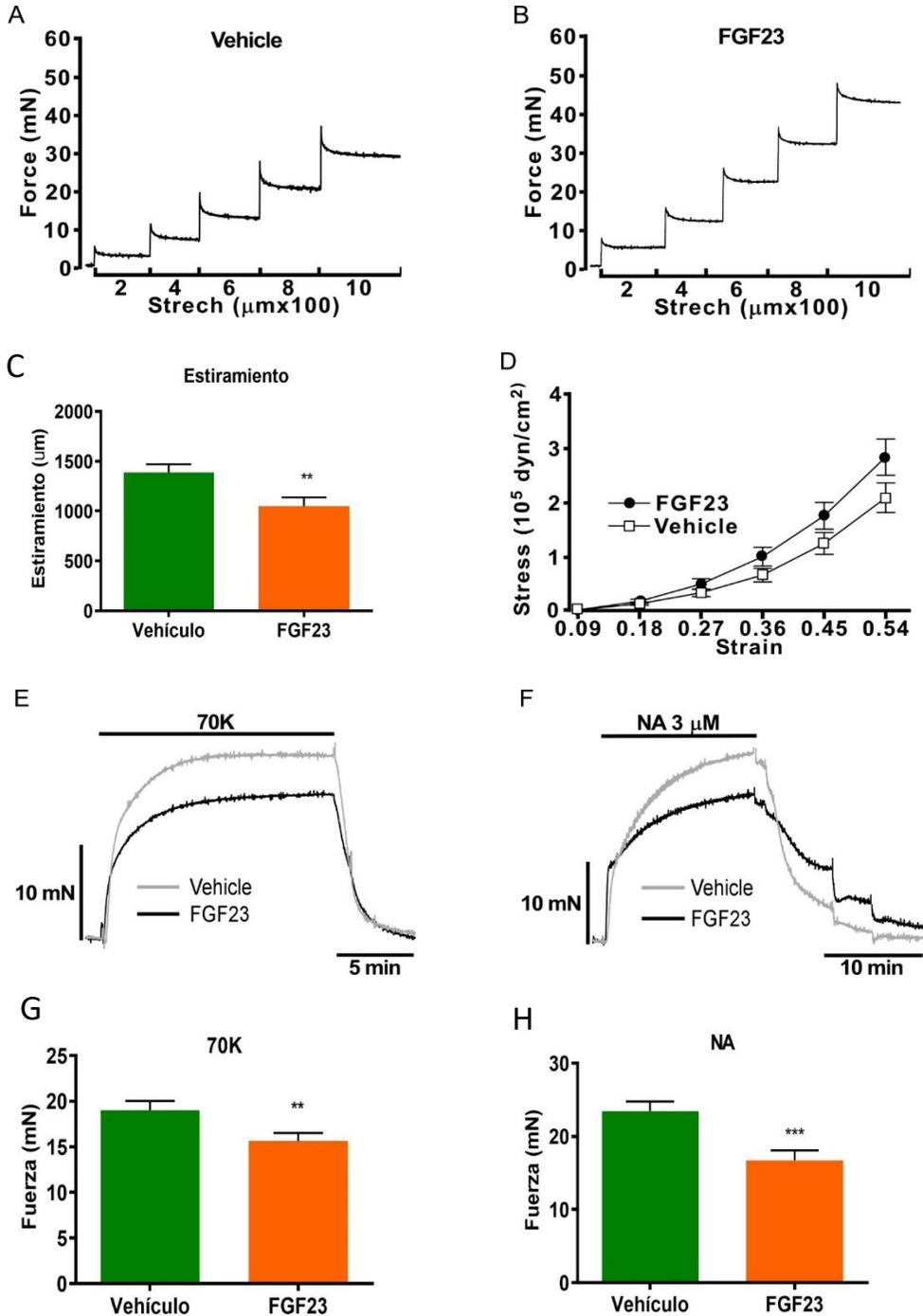
**Figura 46. Estudio del grosor de la túnica media de aorta torácica de rata.** Medida del grosor de la túnica media de la aorta (N=6/grupo, 1 experimento independiente, \* $p < 0,05$  vs grupo control).

## 11. Cambios sobre la rigidez arterial inducida por altos niveles de FGF23

Para analizar si los cambios estructurales descritos anteriormente podrían tener implicaciones funcionales e implicaciones en la rigidez arterial, se realizaron experimentos en un miógrafo de hilo. Inicialmente, los anillos arteriales (2 mm de diámetro) de cada uno de los grupos experimentales estudiados se estiraron mecánicamente utilizando un microposicionador. Simultáneamente, se midieron los cambios en la tensión de la pared (fuerza pasiva) con un transductor de fuerza sensible hasta que la presión transmural alcanzó 100 mm Hg (normalización del vaso). Las figuras 47A y 47B muestran trazos representativos de la fuerza generada en anillos arteriales obtenidos de animales tratados con vehículo o con FGF23 (figura 47A y 47B,

respectivamente). En condiciones de estiramiento similares, la fuerza evocada por los anillos arteriales fue mayor en los animales tratados con FGF23. Además, los anillos arteriales de las ratas a las que se administraron FGF23 necesitaron un menor estiramiento para alcanzar 100 mm Hg de presión transmural que los anillos arteriales de las ratas tratadas con el vehículo (~1387  $\mu\text{m}$ , vehículo; ~1049  $\mu\text{m}$ , FGF23) (Figura 47C). Para garantizar que las alteraciones observadas en las propiedades pasivas se debían a cambios en la estructura de la pared arterial, se realizó un análisis de tensión-deformación. La tensión de la pared aumentó en los anillos de los animales tratados con FGF23 (Figura 47D) Tras la normalización, los anillos arteriales se estabilizaron durante 1h y luego se trataron con agentes vasoactivos: solución de alto  $\text{K}^+$  (70 K, Figura 47E) y noradrenalina (NA, Figura 47F), encontrando efectos vasoconstrictores diferenciales entre las ratas tratadas con vehículo y con FGF23. Los anillos arteriales de las ratas tratadas con FGF23 mostraron una reducción significativa de la respuesta vasoconstrictora a 70K (~19,02 mN en el vehículo y ~ 15,62 mN en el FGF23) o NA (~23,45 mN en el vehículo y ~16,74 mN en el FGF23) (Figura 47G y 47H respectivamente).

## Resultados



**Figura 47. Cambios en la tensión pasiva y activa de la pared arterial inducidos por FGF23 elevado.** Las ratas fueron divididas en dos grupos, un grupo control (4 ratas vehículo, 16 anillos) y otro grupo experimental tratado con FGF23 (15 mg/día) (4 ratas

con FGF23, 16 anillos) durante 14 días. Se realizaron registros representativos durante el proceso de normalización en anillos aórticos de ratas tratadas A) con vehículo o B) con FGF23. C) Estiramiento de los anillos arteriales para alcanzar una presión transmural de 100 mm Hg. D) Relación tensión-estrés en anillos arteriales tratados con vehículo o FGF23. Además, también se realizaron registros representativos de la contracción arterial inducida por (E) 70K o (F) NA en anillos de aorta de ratas tratadas con FGF23 y vehículo. Los análisis cuantitativos de la fuerza isométrica generada en los anillos arteriales están representados en respuesta a (G) 70K o (H) NA. ((N=4/grupo, 1 experimento independiente, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs grupo control, los datos representan la media  $\pm$  SE).

### **Bloque 3: Estudio clínico en pacientes con enfermedad renal crónica 2-3 y síndrome metabólico para estudiar la relación entre altos niveles de FGF23 y rigidez arterial.**

Para evaluar la posible relación entre altos niveles de FGF23 y rigidez arterial se realizó un ensayo clínico en pacientes con ERC 2-3 y síndrome metabólico de acuerdo a las principales características demográficas descritas en la Tabla 14. Se analizaron un total de 71 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión de los cuales 51 fueron hombres y 20 mujeres.

En la Tabla 18 se muestra también además de otros parámetros clínicos relevantes las comorbilidades de los pacientes y el listado de los principales tratamientos concomitantes.

<b>Parámetros</b>	<b>Valor medio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Edad (años)</b>	61	9
<b>Sexo</b>	50 (H) / 20 (M)	-
<b>Perímetro abdominal en hombres (cm)</b>	110.3	10.1
<b>Perímetro abdominal en mujeres (cm)</b>	108	10.1
<b>Peso corporal (Kg)</b>	90.6	13
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	32	4
<b>Presión arterial sistólica (mmHg)</b>	136.3	25.5
<b>Presión arterial diastólica (mmHg)</b>	84.1	16.6
<b>Presión arterial media (mmHg)</b>	108.4	19

<b>Fumadores/ex-fumadores (N/%)</b>	8/24	11/17
<b>Tratamiento de hiperuriremia (N/%)</b>	43	61
<b>Cardiopatía isquémica (N/%)</b>	8	11
<b>Arteriopatía periférica (N/%)</b>	9	13
<b>Eventos cardiovasculares (N/%)</b>	12	17
<b>Tratamiento antidiabético (N/%)</b>	35	49
<b>Tratamiento dislipidemia (N/%)</b>	55	77
<b>Tratamiento antihipertensivo (N/%)</b>	71	100
<b>IECA (N/%)</b>	7	10
<b>BRA (N/%)</b>	61	86
<b>Diuréticos (N/%)</b>	41	58
<b>BCC (D) (N/%)</b>	45	63
<b>BB (N/%)</b>	28	39
<b>BAC (N/%)</b>	31	44
<b>Otros fármacos antihipertensivos (N/%)</b>	4	6

**Tabla 18. Principales características de la población de pacientes con ERC estadio 2-3 y síndrome metabólico (N final de 71).** Las variables cuantitativas que se muestran en esta tabla representan el valor medio de toda la población con su correspondiente desviación estándar. Las variables cualitativas se representan con el número de individuos que la presentan y su correspondiente porcentaje en la población. IMC= índice de masa corporal. IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. BRA: Bloqueantes de receptores de angiotensina. BCC (D): Bloqueantes de los canales de calcio (D). BB: Betabloqueantes. BAC: Bloqueantes alfa central.

Todos los individuos presentaron un filtrado glomerular (estimado por la fórmula CKD-EPI) entre 30 y 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> lo cual corresponden con estadios 2-3 de la enfermedad renal crónica. Además, los sujetos cumplieron al menos tres de los cinco criterios de síndrome metabólico propuestos por la Federación Internacional de la Diabetes: perímetro abdominal elevado, triglicéridos elevados, HDL reducido y alta glucosa en ayunas e hipertensión. Se analizaron pacientes con síndrome metabólico debido a que estos presentan un mayor grado de inflamación y en donde la progresión de la enfermedad renal es más rápida que en pacientes solo con ERC 2-3.

En la tabla siguiente, número 19, se muestran los principales parámetros bioquímicos, tanto en suero como en orina, de la población de pacientes con ERC en estadio 2-3 y síndrome metabólico.

Parámetros	Valor medio	Desviación estándar
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	67	21
<b>Suero</b>		
Creatinina (mmol/L)	0.105	0.036
Urea (mmol/L)	17.1	5.7
Glucosa (mmol/L)	7.14	2.71
Sodio (mEq/L)	139.4	2.4
Potasio (mEq/L)	4.4	0.5
Cloro (mEq/L)	106.1	3.3
Calcio (mmol/L)	2.37	0.07
Fósforo (mmol/L)	1	0.16
Magnesio (mmol/L)	0.8	0.1
Triglicéridos (mmol/L)	1.70	0.74

Colesterol (mmol/L)	4.60	0.96
Colesterol HDL (mmol/L)	1.01	0.23
Colesterol LDL (mmol/L)	2.80	0.83
Albúmina ( $\mu\text{mol/L}$ )	652	30
PCR ( $\mu\text{g/L}$ )	26000	12000-55000
Hierro ( $\mu\text{mol/L}$ )	14.9	6
Ferritina ( $\mu\text{g/L}$ )	74	39-130
PTH (pmol/L)	6.1	4.2-8.5
c-FGF23 (RU/mL)	77	61.8-112.6
<b>Orina (Colección 24 h)</b>		
Creatinina (mg/día)	1402.3	618.4
UNN (g/día)	12.2	4.5
Sodio (mEq/día)	183	76
Potasio (mEq/día)	67	28
Calcio (mg/día)	106	79
<b>Parámetros relativos al P en orina (Colección 24 h)</b>		
Excreción de P (mg/día)	797.2	324.7
FeP (%)	23.3	10
Ratio Excreción de P / FG (mg/día/FG)	13.1	7.1
Ratio P/creatinina (mg/mg)	0.60	0.17
Ratio P/ UNN (mg/g)	66.5	16.3

**Tabla 19. Principales parámetros bioquímicos en suero y orina de la población de pacientes con ERC estadio 2-3 y síndrome metabólico (N final de 71).** Las variables que se muestran en esta tabla representan el valor medio de toda la población con su correspondiente desviación estándar. FG CKD-EPI: Filtrado glomerular en base a la colaboración epidemiológica de la ERC. HDL: Lipoproteína de alta densidad. LDL: Lipoproteína de baja densidad. PCR: Proteína C reactiva. P: Fósforo. FeP: Fracción de excreción de fósforo. UNN: Nitrógeno en la urea urinaria.

A continuación, en la tabla 20, se muestra la velocidad onda de pulso y los principales parámetros hemodinámicos de la población de pacientes con ERC en estadio 2-3 y síndrome metabólico.

Parámetros	Valor medio	Desviación estándar
Presión arterial sistólica central (mmHg)	127	17
Presión arterial diastólica central (mmHg)	87	12
Presión central de pulso (mmHg)	40	11
Presión de pulso periférica (mmHg)	53	13
Frecuencia cardíaca (bpm)	64	10
Velocidad onda de pulso (m/s)	9.1	1.5
Gasto cardíaco (L/min)	3.9	0.7
Índice cardíaco (L/min/m <sup>2</sup> )	1.9	0.4
Resistencia vascular periférica (mmHg/ml)	1.5	0.2

**Tabla 20. Velocidad onda de pulso y principales hemodinámicos de la población de pacientes con ERC estadio 2-3 y síndrome metabólico (N final de 71).** Las variables que se muestran en esta tabla representan el valor medio de toda la población con su correspondiente desviación estándar.

## 12. Efecto de FGF23 sobre los parámetros bioquímicos más relevantes de la ERC

En primer lugar, realizamos la medición de FGF23 C-terminal en plasma. Posteriormente realizamos análisis estadísticos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov encontrando que la distribución de los valores de FGF23 C-terminal de nuestra población no representa una distribución normal ( $p < 0.05$ ). Por tanto, los posteriores análisis de correlación bivariantes se realizaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación Rho de Spearman.

La Tabla 21, muestra el resultado del análisis bivalente entre FGF23 c-terminal y el resto de parámetros bioquímicos analizados. De esta manera, FGF23 c-terminal correlacionó positiva y significativamente con creatinina sérica ( $p=0.000$ ), filtración glomerular (FG CKD-EPI,  $p=0.000$ ) y excreción de fósforo orina 24 h ( $p=0.002$ ). Del mismo modo no se detectó una correlación positiva con parámetros como fósforo sérico ( $p=0.152$ ).

Parámetros	c-Terminal FGF23 (p)	c-Terminal FGF23 (R)
Edad (años)	0.032 *	0.255
Creatinina sérica (mg/dL)	0.000 **	0.483
Fósforo sérico (mg/dL)	0.152	0.173
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.000 **	-0.610
Excreción de fósforo orina 24h (%)	0.002 **	0.450

**Tabla 21. Correlación entre FGF23 C-terminal y principales parámetros bioquímicos en el contexto de la ERC.** La medición de FGF23 fue en una muestra de plasma, la cual se ha correlacionado con parámetros bioquímicos obtenidos a partir de muestras de plasma y de orina (24h) en la población de estudio con pacientes en estadio 2-3 de ERC. (\* correlación significativa a nivel 0.05, \*\* correlación significativa a nivel 0.01; R: Coeficiente de correlación Rho de Spearman).

### **13. Efecto de FGF23 sobre los parámetros clínicos relativos a rigidez arterial**

En el análisis de correlación realizado, como se puede ver en la Tabla 22, FGF23 C-terminal no correlacionó de forma directa con los niveles de presión arterial sistólica y diastólica. Sin embargo, encontramos correlación significativa entre los niveles de FGF23 C-terminal y la presión de pulso periférica ( $p=0.006$ ), siendo esta la diferencia de presión arterial sistólica y presión arterial diastólica. También, FGF23 C-terminal correlacionó significativamente con la presión de pulso central ( $p=0.013$ ) siendo esta la diferencia de presión arterial sistólica central y presión arterial diastólica central con las cuales no hubo correlación significativa directa entre estas variables por separado. Resultó también muy interesante comprobar que FGF23 C-terminal también correlacionó de forma significativa con la velocidad de onda pulso ( $p=0.013$ ). Sin embargo, FGF23 C-terminal no correlacionó con el gasto cardíaco, índice cardíaco y tampoco con la resistencia vascular periférica.

Parámetros	c-Terminal FGF23 (p)	c-Terminal FGF23 (R)
Presión arterial sistólica (mmHg)	0.213	0.154
Presión arterial diastólica (mmHg)	0.300	-0.128
Presión de pulso periférica (mmHg)	0.006 **	0.331
Presión arterial media (mmHg)	0.902	0.01
Presión arterial sistólica central (mmHg)	0.279	0.134
Presión arterial diastólica central (mmHg)	0.311	-0.126
Presión de pulso central (mmHg)	0.013 *	0.303
Velocidad onda de pulso (m/s)	0.013 *	0.303
Gasto cardíaco (L/min)	0.878	0.019
Índice cardíaco (L/min/m <sup>2</sup> )	0.885	0.018
Resistencia vascular periférica	0.819	-0.029

**Tabla 22. Correlación entre FGF23 C-terminal y parámetros relativos a rigidez arterial.** La medición de FGF23 c-terminal se correlacionó con parámetros relacionados con rigidez arterial (Mobil-O graph y Periflux) en la población de estudio con pacientes en estadio 2-3 de ERC y síndrome metabólico. (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; R= Coeficiente de correlación Rho de Spearman).

Finalmente se realizaron varios análisis de regresión lineal múltiple. La Tabla 23 muestra el resultado en el que se utilizó la presión de pulso periférica como variable dependiente ya que es un marcador clásico de rigidez arterial y las variables independientes que se utilizaron fueron edad, filtrado glomerular (FG CKD-EPI) y FGF23 C-terminal. La regresión lineal mostró que FGF23 C-terminal fue un parámetro independiente de rigidez arterial ( $p=0.02$ ).

	Beta *	95% IC	P
<b>Modelo 1</b>			
Edad (años)	0.29	0.055 - 0.736	0.024
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.106	-0.117 - 0.246	0.481
FGF23 C-terminal (RU/mL)	0.340	0.02 - 0.232	0.021
<b>Modelo 2</b>			
Edad (años) <60 / >60	Referencia 0.260	0.54 – 13.4	0.034
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.110	-0.115 – 0.258	0.446
FGF23 C-terminal (RU/mL)	0.410	0.040 – 0.260	0.007

**Tabla 23. Regresión múltiple lineal.** Variable dependiente: presión de pulso periférica. **Modelo 1:** Variables independientes: edad, FG CKD-EPI y FGF23 C-terminal; **Modelo 2:** Variables independientes: edad como variable binaria, FG CKD-EPI y FGF23 C-terminal. Coeficiente de regresión estandarizado (\*) para ambos modelos.

En otro modelo de regresión lineal múltiple, mostrado en la Tabla 24, se utilizó la presión de pulso central como variable dependiente, mientras que la edad, filtración glomerular (FG CKD-EPI) y FGF23 C-terminal como variables independientes. En este caso, FGF23 C-terminal también fue un parámetro independiente de rigidez arterial ( $p=0.016$ ).

	Beta *	95% IC	P
<b>Modelo 1</b>			
Edad (años)	0.102	-0.184 – 0.428	0.428
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.017	-0.154 – 0.172	0.911
FGF23 C-terminal (RU/mL)	0.363	0.023 – 0.213	0.016
<b>Modelo 2</b>			
Edad (años) <60 / >60	Referencia 0.140	-2.550 – 8.910	0.271
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.040	-0.140 – 0.180	0.787
FGF23 C-terminal (RU/mL)	0.400	0.030 – 0.220	0.011

**Tabla 24. Regresión múltiple lineal.** Variable dependiente: presión de pulso central. **Modelo 1:** Variables independientes: edad, FG CKD-EPI y FGF23 C-terminal; **Modelo 2:** Variables independientes: edad como variable binaria, FG CKD-EPI y FGF23 C-terminal. Coeficiente de regresión estandarizado (\*) para ambos modelos.

Un último análisis de regresión lineal múltiple se llevó a cabo utilizando la velocidad de onda de pulso como variable dependiente y la edad, filtración glomerular (FG CKD-EPI), FGF23 C-terminal y presión de pulso periférica como variables independientes. Como se muestra en la Tabla 25, la presión de pulso periférica fue un parámetro independiente de rigidez arterial, mostrando una potente significación estadística con la presión de pulso central.

	Beta *	95% IC	P
<b>Modelo 1</b>			
Edad (años)	0.890	0.133 – 0.151	0.000
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.011	-0.004 – 0.005	0.729
PAM (mmHg)	0.369	0.035 – 0.046	0.001
FGF23 c-terminal (RU/mL)	0.073	0.000 – 0.006	0.027
Interacción FGF23-c x PAM	0.066	0.000 – 0.000	0.015
<b>Modelo 2</b>			
Edad (años) <60 / >60	Referencia 0.784	2.054 – 2.742	0.001
FG CKD-EPI (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.024	-0.008 – 0.012	0.726
PAM (mmHg)	0.323	0.024 – 0.047	0.001
FGF23 C-terminal (RU/mL)	0.311	0.008 – 0.020	0.001
Interacción FGF23-c x PAM	0.150	0.000 – 0.001	0.009

Tabla 25. Regresión múltiple lineal. Variable dependiente: velocidad de onda de pulso.

**Modelo 1:** Variables independientes: edad, FG CKD-EPI, PAM y FGF23 C-terminal;

**Modelo 2:** Variables independientes: edad como variable binaria, FG CKD-EPI, PAM y FGF23 C-terminal. Coeficiente de regresión estandarizado (\*) para ambos modelos.

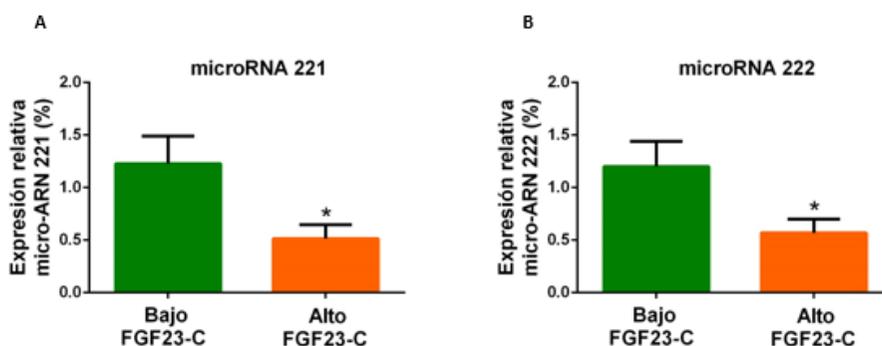
## 14. Efecto de FGF23 sobre la expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en plasma

De la población estudiada, se seleccionaron los pacientes del decil más alto y más bajo de FGF23 c-terminal para comparar los niveles plasmáticos de los microRNA 221 y microRNA 222 relacionados con

rigidez arterial. Para ello se seleccionaron los 7 pacientes con los valores de FGF23 c-terminal más bajos (rango de 34 a 52 pg/ml) y los 7 pacientes con el FGF23 c-terminal más alto (cuyos valores comprenden el rango de 148 a 171 pg/ml).

Los resultados mostrados en la Figura 48 revelan que la expresión relativa de microRNA 221 fue disminuida de forma significativa en el grupo de pacientes con elevado FGF23 C-terminal (Decil 10) en comparación con la expresión del micro-ARN en el grupo con FGF23 C-terminal más bajo (Decil 1).

Del mismo modo, la expresión relativa de microRNA 222 también disminuyó significativamente en el grupo con FGF23 C-terminal más bajo.



**Figura 48. Efecto de FGF23 C-terminal sobre la expresión de microRNA 221 y microRNA 222 en plasma de pacientes con ERC 2-3 y síndrome metabólico.** De toda la población de estudio, se seleccionaron 7 pacientes con los niveles más bajos de FGF23 C-terminal (correspondientes al decil 1, rango 34-52 pg/mL) y otros 7 pacientes con los niveles de FGF23 más altos (correspondientes al decil 10, rango 148-171 pg/mL). A) Expresión relativa de microRNA 221 y B) Expresión relativa de microRNA 222. La expresión de los microRNA fue normalizada con la expresión de microRNA 39 y comparada entre los dos grupos de pacientes seleccionados. Los datos son representados como el valor medio y el error estándar de la media (N=7/grupo, 1 experimento independiente, \*p<0,05 vs grupo control).

#### **Bloque 4: Estudio clínico en pacientes con enfermedad renal crónica 2-3 y síndrome metabólico para estudiar la relación entre FGF23 y la ingesta de P**

Una vez demostrada la relación entre FGF23 y rigidez arterial, el siguiente objetivo que nos propusimos fue valorar, en esta misma cohorte de pacientes, parámetros clínicos que nos permitan conocer cuándo hay un mayor riesgo de rigidez arterial. Dado que el FGF23 no es una medida clínica de rutina disponible en la mayoría de servicios de análisis clínicos de hospitales nos hemos centrado en buscar alguna relación entre los niveles de FGF23 y parámetros relacionados con la ingesta y excreción de P.

#### **15. Efecto de la ingesta de P sobre los parámetros clínicos de P en orina**

La Tabla 26, muestra el resultado de dos análisis bivariantes. En el primero se correlaciona la variable dependiente ingesta de P total con los parámetros clínicos relativos a la absorción de P ingerido (variables independientes). Y en el segundo se hace referencia a la correlación entre la variable dependiente ratio P/UUN con la procedencia del P ingerido, es decir, si se trata de P de origen animal, vegetal o inorgánico (variables independientes).

De esta manera, la ingesta de P total correlacionó con la ratio P/UUN ( $p=0.018$ ), reflejando así el total de P absorbido (en el intestino) y excretado (en la orina) en relación a la cantidad de proteína absorbida y metabolizada. A su vez, el ratio P/UUN correlacionó significativamente con el P inorgánico ( $p=0.005$ ).

Variables	R	Significación (p)
<b>A) Ingesta total de P (mg/día)</b>		
Excreción de P (mg/día)	0.189	0.128
FeP (%)	-0.088	0.484
Ratio Excreción de P/ TFG (mg/día/FG)	-0.032	0.797
Ratio P / Creatinina (mg/mg)	0.110	0.373
UUN (g/día)	-0.11	0.927
Ratio UUN / Creatinina (mg/mg)	-0.088	0.471
Ratio P / UUN (mg/mg)	0.284	0.018 **
<b>B) Ratio P/UUN (mg/g)</b>		
P de origen animal (mg)	0.160	0.189
P de origen vegetal (mg)	0.223	0.066
P inorgánico (mg)	0.332	0.005 **

Tabla 26. Correlación entre A) la ingesta total de P (variable dependiente) con los parámetros clínicos medidos en la colección de orina de 24 h (variables independientes) y B) ratio P / UUN (variable dependiente) con el P ingerido según su procedencia (variables dependientes), en la población de estudio con pacientes en estadio 2-3 de ERC. FeP: Fracción de excreción de fósforo. TFG: CKD-EPI, Filtrado glomerular en base a la colaboración epidemiológica de la ERC. P: Fósforo. UUN: Nitrógeno en la urea urinaria. (\*\* correlación significativa a nivel 0.01; R: Coeficiente de correlación Rho de Spearman).

## 16. Consumo de distintas fuentes de P y valores de FGF23

Como se ha comentado anteriormente, a través de la encuesta dietética realizada a cada uno de los pacientes, se procedió a evaluar no sólo el consumo total de P en la dieta sino a registrar la procedencia del mismo. De esta manera se distingue un consumo de P procedente de

alimentos de origen animal y de origen vegetal (P orgánico) y de origen inorgánico (P inorgánico). Los niveles de cada uno de estos fósforos fueron relacionados con los valores de FGF23 c-terminal encontrando una correlación positiva respecto al P orgánico e inorgánico y no con el P vegetal, como se puede observar en la Tabla 27.

Parámetros	c-Terminal FGF23 (p)	c-Terminal FGF23 (R)
P orgánico	0.022	-0.278
P inorgánico	0.019	0,283
P vegetal	0.904	0.015

Tabla 27. Correlación entre los valores de FGF23 en plasma y los valores de P orgánico, vegetal e inorgánico de la población de estudio con pacientes en estadio 2-3 de ERC.

## 17. Efecto de los parámetros clínicos de P en orina con FGF23 y PTH

Analizamos la relación entre los parámetros de P en orina y las hormonas fosfáticas c-FGF23 y PTH. En la tabla 28 se muestra que la excreción de P en orina de 24 horas, la relación P/Cr en orina y la relación P/UUN no mostraron una correlación significativa con el c-FGF23 o la PTH. Sin embargo, la TFG y el FeP si correlacionaron significativamente tanto con los niveles de c-FGF23 ( $p < 0.001$  y  $p = 0.002$ , respectivamente) como con los de PTH ( $p = 0.05$  y  $p = 0.001$ , respectivamente).

La interpretación es que los niveles circulantes de c-FGF23 y PTH se correlacionan con la carga tubular de P, pero no con la excreción urinaria total de P. Finalmente las concentraciones de otros elementos

en suero como calcio, P, PCR, albúmina o hierro no mostraron una correlación significativa con el c-FGF23 o la PTH (datos no mostrados).

Variables	R	Significación (p)
<b>Excreción de P (mg/día)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	-0.149	0.225
PTH (pg/mL)	-0.096	0.435
<b>Ratio P/Creatinina</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	-0.009	0.938
PTH (pg/mL)	0.148	0.221
<b>Ratio P/UUN</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	-0.022	0.859
PTH (pg/mL)	0.147	0.228
<b>TFG (CDK-EPI)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	-0.534	<0.001 **
PTH (pg/mL)	-0.265	0.050 *
<b>FeP (%)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	0.367	0.002 **
PTH (pg/mL)	0.381	0.001 **

**Tabla 28. Correlación entre los diferentes parámetros clínicos de P en orina de 24 horas (variables dependientes: Excreción de P; Ratio P/Creatinina; Ratio P/UUN; TFG y FeP) con las hormonas fosfáticas FGF23 y PTH (variables independientes) de la población de estudio con pacientes en estadio 2-3 de ERC.**

P: Fósforo. UUN: Nitrógeno en la urea urinaria. TFG: CKD-EPI, Filtrado glomerular en base a la colaboración epidemiológica de la ERC. FeP: Fracción de excreción de fósforo (\* correlación significativa a nivel 0.05; \*\* correlación significativa a nivel 0.01; R: Coeficiente de correlación Rho de Spearman).



## **Discusión**



Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que altos niveles de FGF23 promueven la transición de CMLV, desde un fenotipo contráctil hacia un fenotipo sintético, aumentando así la rigidez arterial y la disfunción vascular. Estos resultados refuerzan la idea de la acción directa de los elevados niveles de FGF23 sobre el sistema vascular explicando la correlación observada con mortalidad cardiovascular. Además, nuestros resultados reflejan que los pacientes que tienen una tasa de filtración glomerular y una FeP más bajas son los más propensos a padecer, de una forma más acusada, los daños que FGF23 provoca a nivel del sistema vascular en pacientes con ERC. Es por esto que son estos pacientes los que deben de tener un cuidado más riguroso con la alimentación para evitar el incremento de FGF23 y sus efectos vasculares perjudiciales.

A nivel celular, nuestros resultados demuestran que elevados niveles de FGF23 modificaron la proliferación celular de las CMLV, obteniendo una mayor proliferación en presencia de altos niveles de esta citoquina. Estos datos no concuerdan con los observados por Nakahara y colaboradores quienes mostraron que FGF23 no tenía un efecto proliferativo sobre las células de aorta de músculo liso humanas<sup>214</sup>. La diferencia entre los datos obtenidos por el grupo de Nakahara y el nuestro podrían ser debidos a que el FGF23 usado en su experimentación está incorporado en el interior celular mediante un adenovirus a diferencia del nuestro, el cual se añade directamente al medio de cultivo y se trata de una molécula de FGF23 recombinante e intacta, ya que hemos utilizado un FGF23 con una mutación en R176Q que impide su ruptura en otros fragmentos. Además, las células del grupo de Nakahara estaban transfectadas con klotho, por lo que las

condiciones no son exactamente iguales. Kawai y colaboradores demostraron también que FGF23 suprime la proliferación de condrocitos en presencia de  $\alpha$ -klotho soluble <sup>215</sup>.

En nuestro caso, FGF23 aumentó los marcadores de proliferación celular como ciclina D1 y PCNA en ausencia de una transfección de klotho. Por tanto, sugerimos que los efectos observados de FGF23 sobre la proliferación celular podrían ser independientes de klotho, existiendo una conexión directa entre FGF23 y proliferación celular.

Estudios realizados por Shalhoub y colaboradores demuestran que FGF23 aumenta la proliferación en células precursoras de osteoblastos (MC3T3) <sup>216</sup>. Al igual que Feng y colaboradores que confirmaron que FGF23 incrementa la proliferación en varias líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y LNCaP) <sup>217</sup>.

Por otro lado, hemos podido comprobar que los altos niveles de FGF23 disminuyen la expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA, característica del músculo liso vascular. Además, FGF23 promovió cambios en la morfología de las CMLV. Las células dejaron de tener forma fusiforme y alargada, característica del fenotipo contráctil, y adquirieron una morfología menos alargada, característica del fenotipo sintético. De esta manera se presupone una pérdida de una de las funciones principales de las células contráctiles como es la regulación del tono vascular para mantener la presión intravascular así como la propia contractibilidad celular <sup>218, 219</sup>.

Aunque el efecto directo de FGF23 sobre la pared vascular no ha sido descrito con anterioridad, Faul y colaboradores han demostrado, tanto en humanos como en modelos animales, que FGF23 no es solo un

biomarcador asociado a riesgo cardiovascular, sino que es un factor patogénico directo que cambia la morfología de cardiomiocitos causando hipertrofia en el ventrículo izquierdo <sup>113</sup>. Apoyando estos resultados, Leifheit-Nestler y colaboradores también relacionaron altos niveles de FGF23 con el aumento del riesgo a desarrollar hipertrofia del ventrículo izquierdo en pacientes con ERC <sup>220</sup>.

En este cambio de fenotipo en CMLV inducido por FGF23, nuestros experimentos mostraron que altos niveles de FGF23 disminuyeron la expresión génica de marcadores específicos de fenotipo contráctil. El Array de microRNA que utilizamos para profundizar en los mecanismos por los cuales altos niveles de FGF23 podrían estar induciendo el cambio de fenotipo de las CMLV desveló que la mayoría de los microRNA estudiados fueron down-regulados en presencia de FGF23. Algunos de estos microRNA down-regulados, como por ejemplo microRNA 23b-3p, microRNA 26a-3p, microRNA 124-3p, microRNA 125a, microRNA 130a-3p, microRNA 133b, microRNA 145-5p, microRNA 181a, microRNA 181b, microRNA 221 o microRNA 222 han sido relacionados previamente incluso, con rigidez arterial <sup>221, 222, 223</sup> y cambio de fenotipo en CMLV <sup>224, 225</sup> sugiriendo así un papel importante de altos niveles de FGF23 sobre la función vascular.

Fue un hallazgo interesante observar que la administración de FGF23 a las CMLV disminuyera no sólo algunos de los microRNAs estudiados sino también la maquinaria de biogénesis de microRNAs. No existen evidencias previas del efecto que tiene FGF23 sobre la maquinaria que se encarga de la biogénesis de los microRNAs. Pero según nuestros resultados, podemos confirmar que la caída de

expresión que FGF23 promovió sobre la biogénesis de microRNAs explica el elevado número de microRNAs descendidos en CMLV.

De los microRNAs que identificamos con un descenso significativo, todos han sido relacionados previamente con disfunción vascular, como por ejemplo microRNA 221, microRNA 222, microRNA 26a<sup>226</sup> y microRNA 145<sup>198</sup>.

De acuerdo con la literatura específica relacionada con el cambio de fenotipo de las CMLV y la rigidez arterial, de todos los microRNA estudiados, los microRNA 221 y microRNA 222 son especialmente interesantes. Tanto el microRNA 221 como el microRNA 222 muestran actividades notables en la red vascular al influir en las propiedades angiogénicas de las células endoteliales<sup>199</sup> y en los cambios fenotípicos de las CMLV<sup>200</sup>. Ambos microRNAs regulan los procesos vasculares esenciales como la angiogénesis<sup>201</sup>, hiperplasia de la neoíntima<sup>227</sup>, cicatrización de heridas del vaso<sup>202</sup>, envejecimiento vascular<sup>203</sup> y remodelado vascular aterosclerótico. Además, también se ha visto que ambos microRNAs están relacionados con procesos tumorales donde hay una excesiva proliferación celular<sup>228</sup>.

Por esta razón decidimos explorar la relación entre los niveles elevados de FGF23 y los microRNA 221 y microRNA 222 en las CMLV. El efecto directo de FGF23 sobre microRNA 221 y microRNA 222 en CMLV es una observación novedosa en nuestro grupo de investigación, la cual está basada en datos experimentales *in vitro* e *in vivo* e incluso en una selección de pacientes en estadio 2-3 de la ERC.

Según nuestros resultados *in vitro*, la ruta de señalización que desencadena FGF23 para promover el cambio de morfología en las CMLV, desde el fenotipo contráctil hacia el fenotipo sintético, se realiza

mediante la fosforilación del receptor FGFR1 con la posterior activación de la cascada de señalización Ras-MAPK, siendo uno de los intermediarios la fosforilación de ERK 1/2. Posteriormente, comprobamos que la inhibición de las proteínas FGFR1 y ERK 1/2 presentes en las CMLV evitó que estas mismas células cambiaran al fenotipo sintético. En esta tesis comprobamos que los efectos de FGF23 intacto sobre el cambio de fenotipo de las CMLV son también producidos por el fragmento c-terminal de FGF23. En este sentido hemos comprobado que este fragmento es más efectivo incluso que el intacto en la fosforilación del receptor FGFR1 y de ERK 1/2 lo cual podría asociarse con una mayor capacidad para promover el fenotipo sintético.

Para examinar la relación entre los microRNAs y la señalización de FG23 a través de FGFR1 y Ras-MAPK, comprobamos que al inhibir el receptor FGFR1, la expresión de microRNA 221 aumentó. Sin embargo, la inhibición del intermediario ERK 1/2 no mostró cambios significativos en la expresión de microRNA 221. Por tanto, podemos deducir que la down-regulación de microRNA 221, como consecuencia de altos niveles de FGF23, se asocia a la fosforilación de FGFR1 y no a la fosforilación del intermediario ERK 1/2. Pudiendo sugerir que la existencia de una proteína o factor podría estar directamente implicado con la fosforilación de ERK 1/2 y con los niveles de microRNA 221 y microRNA 222.

Según bases de datos como TargetScan o mirDB, la proteína MAP3K2 es una diana de los microRNA 221 y microRNA 222. De hecho, nuestros resultados muestran que la administración de FGF23 recombinante, el cual disminuye la expresión de microRNA 221 y microRNA 222, aumenta la expresión génica de MAP3K2.

Para verificar que el efecto de FGF23 sobre la expresión de MAP3K2 se realiza a través de la acción de los microRNA 221 y microRNA 222, nuestros resultados de las CMLV transfectadas con mimic microRNA 221 y mimic microRNA 222 mostraron una disminución en la expresión génica de MAP3K2. Además, las transfecciones de microRNA 221 y microRNA 222 condujeron a una disminución de la fosforilación de ERK 1/2, lo que subraya la relación entre MAP3K2 y ERK 1/2, en el mecanismo por el cual el FGF23 promueve el fenotipo sintético de las CMLV debido a que los niveles elevados de mimic microRNA 221 aumentaron significativamente la expresión de elastina y MHC. Sin embargo, estos efectos no se observaron en las CMLV transfectadas con micmic microRNA 222.

En los experimentos *in vitro*, el papel clave de estos microRNA, sobre todo del microRNA 221, quedó demostrado cuando la administración de FGF23 en CMLV transfectadas con microRNA 221 revertió la expresión génica de la elastina y de MHC, aumentando así su expresión. De tal manera que las células mostraron una recuperación del fenotipo contráctil en presencia de FGF23 y del microRNA 221 transfectado.

Con respecto a nuestros experimentos *in vivo*, podemos confirmar también la existencia de bajos niveles de microRNA 221 en ratas con una infusión exógena constante de FGF23. En nuestro estudio clínico de pacientes con ERC en estadio 2-3, todos con síndrome metabólico, encontramos también una asociación negativa entre el FGF23 sérico y los niveles de microRNA 221 y microRNA 222 en estos pacientes. Los pacientes con los niveles más altos de FGF23-c fueron aquellos con los niveles más bajos de microRNA 221 y microRNA 222.

Estos resultados de nuestro estudio clínico consolidaron aún más los resultados obtenidos, tanto en nuestros estudios *in vitro* como en los experimentos en ratas, en los que demostramos que el efecto de FGF23 sobre las CMLV parece estar mediado por una disminución de estos dos microRNAs.

Sin embargo, existe en la actualidad una gran ambigüedad entre la relación del microRNA 221 y el cambio de fenotipo de las CMLV. Davis y colaboradores mostraron que el cambio de fenotipo de contráctil hacia el sintético de las CMLV, con la consecuente disminución de la expresión de los marcadores de fenotipo contráctil, fue debido al aumento de la expresión de microRNA 221, cuya expresión fue aumentada al doble en tan solo una hora y media después de añadir el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés platelet-derived growth factor). Posteriormente, esos niveles de microRNA 221 fueron descendiendo gradualmente <sup>200</sup>.

En relación con este efecto, a priori contradictorio al nuestro, planteamos la hipótesis de que la respuesta temprana de los estímulos sobre la expresión de microRNA 221 en las CMLV podría diferir a lo largo del tiempo. De tal manera que el microRNA 221 podría estar implicado en el inicio de las primeras etapas de la transdiferenciación de las CMLV disminuyendo finalmente su expresión a medida que las células cambian de fenotipo.

En este mismo sentido, Mackenzie y colaboradores mostraron un aumento de los niveles de los microRNA 221 y microRNA 222, los cuales actúan sinérgicamente para aumentar los niveles de calcificación en estas células. Pero posteriormente observaron una down-regulación de ambos microRNAs en CMLV ya calcificadas. Por lo que sugieren que

estos microRNAs pueden estar implicados en el inicio de las primeras etapas de la transdiferenciación celular y que su expresión se reduce a medida que las células progresan hacia un fenotipo osteo/condrogénico <sup>191</sup>.

Esta teoría está respaldada por Wu y colaboradores que mostraron que la up-regulación de varios microRNAs, entre ellos el microRNA 222, coordina los programas de diferenciación celular desde una etapa inicial, en concreto, desde células madre embrionarias humanas. Posteriormente, a medida que estas células se van diferenciando hacia neuronas maduras, va disminuyendo la expresión de estos microRNAs <sup>229</sup>.

Es muy interesante estudiar cómo hay otros estudios que muestran un efecto pro-sintético en las CMLV a través del aumento del microRNA 221. Como por ejemplo, un estudio de Liu y colaboradores que demuestra que la sobreexpresión de los microRNA 221 y microRNA 222 tiene un efecto proliferativo y de migración, característico del fenotipo sintético de las CMLV <sup>230</sup>.

Este hecho podría explicarse por el hecho de que las CMLV provienen de un tipo diferente de arterias como la carótida <sup>230</sup> o las arterias pulmonares <sup>200</sup>, donde los requerimientos de contracción, mantenimiento del tono vascular, elasticidad y distensión son diferentes a los de la aorta. Davis y colaboradores demostraron que la administración de PDGF a las CMLV pulmonares aumentaba el microRNA 221 promoviendo el fenotipo sintético de estas células <sup>200</sup>. Los datos no mostrados de nuestro laboratorio mostraron que en las CMLV de la aorta humana, la administración de PDGF a 20 ng/ml disminuyó la expresión de microRNA 221 y la expresión de los genes

contráctiles después de 24 horas. Por lo tanto, se necesitan más estudios para dilucidar los efectos de los microRNAs en los diferentes tipos de células.

El mecanismo por el cual FGF23 interfiere en la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222, no está claro. Consideramos también que el amplio espectro de microRNAs disminuidos y los efectos sobre la biogénesis de microRNAs podrían estar relacionados. Además, de acuerdo a publicaciones existentes podrían discutirse tres mecanismos adicionales a través de los cuales FGF23 podría disminuir los niveles de microRNA 221 y microRNA 222.

En primer lugar, cabe citar la posible participación de estrógenos. Estas hormonas juegan un papel importante en la fisiopatología cardiovascular ya que existen evidencias clínicas que demuestran que las mujeres en edad fértil están protegidas contra enfermedades cardiovasculares, protección que desaparece cuando los ovarios dejan de producir estas hormonas durante la menopausia. Y parece ser que los estrógenos ejercen este efecto de protección mediante receptores específicos presentes en la membrana celular de las CMLV <sup>231</sup>. Se ha descrito, además, que el receptor de estrógenos es un modulador negativo de la expresión del cluster microRNA 221/222 a través del reclutamiento de varios correpresores transcripcionales <sup>204</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que el estradiol, por un lado aumenta la rigidez arterial <sup>232</sup>, y por otro lado, promueve el cambio de fenotipo de contráctil al sintético de las CMLV aórticas <sup>233</sup>, probablemente a través de la down-regulación de microRNA 221. Finalmente, existen varios trabajos en los que se pone de manifiesto la relación entre FGF23 y estradiol <sup>234</sup>.

Otro posible mecanismo implicado en la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222 puede estar relacionado con el efecto del estrés del retículo endoplásmico de las células, ya que se ha documentado que durante el estrés del retículo endoplásmico se produce una down-regulación de ambos microRNAs<sup>235</sup> y que ese estrés puede ser mediado por la activación de un complejo de diana de la rapamicina (mTOR, del inglés mammalian target of rapamycin complex)<sup>236</sup>. Nuestro grupo ha observado una relación directa entre FGF23 y la activación de mTOR<sup>237</sup>. Además, otros autores han explorado el papel de la activación de mTOR en el cambio de fenotipo de las CMLV<sup>238</sup>. Por lo tanto, podríamos sugerir que el efecto de altos niveles de FGF23 sobre la activación de mTOR podría promover el estrés del retículo endoplasmático y la consecuente down-regulación de los microRNA 221 y microRNA 222. Por lo que este mecanismo podría también contribuir a explicar el cambio de fenotipo de las CMLV inducido por el FGF23.

Un tercer mecanismo podría ocurrir a través de la participación de una molécula de RNA no codificante de longitud larga, KCNQ1OT1, que afecta a la migración, la proliferación, la inflamación y la hiperplasia de las CMLV a través de su interacción con el microRNA 221<sup>239</sup>. Sunamura y colaboradores han demostrado que la  $\beta$ -catenina puede promover la transcripción de KCNQ1OT1 a través de su unión directa al promotor de KCNQ1OT<sup>240</sup>; y curiosamente, varios trabajos describen un papel inductor del FGF23 de la  $\beta$ -catenina<sup>241</sup>. Por lo tanto, el FGF23 a través de la  $\beta$ -catenina podría aumentar la expresión del RNA no codificante de longitud larga KCNQ1OT1 y desregular a microRNA 221, por lo que podría estar relacionado este mecanismo con la rigidez arterial de las CMLV de la aorta.

Independientemente del mecanismo por el que FGF23 desregula la expresión de los microRNA 221 y microRNA 222, el cual se debería de estudiar en más profundidad, nuestros resultados indican que la desregulación de ambos microRNAs, podría estar implicada en la disminución de la elasticidad de la pared vascular y en el incremento de la rigidez arterial observada en nuestros experimentos.

Como se ha mencionado ya, FGF23 promueve su efecto sobre las CMLV a través de la fosforilación de FGFR1 y ERK 1/2. Este efecto sobre la actividad MAPK en CMLV ya había sido descrito por otros autores. Jimbo y colaboradores evaluaron el efecto de FGF23 sobre la fosforilación de ERK 1/2 en CMLV de rata. El resultado fue que no se produjo la fosforilación de este intermediario, ya que sus células no expresaban klotho. Posteriormente, en otro experimento, sobreexpresaron klotho de membrana en las CMLV con el objetivo de facilitar y ayudar la señalización promovida por FGF23 en estas células. Como resultado obtuvieron que ERK 1/2 fue fosforilado por el efecto de FGF23, confirmando así que la presencia de klotho es necesaria para la señalización de FGF23. Además, esta señalización también está ocasionada mediante la activación del receptor FGFR1 <sup>152</sup>.

La interacción de FGF23 con FGFR1 también se ha descrito en células diferentes a las CMLV, tanto dependiente como independientemente de klotho. Por un lado, Canalejo y colaboradores demostraron que en células paratiroideas, donde se expresa klotho, FGF23 activa el intermediario ERK 1/2 mediante la activación del receptor FGFR1 <sup>242</sup>. Además, Gattineni y colaboradores demostraron que FGF23 interacciona con FGFR1 en células renales, las cuales son las principales células donde se expresa klotho <sup>243</sup>. También, Shalhoub y

colaboradores demostraron que FGF23 aumenta la expresión de FGFR1 en osteoblastos en presencia de klotho soluble <sup>216</sup>.

La interacción de FGF23 con FGFR1, en células diferentes a las CMLV, también se ha demostrado de manera independiente a klotho. Por ejemplo, Bianchi y colaboradores demostraron que FGF23 contribuye al mantenimiento del fenotipo de condrocitos mediante la estimulación de FGFR1 independientemente de klotho <sup>244</sup>.

Datos no incluídos en esta tesis verificaron que la administración de klotho no indujo una mayor activación del receptor FGFR1 ni fosforilación de ERK 1/2. Tampoco modificó el fenotipo de las CMLV tratadas con FGF23. Por lo que podríamos sugerir que los niveles altos de FGF23 tienen un efecto fisiopatológico sobre el tejido vascular independiente de Klotho. Aunque es cierto que, en la actualidad, la expresión de klotho en CMLV es motivo de discusión y debate. Lim y colaboradores defienden que las CMLV expresan klotho y sugieren que en el cambio de morfología de estas células, desde un fenotipo contráctil hacia un fenotipo sintético, podría estar motivado por la pérdida de expresión de Klotho siendo un factor clave en el mantenimiento de la integridad de las CMLV <sup>151</sup>.

Las acciones de FGF23 sobre la actividad Ras-MAPK también ha sido descrita en otros tipos celulares. Por ejemplo, Andrukhova y colaboradores mostraron que los efectos promovidos por FGF23 en células renales están mediados por la fosforilación del intermediario ERK 1/2 <sup>245</sup>. Yamazaki, también mostró esta señalización promovida por FGF23 pero en células embrionarias de riñón. <sup>246</sup>

Otros receptores de FGF23 como FGFR4 son también activados por altos niveles de FGF23 en otros tipos de células. Gattineni et al

demonstraron que el receptor FGFR4 es activado por FGF23 en células renales <sup>243</sup> y Grabner demostró que FGF23 puede activar a FGFR4 en miocitos cardíacos en ausencia de su correceptor de klotho <sup>247</sup>. Singh demostró que FGF23 puede activar FGFR4 en hepatocitos, en este caso en presencia de  $\beta$ -klotho <sup>248</sup>.

En relación con nuestros experimentos realizados *in vivo*, la relación estiramiento/fuerza exhibida por los anillos arteriales durante la normalización indicó que las arterias de las ratas tratadas con FGF23 requerían menos estiramiento para alcanzar 100 mmHg de presión transmural en comparación con las arterias de las ratas control. Con este resultado podemos sugerir que las arterias patológicas eran más resistentes a la distensión, lo que podría ser consecuencia de una mayor rigidez de la pared arterial.

En consonancia con este cambio en la respuesta pasiva, la tensión activa de la pared, o la fuerza ejercida por la pared del vaso durante la contracción de las CMLV, se redujo en las arterias patológicas.

Dado que la VOP está relacionada con las propiedades elásticas intrínsecas de los biomateriales de la pared arterial, el aumento observado en la VOP en los pacientes con ERC podría estar relacionado con una reducción de la distensibilidad de las arterias como consecuencia de una mayor rigidez. El aumento de la rigidez arterial observado en condiciones patológicas podría facilitar la reflexión temprana de las ondas, amplificando la presión aórtica sistólica y reduciendo la diastólica, con el consiguiente aumento de la presión del pulso <sup>249</sup>.

Estos cambios también podrían estar relacionados con las modificaciones histológicas observadas en las aortas torácicas de las ratas tratadas con FGF23. Los cambios en la orientación de los núcleos de las CMLV y en el grosor de la túnica media podrían ser una consecuencia de la transición fenotípica de las CMLV, que conduce a la rigidez arterial. Este cambio en la orientación de los núcleos también se observó en las CMLV con fenotipo sintético de aortas de pacientes con aortopatía asociada a estenosis valvular <sup>250</sup>, lo que sugiere que este cambio en la morfología de las CMLV podría ser una respuesta a factores hemodinámicos o a tensiones de tracción <sup>251</sup>.

Según varios estudios de otros autores se demostró que otro factor de la misma familia como FGF2 era capaz de producir hipertrofia en cardiomiocitos a través de los receptores FGFR y mediante la activación de rutas de señalización comunes a las que FGF23 activa para producir esta patología a nivel de la vasculatura <sup>113, 252, 253</sup>. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el FGF2 no tiene el mismo efecto sobre el cambio de fenotipo que sufren las CMLV que cuando están en presencia de niveles altos de FGF23. FGF2 no activa la ruta ERK 1/2 a través de FGFR1 en las CMLV, como sí ocurre en el caso de FGF23, ni tampoco produce cambios significativos en la expresión de los genes contráctiles de las CMLV. Por lo que nuestros resultados confieren un alto grado de exclusividad a FGF23, ya sea en su forma intacta o en su fragmento C-terminal, sobre el cambio de fenotipo de las CMLV del contráctil hacia el sintético promoviendo la aparición de enfermedades cardiovasculares en pacientes con ERC.

Al igual que ha sido observado *in vitro*, los modelos animales han mostrado un descenso significativo de los niveles de microRNA 221. Sin

embargo, en este caso, los niveles de microRNA 222 no resultaron ser modificados significativamente. Los animales tratados con FGF23 no presentaron una reducción en la expresión de microRNA 222 de la aorta ni en los niveles plasmáticos de microRNA 222. Esto significa una diferencia respecto a lo encontrado *in vitro* o en pacientes. En general, el origen de los microRNAs circulantes está siendo un tema de intenso debate. Se desconoce si los microRNA circulantes se generan a partir de células muertas y lisadas o por la liberación de microRNA en el microambiente circundante <sup>254</sup>, alternativamente a través de exosomas que contienen microRNA <sup>255</sup>. La respuesta inmunitaria del huésped o las reacciones inflamatorias también podrían afectar a la degradación del microRNA. En este sentido, Waters y colaboradores demostraron que en ratones con trasplante de células tumorales, el microRNA 221 estaba incrementado en el tejido tumoral, mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles circulantes de microRNA 221 en los animales con tumor trasplantado frente a los controles <sup>256</sup>.

En relación con el estudio clínico, los pacientes en estadio 2-3 de la ERC presentaban niveles de fósforo sérico normales, como era de esperar y, elevación moderada de los niveles de FGF23-c. No encontramos ninguna correlación entre los niveles de FGF23-c y la presión arterial sistólica o diastólica. Sin embargo, pudimos comprobar la existencia de una correlación positiva entre los niveles de FGF23-c y la presión de pulso central y periférica, las cuales están asociadas con la hipertrofia del ventrículo izquierdo <sup>257</sup>. Además, niveles de FGF23-c también correlacionaron con el aumento de la velocidad de onda de pulso. Tanto la presión de pulso periférica como la velocidad de onda de pulso son marcadores de la rigidez arterial <sup>258</sup> y disfunción vascular.

Por lo que sugerimos la posible asociación entre rigidez arterial y altos niveles de FGF23, los cuales están probablemente relacionados con una reducción de la elasticidad de la pared vascular.

El análisis de regresión lineal múltiple mostró también una asociación independiente entre FGF23-c y la presión de pulso central, presión de pulso periférica y la velocidad de onda de pulso. Por lo tanto, podemos confirmar con este tipo de análisis que altos niveles de FGF23 quizás promueven la rigidez de los vasos probablemente a través del cambio de fenotipo de las CMLV de contráctil al sintético.

Estos resultados aumentan aún más las evidencias contrastadas por otros estudios anteriores de que los niveles altos de FGF23 se encuentran asociados a mortalidad en pacientes con ERC debido a un aumento del riesgo cardiovascular <sup>259</sup>.

Resultados similares fueron obtenidos por Mirza y colaboradores aunque utilizaron una población de pacientes con estadio mucho más avanzado de ERC. De esta manera, demostraron una asociación entre altos niveles de FGF23 y rigidez arterial en sujetos con un valor inferior a 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> de tasa glomerular <sup>132</sup>, proponiendo la rigidez arterial como un marcador clave en la mayoría de los pacientes que tienen la ERC.

Por otro lado, un aumento de la rigidez arterial puede ocasionar calcificación arterial, por lo que la rigidez arterial podría ser considerada como un marcador pronóstico de calcificación vascular y mortalidad en pacientes en hemodiálisis <sup>260</sup>. Una de las causas que podría relacionarse con el desarrollo de calcificación vascular es el aumento de los niveles de FGF23. Sin embargo, este hecho no ha sido aún demostrado. Por un lado, existen estudios que muestran la ausencia de relación del FGF23

con la aparición de calcificaciones vasculares <sup>261, 156, 262</sup>, mientras que, por otro lado, existen evidencias opuestas. El estudio de Nakayama y colaboradores apoya la relación entre los elevados niveles de FGF23 con la aparición de calcificaciones vasculares en pacientes con ERC, confirmando que esta relación aumenta en dichos pacientes a medida que la función renal empeora <sup>152, 154</sup>.

En el contexto de la uremia, los efectos *in vivo* de niveles elevados de FGF23 sobre el endotelio ya han sido descritos en diferentes trabajos <sup>263, 264</sup>. Sin embargo, aún no se ha explorado el efecto específico de FGF23 sobre la contractibilidad de las CMLV.

El estudio de la relación entre FGF23 y rigidez arterial podría ser de utilidad para reducir la morbilidad cardiovascular que presentan los pacientes con ERC mediante la disminución de los altos niveles de FGF23 <sup>265, 266</sup>. Por lo que FGF23 podría ser un biomarcador para predecir el riesgo vascular en una etapa temprana de la ERC, incluso podría ser una diana terapéutica dirigida a prevenir el incremento de la rigidez arterial. Sin embargo, la valoración clínica de los niveles de FGF23 no está aún disponible por lo que de momento la utilidad clínica es baja. Por esta razón se procedió a investigar otros parámetros clínicos que puedan ser útiles para estimar altos niveles de FGF23 y hábitos alimenticios que contribuyen a su incremento.

Dado que FGF23 es una hormona fosfatúrica, resulta lógico pensar que sus niveles deben estar correlacionados con la cantidad de fósforo excretado en orina y este, a su vez, con la ingesta de P que se haya tenido. Según nuestros resultados, al igual que han demostrado otros estudios <sup>50</sup>, la ingesta de P no se correlacionó con la cantidad de P excretado ni con ninguno de los demás parámetros de P en orina

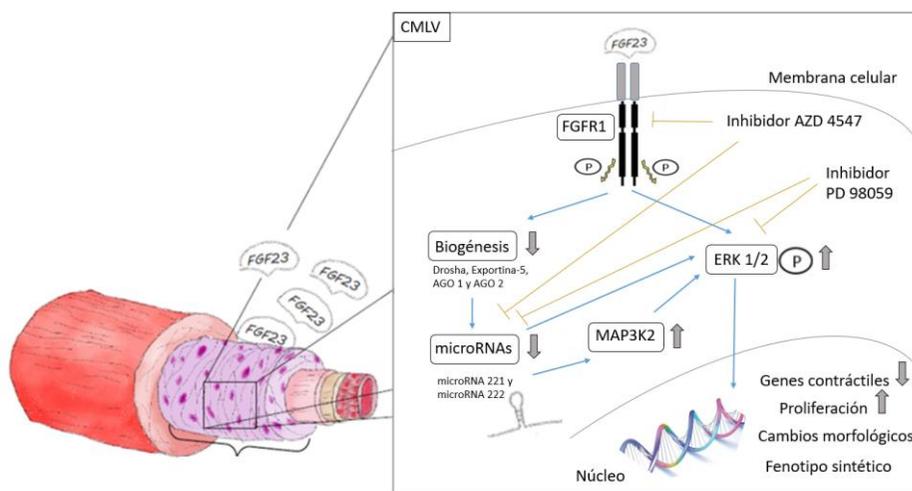
estudiados, a excepción del ratio P/UUN, que sí correlacionó. El ratio P/UUN refleja el P total absorbido en el intestino y excretado por la orina relativo a la cantidad de proteína absorbida y metabolizada. Nuestros resultados muestran que existe una relación entre el ratio P/UUN y la cantidad de P inorgánico ingerido. Por lo tanto, sugerimos que aquellos pacientes que tengan una ingesta de P, cuya proporción de P inorgánico sea mayor que la del P procedente de las proteínas serán más propensos a tener un ratio P/UUN elevada. Esto es debido a que la absorción intestinal del P procedente de proteínas es mucho menor (sobre todo la de origen vegetal, la cual es aún menor que la de origen animal <sup>46</sup>) que la absorción intestinal del P inorgánico, la cual es prácticamente del 100% <sup>42, 43</sup>.

Por esta razón, pensamos que el ratio P/UUN y varios parámetros similares relacionados con el P en orina podrían tener correlación con los niveles de FGF23 en los pacientes con ERC en estadio 2-3. Los niveles séricos de FGF23 no correlacionaron con la cantidad total de P excretado en orina. Sin embargo, FGF23 sí correlacionó con la tasa de filtración glomerular y con la FeP, sugiriendo así que es la carga de P en relación con la tasa de filtración lo que determina la estimulación de FGF23. Es decir, que el grado de insuficiencia renal determina la cantidad de FGF23 y PTH necesaria para excretar un exceso de ingesta de P. Además, demostramos que los niveles de FGF23 correlacionan con la cantidad de P animal e inorgánico procedente de la dieta. Esta asociación es de gran relevancia clínica de manera que podríamos establecer criterios que nos permitan ponderar el consumo de P y su fuente para advertir del posible riesgo cardiovascular derivado de los presumibles altos niveles de FGF23.

En la actualidad, no está claro si el P de la dieta debería restringirse en los pacientes con ERC en estadio 2-3 con niveles de P normales. Pero lo que sí es verdaderamente importante educar a los pacientes para que seleccionen alimentos sin aditivos de P <sup>267</sup>. Ciertamente, un P sérico dentro del nivel alto del rango normal de laboratorio (<1,45 mmol/L) es un factor de riesgo para la calcificación vascular <sup>268</sup>. Un argumento a favor de la restricción dietética de fuentes específicas de P es el hecho de que la carga tubular de P se asocia con un aumento tanto del FGF23 como de la PTH, que se observa antes de que haya un aumento significativo de la concentración sérica de P así como que FGF23 correlaciona con la ingesta de P animal e inorgánico. Algunos autores indican que un aumento progresivo de FGF23 predice una rápida progresión de la enfermedad renal y la mortalidad <sup>52</sup>. Además, como se ha podido ver a lo largo de toda la tesis doctoral, el efecto de altos niveles de FGF23 produce cambios patológicos en el sistema cardiovascular.

En definitiva, como se puede apreciar en la figura 49, las moléculas de FGF23 interaccionan de forma específica con el receptor de membrana FGFR1 de las CMLV, las cuales se localizan en la túnica media de las arterias. Tras esta interacción se produce una disminución de microRNAs algunos de ellos importantes en el mantenimiento del fenotipo de las CMLV y el remodelado vascular como el microRNA 221 y microRNA 222. Estos miRNAs son diana de la proteína MAP3K2 la cual puede promover la posterior fosforilación de Erk1/2. FGF23 activa notablemente la ruta de señalización intracelular Ras-MAPK. Finalmente, la señal llega al núcleo celular y se modula la actividad celular, produciéndose una disminución de los genes contráctiles, un

aumento de la proliferación y cambios en la morfología celular que promueven el desarrollo de rigidez arterial.



**Figura 49. Altos niveles de FGF23 C-terminal promueven la rigidez arterial y el cambio de fenotipo de las CMLV induciendo daño vascular.**

En conclusión, nuestros datos sugieren que un componente de riesgo cardiovascular y mortalidad en pacientes con ERC podría ser atribuido a la acción de FGF23 sobre el fenotipo de las CMLV resultando en un incremento de la rigidez arterial. En etapas tempranas de la ERC, altos niveles de FGF23-c podrían ser útil para identificar pacientes con más alto riesgo de desarrollar rigidez arterial y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, aún queda mucho por descubrir de todo este proceso fisiopatológico al que cada vez se suman un mayor número de factores, como es el caso de los microRNA 221 y microRNA 222. Por lo que cada vez es más necesaria una investigación en profundidad que esté focalizada en la evaluación del papel de los microRNAs con respecto a los cambios estructurales fisiológicos y patológicos en las CMLV.

## Discusión

Para promover una traslación clínica rápida de estos resultados parece recomendable controlar los niveles de FGF23 en aquellos pacientes con una alta ingesta de P (sobre todo orgánico de origen animal e inorgánico) y una mayor caída de la tasa de filtración glomerular y de la FeP ya que serían indicadores de un mayor aumento de FGF23 y de un aumento de la disfunción vascular.



# Conclusiones



La conclusión general de nuestro estudio es que los elevados niveles de FGF23 inducen la transición de fenotípica de las CMLV desde un fenotipo contráctil a otro sintético promoviendo el incremento de la rigidez vascular. Los altos niveles de FGF23 se asocian a la carga de fósforo y correlacionan con el consumo de fósforo orgánico de origen animal e inorgánico.

Este efecto del exceso de FGF23 sobre la vasculatura subraya su efecto directo sobre la enfermedad cardiovascular y la mortalidad del paciente con ERC.

De forma pormenorizada las conclusiones específicas de la tesis son las siguientes:

1. Altos niveles de FGF23 intacto modifican el fenotipo de las CMLV desde el fenotipo contráctil al sintético el cual se asocia con disfunción vascular.
2. Altos niveles de FGF23 modifican la biogénesis de microRNAs como por ejemplo el microRNA 221 y el microRNA 222 directamente relacionados con el remodelado vascular.
3. La acción de FGF23 sobre las CMLV está mediada por la activación del receptor FGFR1, la fosforilación de ERK 1/2 y la disminución de la proteína MAP3K2.
4. El cambio de fenotipo de las CMLV es desarrollado tanto por FGF23 intacto como c-terminal, mientras que otros FGF como el FGF2 no promueven este efecto.
5. En modelos animales, altos niveles de FGF23 promueven el cambio de fenotipo de las CMLV y el incremento de la rigidez arterial.

6. En pacientes con enfermedad renal crónica y síndrome metabólico los niveles de FGF23 correlacionan con parámetros de rigidez arterial.
7. La ingesta de alimentos ricos en fósforo de origen animal o inorgánico promueve la carga tubular de fósforo y el incremento de los niveles de FGF23.



# Bibliografía



1. Levey, A. S. *et al.* Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* **67**, 2089–2100 (2005).
2. Andrassy, K. M. Comments on ‘KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease’. *Kidney International* **84**, 622–623 (2013).
3. Ribeiro, R. de C. H. M. *et al.* Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. *Acta Paulista de Enfermagem* **21**, 207–211 (2008).
4. Mizobuchi, M., Towler, D. & Slatopolsky, E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1453–1464 (2009).
5. Massy, Z. A. & Drüeke, T. B. Magnesium and outcomes in patients with chronic kidney disease: focus on vascular calcification, atherosclerosis and survival. *Clin Kidney J* **5**, i52–i61 (2012).
6. Levine, B. S., Rodríguez, M. & Felsenfeld, A. J. Serum calcium and bone: effect of PTH, phosphate, vitamin D and uremia. *Nefrologia* **34**, 658–669 (2014).

7. Nikodimopoulou, M. & Liakos, S. Secondary hyperparathyroidism and target organs in chronic kidney disease. *Hippokratia* **15**, 33 (2011).
8. Mirams, M., Robinson, B. G., Mason, R. S. & Nelson, A. E. Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate? *Bone* **35**, 1192–1199 (2004).
9. Sitara, D. *et al.* Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. *Matrix Biol.* **23**, 421–432 (2004).
10. Prié, D. & Friedlander, G. Reciprocal control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1717–1722 (2010).
11. Burnett, S.-A. M. *et al.* Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1187–1196 (2006).
12. Ferrari, S. L., Bonjour, J.-P. & Rizzoli, R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in

- healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1519–1524 (2005).
13. London, G. M., Pannier, B., Marchais, S. J. & Guerin, A. P. Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 778–783 (2000).
  14. Shigematsu, T. *et al.* Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18 Suppl 3**, iii86-89 (2003).
  15. Block, G. A. Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* **54**, 318–324 (2000).
  16. Block, G. A., Hulbert-Shearon, T. E., Levin, N. W. & Port, F. K. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am. J. Kidney Dis.* **31**, 607–617 (1998).
  17. Shobeiri, N., Adams, M. A. & Holden, R. M. Phosphate: an old bone molecule but new cardiovascular risk factor. *Br J Clin Pharmacol* **77**, 39–54 (2014).

18. Yoo, K. D. *et al.* Sex, Age, and the Association of Serum Phosphorus With All-Cause Mortality in Adults With Normal Kidney Function. *Am J Kidney Dis* **67**, 79–88 (2016).
19. Cross, H. S., Debiec, H. & Peterlik, M. Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner Electrolyte Metab* **16**, 115–124 (1990).
20. Murer, H., Hernando, N., Forster, I. & Biber, J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 531–542 (2003).
21. Segawa, H. *et al.* Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem* **277**, 19665–19672 (2002).
22. Hruska, K. A., Mathew, S., Lund, R., Qiu, P. & Pratt, R. Hyperphosphatemia of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* **74**, 148–157 (2008).
23. Suki, W. N. & Moore, L. W. Phosphorus Regulation in Chronic Kidney Disease. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **12**, 6–9 (2016).
24. Koh, N. *et al.* Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1015–1020 (2001).

25. Isakova, T. *et al.* Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **79**, 1370–1378 (2011).
26. Lanzer, P. *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur. Heart J.* **35**, 1515–1525 (2014).
27. Dusso, A. S., Brown, A. J. & Slatopolsky, E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F8-28 (2005).
28. Hruska, K. A., Saab, G., Mathew, S. & Lund, R. Renal osteodystrophy, phosphate homeostasis, and vascular calcification. *Semin Dial* **20**, 309–315 (2007).
29. Tonelli, M. *et al.* Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* **112**, 2627–2633 (2005).
30. Vart, P., Nigatu, Y. T., Jaglan, A., van Zon, S. K. R. & 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* **4**, (2015).

31. Santamaría, R. *et al.* Increased Phosphaturia Accelerates The Decline in Renal Function: A Search for Mechanisms. *Sci Rep* **8**, 13701 (2018).
32. Ritz, E., Hahn, K., Ketteler, M., Kuhlmann, M. K. & Mann, J. Phosphate additives in food--a health risk. *Dtsch Arztebl Int* **109**, 49–55 (2012).
33. Uribarri, J. & Calvo, M. S. Dietary phosphorus excess: a risk factor in chronic bone, kidney, and cardiovascular disease? *Adv Nutr* **4**, 542–544 (2013).
34. Qin, Z. *et al.* Fibroblast growth factor 23 as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in prospective studies. *Atherosclerosis* **261**, 1–11 (2017).
35. Boaz, M. & Smetana, S. Regression equation predicts dietary phosphorus intake from estimate of dietary protein intake. *J Am Diet Assoc* **96**, 1268–1270 (1996).
36. Kayne, L. H. *et al.* Analysis of segmental phosphate absorption in intact rats. A compartmental analysis approach. *J Clin Invest* **91**, 915–922 (1993).

37. Kalantar-Zadeh, K. *et al.* Understanding sources of dietary phosphorus in the treatment of patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 519–530 (2010).
38. Bohn, L., Meyer, A. S. & Rasmussen, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**, 165–191 (2008).
39. Sandberg, A. S., Andersson, H., Kivistö, B. & Sandström, B. Extrusion cooking of a high-fibre cereal product. 1. Effects on digestibility and absorption of protein, fat, starch, dietary fibre and phytate in the small intestine. *Br J Nutr* **55**, 245–254 (1986).
40. Lei, X. G. & Porres, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* **25**, 1787–1794 (2003).
41. Sullivan, C. *et al.* Effect of food additives on hyperphosphatemia among patients with end-stage renal disease: a randomized controlled trial. *JAMA* **301**, 629–635 (2009).
42. Karp, H. *et al.* Differences among total and in vitro digestible phosphorus content of plant foods and beverages. *J Ren Nutr* **22**, 416–422 (2012).

43. Calvo, M. S. & Uribarri, J. Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *Am J Clin Nutr* **98**, 6–15 (2013).
44. St-Jules, D. E., Goldfarb, D. S., Pompeii, M. L. & Sevcik, M. A. Phosphate Additive Avoidance in Chronic Kidney Disease. *Diabetes Spectr* **30**, 101–106 (2017).
45. Vervloet, M. G. & van Ballegooijen, A. J. Prevention and treatment of hyperphosphatemia in chronic kidney disease. *Kidney Int* **93**, 1060–1072 (2018).
46. Moorthi, R. N. *et al.* The effect of a diet containing 70% protein from plants on mineral metabolism and musculoskeletal health in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* **40**, 582–591 (2014).
47. Ramirez, J. A. *et al.* The absorption of dietary phosphorus and calcium in hemodialysis patients. *Kidney Int* **30**, 753–759 (1986).
48. Moe, S. M. *et al.* Vegetarian compared with meat dietary protein source and phosphorus homeostasis in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **6**, 257–264 (2011).
49. Chang, A. R. & Anderson, C. Dietary Phosphorus Intake and the Kidney. *Annu Rev Nutr* **37**, 321–346 (2017).

50. 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).
51. Perlmutter, M., Grossman, S. L., Rothenberg, S. & Dobkin, G. Urineserum urea nitrogen ratio; simple test of renal function in acute azotemia and oliguria. *J Am Med Assoc* **170**, 1533–1537 (1959).
52. Isakova, T. *et al.* Longitudinal FGF23 Trajectories and Mortality in Patients with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 579–590 (2018).
53. Brandenburg, V. M. *et al.* Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* **237**, 53–59 (2014).
54. Cai, Q. *et al.* Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1645–1649 (1994).
55. Yamashita, T., Yoshioka, M. & Itoh, N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the

- ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 494–498 (2000).
56. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat. Genet.* **26**, 345–348 (2000).
57. Bonewald, L. F. & Wacker, M. J. FGF23 Production by Osteocytes. *Pediatr Nephrol* **28**, 563–568 (2013).
58. Liu, S. & Quarles, L. D. How Fibroblast Growth Factor 23 Works. *JASN* **18**, 1637–1647 (2007).
59. Itoh, N. & Ornitz, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* **20**, 563–569 (2004).
60. Itoh, N. & Ornitz, D. M. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn.* **237**, 18–27 (2008).
61. Chen, G. *et al.*  $\alpha$ -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature* **553**, 461–466 (2018).
62. Araya, K. *et al.* A novel mutation in fibroblast growth factor 23 gene as a cause of tumoral calcinosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 5523–5527 (2005).

63. Yamazaki, Y. *et al.* Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4957–4960 (2002).
64. Kato, K. *et al.* Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 18370–18377 (2006).
65. White, K. E. *et al.* Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int.* **60**, 2079–2086 (2001).
66. Yamashita, T. Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* **9**, 313–318 (2005).
67. Goetz, R. *et al.* Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3417–3428 (2007).
68. Shimada, T. *et al.* Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* **143**, 3179–3182 (2002).

69. Topaz, O. *et al.* Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nat. Genet.* **36**, 579–581 (2004).
70. Garringer, H. J. *et al.* The role of mutant UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in regulating serum intact fibroblast growth factor 23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein in heritable tumoral calcinosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4037–4042 (2006).
71. Larsson, T. *et al.* A novel recessive mutation in fibroblast growth factor-23 causes familial tumoral calcinosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2424–2427 (2005).
72. Benet-Pagès, A., Orlik, P., Strom, T. M. & Lorenz-Depiereux, B. An FGF23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 385–390 (2005).
73. Tagliabracci, V. S. *et al.* Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 5520–5525 (2014).

74. Tenenhouse, H. S. X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 333–341 (1999).
75. Takeda, E. *et al.* Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 191–200 (2004).
76. Kuro-o, M. *et al.* Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45–51 (1997).
77. Ito, S. *et al.* Molecular cloning and expression analyses of mouse *betaklotho*, which encodes a novel *Klotho* family protein. *Mech. Dev.* **98**, 115–119 (2000).
78. Ito, S., Fujimori, T., Hayashizaki, Y. & Nabeshima, Y. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 341–345 (2002).
79. Chen, G. *et al.*  $\alpha$ -*Klotho* is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature* **553**, 461–466 (2018).
80. Hayashi, Y. *et al.* *Klotho*-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. *J Biol Chem* **282**, 30889–30900 (2007).

81. Davies, G. & Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853–859 (1995).
82. Huang, C.-L. & Moe, O. W. Klotho: a novel regulator of calcium and phosphorus homeostasis. *Pflugers Arch.* **462**, 185–193 (2011).
83. Hu, M. C. *et al.* Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* **24**, 3438–3450 (2010).
84. Erben, R. G. Update on FGF23 and Klotho signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **432**, 56–65 (2016).
85. Matsumura, Y. *et al.* Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 626–630 (1998).
86. Lindberg, K. *et al.* The kidney is the principal organ mediating klotho effects. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 2169–2175 (2014).
87. Hu, M. C. *et al.* Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 79–90 (2016).
88. Chen, C.-D. *et al.* Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. *Biochemistry* **53**, 5579–5587 (2014).

89. Neyra, J. A. & Hu, M. C. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone* **100**, 41–49 (2017).
90. Urakawa, I. *et al.* Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* **444**, 770–774 (2006).
91. Kurosu, H. & Kuro-O, M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **299**, 72–78 (2009).
92. Farrow, E. G., Davis, S. I., Summers, L. J. & White, K. E. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 955–960 (2009).
93. Kurosu, H. *et al.* Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J. Biol. Chem.* **281**, 6120–6123 (2006).
94. Schlessinger, J. *et al.* Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* **6**, 743–750 (2000).
95. Mohammadi, M., Olsen, S. K. & Ibrahimi, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 107–137 (2005).

96. Belov, A. A. & Mohammadi, M. Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).
97. Goetz, R. & Mohammadi, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 166–180 (2013).
98. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 459–463 (1994).
99. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. & Ornitz, D. M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841–848 (1991).
100. Wesche, J., Haglund, K. & Haugsten, E. M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem. J.* **437**, 199–213 (2011).
101. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211–225 (2000).

102. Spivak-Kroizman, T. *et al.* Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* **79**, 1015–1024 (1994).
103. Schlessinger, J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* **306**, 1506–1507 (2004).
104. Kurosu, H. *et al.* Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* **282**, 26687–26695 (2007).
105. Gattineni, J. *et al.* FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F282-291 (2009).
106. Shimada, T. *et al.* FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 429–435 (2004).
107. Liu, S. *et al.* Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1305–1315 (2006).

108. Saito, H. *et al.* Circulating FGF-23 is regulated by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 2543–2549 (2005).
109. Ben-Dov, I. Z. *et al.* The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J. Clin. Invest.* **117**, 4003–4008 (2007).
110. Krajisnik, T. *et al.* Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J. Endocrinol.* **195**, 125–131 (2007).
111. Kawata, T. *et al.* Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2683–2688 (2007).
112. Kobayashi, K. *et al.* Regulation of plasma fibroblast growth factor 23 by calcium in primary hyperparathyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* **154**, 93–99 (2006).
113. Faul, C. *et al.* FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* **121**, 4393–4408 (2011).

114. Liu, S. Y. *et al.* Fibroblast growth factor-23 may serve as a novel biomarker for renal osteodystrophy progression. *Int. J. Mol. Med.* **43**, 535–546 (2019).
115. McClung, M. R. *et al.* Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N. Engl. J. Med.* **370**, 412–420 (2014).
116. Lavi-Moshayoff, V., Wasserman, G., Meir, T., Silver, J. & Naveh-Manly, T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F882-889 (2010).
117. Bai, X.-Y., Miao, D., Goltzman, D. & Karaplis, A. C. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency. *J. Biol. Chem.* **278**, 9843–9849 (2003).
118. Feng, J. Q. *et al.* Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat. Genet.* **38**, 1310–1315 (2006).

119. Lyles, K. W. *et al.* Genetic transmission of tumoral calcinosis: autosomal dominant with variable clinical expressivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**, 1093–1096 (1985).
120. Shigematsu, T. *et al.* Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am. J. Kidney Dis.* **44**, 250–256 (2004).
121. Gutierrez, O. *et al.* Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2205–2215 (2005).
122. Torres, P.-U. *et al.* Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int.* **71**, 730–737 (2007).
123. Antonucci, D. M., Yamashita, T. & Portale, A. A. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3144–3149 (2006).
124. Koiwa, F. *et al.* Sevelamer hydrochloride and calcium bicarbonate reduce serum fibroblast growth factor 23 levels in dialysis patients. *Ther Apher Dial* **9**, 336–339 (2005).

125. Nitta, K., Nagano, N. & Tsuchiya, K. Fibroblast growth factor 23/klotho axis in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* **128**, 1–10 (2014).
126. Muñoz-Castañeda, J. R. *et al.* Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. *FASEB J.* **31**, 3858–3867 (2017).
127. Blacher, J., Guerin, A. P., Pannier, B., Marchais, S. J. & London, G. M. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* **38**, 938–942 (2001).
128. Keith, D. S., Nichols, G. A., Gullion, C. M., Brown, J. B. & Smith, D. H. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch. Intern. Med.* **164**, 659–663 (2004).
129. Gutiérrez, O. M. *et al.* Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* **359**, 584–592 (2008).
130. Stam, F. *et al.* Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with

- mild renal insufficiency: the Hoorn study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 537–545 (2006).
131. Recio-Mayoral, A., Banerjee, D., Streater, C. & Kaski, J. C. Endothelial dysfunction, inflammation and atherosclerosis in chronic kidney disease--a cross-sectional study of predialysis, dialysis and kidney-transplantation patients. *Atherosclerosis* **216**, 446–451 (2011).
132. Mirza, M. A. I., Larsson, A., Lind, L. & Larsson, T. E. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis* **205**, 385–390 (2009).
133. Richter, B., Haller, J., Haffner, D. & Leifheit-Nestler, M. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflugers Arch.* **468**, 1621–1635 (2016).
134. Sáez-Pérez, J. M. Distensibilidad arterial: un parámetro más para valorar el riesgo cardiovascular. *Semergen* **34**, 284–290 (2008).
135. Izzo, J. L. Pulse contour analysis and augmentation index: it's time to move beyond cuff blood pressure measurement. *Am J Hypertens* **18**, 1S-2S (2005).

136. Asmar, R., Rudnichi, A., Blacher, J., London, G. M. & Safar, M. E. Pulse pressure and aortic pulse wave are markers of cardiovascular risk in hypertensive populations. *Am J Hypertens* **14**, 91–97 (2001).
137. AlGhatrif, M. *et al.* Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension* **62**, 934–941 (2013).
138. Gender-Specific Differences in Myocardial Deformation and Aortic Stiffness at Rest and Dobutamine Stress | Hypertension. [https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.183335?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.183335?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&).
139. ESC/ESH Guidelines on Arterial Hypertension (Management of). <https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/Arterial-Hypertension-Management-of>, <https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/Arterial-Hypertension-Management-of>.

140. Chow, B. & Rabkin, S. W. The relationship between arterial stiffness and heart failure with preserved ejection fraction: a systemic meta-analysis. *Heart Fail Rev* **20**, 291–303 (2015).
141. McEniery, C. M. *et al.* Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1753–1760 (2005).
142. Latham, R. D. *et al.* Regional wave travel and reflections along the human aorta: a study with six simultaneous micromanometric pressures. *Circulation* **72**, 1257–1269 (1985).
143. Pereira, T., Maldonado, J., Pereira, L. & Conde, J. Aortic stiffness is an independent predictor of stroke in hypertensive patients. *Arq. Bras. Cardiol.* **100**, 437–443 (2013).
144. Van Bortel, L. M. *et al.* Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J. Hypertens.* **30**, 445–448 (2012).
145. Zanolì, L. *et al.* Increased carotid stiffness and remodelling at early stages of chronic kidney disease. *J. Hypertens.* (2019) doi:10.1097/HJH.0000000000002007.

146. Blacher, J. *et al.* Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* **99**, 2434–2439 (1999).
147. Yilmaz, M. I. *et al.* FGF-23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Kidney Int.* **78**, 679–685 (2010).
148. Inci, A. *et al.* Soluble Klotho levels in diabetic nephropathy: relationship with arterial stiffness. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**, 3230–3237 (2016).
149. Krishnasamy, R. *et al.* Progression of arterial stiffness is associated with changes in bone mineral markers in advanced CKD. *BMC Nephrol* **18**, 281 (2017).
150. Zhu, D., Mackenzie, N. C. W., Millan, J. L., Farquharson, C. & MacRae, V. E. A protective role for FGF-23 in local defence against disrupted arterial wall integrity? *Mol. Cell. Endocrinol.* **372**, 1–11 (2013).
151. Lim, K. *et al.* Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* **125**, 2243–2255 (2012).

152. Jimbo, R. *et al.* Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int.* **85**, 1103–1111 (2014).
153. Khan, A. M., Chirinos, J. A., Litt, H., Yang, W. & Rosas, S. E. FGF-23 and the progression of coronary arterial calcification in patients new to dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* **7**, 2017–2022 (2012).
154. Nakayama, M. *et al.* Fibroblast growth factor 23 is associated with carotid artery calcification in chronic kidney disease patients not undergoing dialysis: a cross-sectional study. *BMC Nephrol* **14**, 22 (2013).
155. Desjardins, L. *et al.* FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages. *Osteoporos Int* **23**, 2017–2025 (2012).
156. Scialla, J. J. *et al.* Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int.* **83**, 1159–1168 (2013).
157. Lindberg, K. *et al.* Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PLoS ONE* **8**, e60658 (2013).

158. Rensen, S. S. M., Doevendans, P. a. F. M. & van Eys, G. J. J. M. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**, 100–108 (2007).
159. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 767–801 (2004).
160. Hao, H., Gabbiani, G. & Bochaton-Piallat, M.-L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1510–1520 (2003).
161. Rzucidlo, E. M., Martin, K. A. & Powell, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J. Vasc. Surg.* **45 Suppl A**, A25-32 (2007).
162. Fischer, C., Schneider, M. & Carmeliet, P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol* 157–212 (2006).
163. Touyz, R. M. *et al.* Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc. Res.* **114**, 529–539 (2018).

164. Rudijanto, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* **39**, 86–93 (2007).
165. Shanahan, C. M., Crouthamel, M. H., Kapustin, A. & Giachelli, C. M. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* **109**, 697–711 (2011).
166. Speer, M. Y. *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* **104**, 733–741 (2009).
167. Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M. & Shanahan, C. M. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* **114**, 590–600 (2018).
168. Tyson, K. L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 489–494 (2003).
169. Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E. & Fisher, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a

- macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13531–13536 (2003).
170. Stewart, H. J. S., Guildford, A. L., Lawrence-Watt, D. J. & Santin, M. Substrate-induced phenotypical change of monocytes/macrophages into myofibroblast-like cells: a new insight into the mechanism of in-stent restenosis. *J Biomed Mater Res A* **90**, 465–471 (2009).
171. Martin, K. *et al.* Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ. Res.* **105**, 214–218 (2009).
172. Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27-32 (2004).
173. Perticone, F. *et al.* Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* **104**, 191–196 (2001).
174. Mann, D. L. MicroRNAs and the failing heart. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2644–2645 (2007).

175. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663–4670 (2002).
176. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3016 (2003).
177. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95–98 (2004).
178. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
179. Pong, S. K. & Gullerova, M. Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes – Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins. *FEBS Letters* **592**, 2973–2986 (2018).
180. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
181. Strubberg, A. M. & Madison, B. B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Dis Model Mech* **10**, 197–214 (2017).

182. Gregory, R. I. & Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* **65**, 3509–3512 (2005).
183. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277–279 (2003).
184. Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **34**, D140-144 (2006).
185. Wang, N. *et al.* Urinary microRNA-10a and microRNA-30d serve as novel, sensitive and specific biomarkers for kidney injury. *PLoS ONE* **7**, e51140 (2012).
186. Nassirpour, R. *et al.* Identification of Promising Urinary MicroRNA Biomarkers in Two Rat Models of Glomerular Injury. *Toxicol. Sci.* **148**, 35–47 (2015).
187. Solé, C., Cortés-Hernández, J., Felip, M. L., Vidal, M. & Ordi-Ros, J. miR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 1488–1496 (2015).
188. Zhang, C. *et al.* Urinary miR-196a predicts disease progression in patients with chronic kidney disease. *J Transl Med* **16**, (2018).

189. Ichii, O. & Horino, T. MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals. *J Toxicol Pathol* **31**, 23–34 (2018).
190. Zhu, N. *et al.* Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis* **215**, 286–293 (2011).
191. Mackenzie, N. C. W., Staines, K. A., Zhu, D., Genever, P. & Macrae, V. E. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem. Funct.* **32**, 209–216 (2014).
192. Li, Y. *et al.* MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 81–83 (2009).
193. Wang, C. *et al.* MiR-221 promotes cardiac hypertrophy in vitro through the modulation of p27 expression. *J. Cell. Biochem.* **113**, 2040–2046 (2012).
194. Robinson, H. C. & Baker, A. H. How do microRNAs affect vascular smooth muscle cell biology? *Curr Opin Lipidol* **23**, 405–411 (2012).

195. Cushing, L. *et al.* Disruption of miR-29 Leads to Aberrant Differentiation of Smooth Muscle Cells Selectively Associated with Distal Lung Vasculature. *PLoS Genet* **11**, e1005238 (2015).
196. Rangrez, A. Y., Massy, Z. A., Metzinger-Le Meuth, V. & Metzinger, L. miR-143 and miR-145: molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Circ Cardiovasc Genet* **4**, 197–205 (2011).
197. Albinsson, S. & Swärd, K. Targeting smooth muscle microRNAs for therapeutic benefit in vascular disease. *Pharmacological Research* **75**, 28–36 (2013).
198. Cheng, Y. *et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* **105**, 158–166 (2009).
199. Poliseno, L. *et al.* MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* **108**, 3068–3071 (2006).
200. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G. & Hata, A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J. Biol. Chem.* **284**, 3728–3738 (2009).

201. Kuehbacher, A., Urbich, C. & Dimmeler, S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 12–15 (2008).
202. Song, Z. & Li, G. Role of specific microRNAs in regulation of vascular smooth muscle cell differentiation and the response to injury. *J Cardiovasc Transl Res* **3**, 246–250 (2010).
203. Rippe, C. *et al.* MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Exp. Gerontol.* **47**, 45–51 (2012).
204. Di Leva, G. *et al.* MicroRNA Cluster 221-222 and Estrogen Receptor  $\alpha$  Interactions in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* **102**, 706–721 (2010).
205. Leung, A. *et al.* Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **113**, 266–278 (2013).
206. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

207. Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *Biomed Res Int* **2015**, 354517 (2015).
208. 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).
209. Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J* **31**, 2338–2350 (2010).
210. Tablas de composición de alimentos (Mataix et al.). *SEÑ - Sociedad Española de Nutrición*  
<http://www.sennutricion.org/es/2013/05/11/tablas-de-composicin-de-alimentos-mataix-et-al>.

211. Base de Datos BEDCA.  
[https://www.bedca.net/bdpub/index\\_en.php](https://www.bedca.net/bdpub/index_en.php).
212. EuroFIR » European Food Information Resource.  
<https://www.eurofir.org/>.
213. General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA Journal* **7**, 1435 (2009).
214. Nakahara, T. *et al.* Fibroblast growth factor 23 inhibits osteoblastic gene expression and induces osteoprotegerin in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **253**, 102–110 (2016).
215. Kawai, M. *et al.* FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble  $\alpha$ -Klotho both in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **288**, 2414–2427 (2013).
216. Shalhoub, V. *et al.* Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate osteoblastic MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization. *Calcif. Tissue Int.* **89**, 140–150 (2011).
217. Feng, S., Wang, J., Zhang, Y., Creighton, C. J. & Ittmann, M. FGF23 promotes prostate cancer progression. *Oncotarget* **6**, 17291–17301 (2015).

218. Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E. & Xu, Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol* **593**, 3013–3030 (2015).
219. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* **74**, 13–40 (2012).
220. Leifheit-Nestler, M. *et al.* Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 1088–1099 (2016).
221. Schellinger, I. N. *et al.* MicroRNA miR-29b regulates diabetic aortic remodeling and stiffening. *Mol Ther Nucleic Acids* **24**, 188–199 (2021).
222. Hori, D. *et al.* miR-181b regulates vascular stiffness age dependently in part by regulating TGF- $\beta$  signaling. *PLoS One* **12**, (2017).
223. Norata, G. D. *et al.* MicroRNA 143-145 deficiency impairs vascular function. *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**, 467–474 (2012).

224. Iaconetti, C. *et al.* Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* **107**, 522–533 (2015).
225. Liao, X.-B. *et al.* MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **154**, 3344–3352 (2013).
226. Leeper, N. J. *et al.* MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J Cell Physiol* **226**, 1035–1043 (2011).
227. Albinsson, S. & Sessa, W. C. Can microRNAs control vascular smooth muscle phenotypic modulation and the response to injury? *Physiol. Genomics* **43**, 529–533 (2011).
228. Galardi, S. *et al.* miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* **282**, 23716–23724 (2007).
229. Wu, H. *et al.* Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation bias in human embryonic stem cell lines. *PNAS* **104**, 13821–13826 (2007).

230. Liu, X., Cheng, Y., Yang, J., Xu, L. & Zhang, C. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 245–255 (2012).
231. Valverde, M. A. *et al.* Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* **285**, 1929–1931 (1999).
232. Tatchum-Talom, R., Martel, C. & Marette, A. Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H491-498 (2002).
233. Zha, B., Qiu, P., Zhang, C., Li, X. & Chen, Z. GPR30 Promotes the Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells via Activating the AKT and ERK Pathways. *Onco Targets Ther* **13**, 3801–3808 (2020).
234. Carrillo-López, N. *et al.* Indirect regulation of PTH by estrogens may require FGF23. *J Am Soc Nephrol* **20**, 2009–2017 (2009).
235. Dai, R. *et al.* miR-221/222 suppression protects against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via p27(Kip1)- and MEK/ERK-mediated cell cycle regulation. *Biol Chem* **391**, 791–801 (2010).

236. Panda, D. K. *et al.* Defective interplay between mTORC1 activity and endoplasmic reticulum stress-unfolded protein response in uremic vascular calcification. *Am J Physiol Renal Physiol* **314**, F1046–F1061 (2018).
237. Vidal, A. *et al.* Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR. *Scientific Reports* **10**, 1795 (2020).
238. Ni, T. *et al.* Impaired autophagy mediates hyperhomocysteinemia-induced HA-VSMC phenotypic switching. *J Mol Hist* **50**, 305–314 (2019).
239. Ye, B. *et al.* lncRNA KCNQ1OT1 Suppresses the Inflammation and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells through I $\kappa$ B $\alpha$  in Intimal Hyperplasia. *Mol Ther Nucleic Acids* **20**, 62–72 (2020).
240. Sunamura, N. *et al.* Regulation of functional KCNQ1OT1 lncRNA by  $\beta$ -catenin. *Sci Rep* **6**, (2016).
241. Meo Burt, P., Xiao, L. & Hurley, M. M. FGF23 Regulates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling-Mediated Osteoarthritis in Mice Overexpressing High-Molecular-Weight FGF2. *Endocrinology* **159**, 2386–2396 (2018).

242. Canalejo, R. *et al.* FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1125–1135 (2010).
243. Gattineni, J. *et al.* Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **306**, F351-358 (2014).
244. Bianchi, A. *et al.* Fibroblast Growth Factor 23 drives MMP13 expression in human osteoarthritic chondrocytes in a Klotho-independent manner. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 1961–1969 (2016).
245. Andrukhova, O. *et al.* FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone* **51**, 621–628 (2012).
246. Yamazaki, M. *et al.* Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. *J. Cell. Biochem.* **111**, 1210–1221 (2010).
247. Grabner, A. *et al.* Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab.* **22**, 1020–1032 (2015).

248. Singh, S. *et al.* Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **90**, 985–996 (2016).
249. Briet, M., Boutouyrie, P., Laurent, S. & London, G. M. Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD. *Kidney Int* **82**, 388–400 (2012).
250. Forte, A. *et al.* Early cell changes and TGF $\beta$  pathway alterations in the aortopathy associated with bicuspid aortic valve stenosis. *Clin Sci (Lond)* **124**, 97–108 (2013).
251. Liu, S. Q. Influence of tensile strain on smooth muscle cell orientation in rat blood vessels. *J Biomech Eng* **120**, 313–320 (1998).
252. Kardami, E. *et al.* Fibroblast growth factor 2 isoforms and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **63**, 458–466 (2004).
253. Kaye, D. *et al.* Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. *J. Clin. Invest.* **97**, 281–291 (1996).

254. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 259–269 (2006).
255. Lima, L. G., Chammas, R., Monteiro, R. Q., Moreira, M. E. C. & Barcinski, M. A. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett* **283**, 168–175 (2009).
256. Waters, P. S. *et al.* Relationship between circulating and tissue microRNAs in a murine model of breast cancer. *PLoS One* **7**, e50459 (2012).
257. Pääkkö, T. J. W. *et al.* Increasing ambulatory pulse pressure predicts the development of left ventricular hypertrophy during long-term follow-up. *J Hum Hypertens* **32**, 180–189 (2018).
258. Laurent, S. *et al.* Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur. Heart J.* **27**, 2588–2605 (2006).
259. Kendrick, J. *et al.* FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1913–1922 (2011).

260. London, G. M. *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1731–1740 (2003).
261. Roos, M. *et al.* Relation between plasma fibroblast growth factor-23, serum fetuin-A levels and coronary artery calcification evaluated by multislice computed tomography in patients with normal kidney function. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **68**, 660–665 (2008).
262. Nakahara, T. *et al.* Fibroblast growth factor 23 plays a protective role against vascular calcification. *European Heart Journal* **34**, (2013).
263. Verkaik, M. *et al.* FGF23 impairs peripheral microvascular function in renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **315**, H1414–H1424 (2018).
264. Silswal, N. *et al.* FGF23 directly impairs endothelium-dependent vasorelaxation by increasing superoxide levels and reducing nitric oxide bioavailability. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307**, E426-436 (2014).

265. Seiler, S. *et al.* FGF-23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 3983–3989 (2010).
266. Scialla, J. J. Epidemiologic insights on the role of fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **24**, 260–267 (2015).
267. Ketteler, M. *et al.* Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int* **92**, 26–36 (2017).
268. Kendrick, J., Kestenbaum, B. & Chonchol, M. Phosphate and Cardiovascular Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease* **18**, 113–119 (2011).



# Anexos



**Anexo 1. Assessment of Inorganic Phosphate Intake by the Measurement of the Phosphate/Urea Nitrogen Ratio in Urine** (Artículo publicado en la revista Nutrients)

**Anexo 2. Fibroblast growth factor 23 increases arterial stiffness through changes in vascular smooth muscle cell phenotype** (Artículo sometido en la revista Hypertension)

## Article

# Assessment of Inorganic Phosphate Intake by the Measurement of the Phosphate/Urea Nitrogen Ratio in Urine

María Victoria Pendón-Ruiz de Mier <sup>1,2,†</sup>, Noemí Vergara <sup>1,†</sup>, Cristian Rodelo-Haad <sup>1,2,†</sup> ,  
María Dolores López-Zamorano <sup>3</sup>, Cristina Membrives-González <sup>1</sup>, Rodrigo López-Baltanás <sup>1</sup>,  
Juan Rafael Muñoz-Castañeda <sup>1,4,\*</sup> , Francisco Caravaca <sup>5</sup>, Alejandro Martín-Malo <sup>1,2</sup> , Arnold J. Felsenfeld <sup>6</sup>,  
Eugenio J. De la Torre <sup>7</sup>, Sagrario Soriano <sup>1,2</sup>, Rafael Santamaría <sup>1,2,‡</sup>  and Mariano Rodríguez <sup>1,4,‡</sup>

<sup>1</sup> Maimonides Institute for Biomedical Research of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, Nephrology Service, University of Cordoba, 14004 Cordoba, Spain; mvictoriaprm@gmail.com (M.V.P.-R.d.M.); noemiverse@gmail.com (N.V.); crisroha@yahoo.com (C.R.-H.); cristina\_cmg92@hotmail.com (C.M.-G.); Rodri\_lb@hotmail.com (R.L.-B.); amartinma@senefro.org (A.M.-M.); marias.soriano.sspa@juntadeandalucia.es (S.S.); rsantamariao@gmail.com (R.S.); marianorodriguezportillo@gmail.com (M.R.)

<sup>2</sup> Spanish Renal Research Network (REDinREN), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, 14004 Cordoba, Spain; doloreslopezzamorano58@gmail.com

<sup>4</sup> EUTOXandCKD-MBD groups of the ERA-EDTA, Spanish Renal Research Network (REDinREN), Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain

<sup>5</sup> Nephrology Service, Infanta Cristina Hospital, 06080 Badajoz, Spain; fcaravacam@senefro.org

<sup>6</sup> Department of Medicine, Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System and the David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA 90073, USA; afelsenf@ucla.edu

<sup>7</sup> General Medicine, Miguelturra Clinic, 13170 Miguelturra/Ciudad Real, Spain; eujo06@ono.com

\* Correspondence: juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es; Tel.: +34-95-7213-791

† These authors share first authorship.

‡ These authors share last authorship.



**Citation:** Pendón-Ruiz de Mier, M.V.; Vergara, N.; Rodelo-Haad, C.; López-Zamorano, M.D.; Membrives-González, C.; López-Baltanás, R.; Muñoz-Castañeda, J.R.; Caravaca, F.; Martín-Malo, A.; Felsenfeld, A.J.; et al. Assessment of Inorganic Phosphate Intake by the Measurement of the Phosphate/Urea Nitrogen Ratio in Urine. *Nutrients* **2021**, *13*, 292. <https://doi.org/10.3390/nu13020292>

Academic Editor: Roswitha Siener

Received: 17 November 2020

Accepted: 12 January 2021

Published: 20 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In chronic kidney disease (CKD) patients, it would be desirable to reduce the intake of inorganic phosphate (P) rather than limit the intake of P contained in proteins. Urinary excretion of P should reflect intestinal absorption of P (inorganic plus protein-derived). The aim of the present study is to determine whether the ratio of urinary P to urinary urea nitrogen (P/UUN ratio) helps identify patients with a high intake of inorganic P. A cross-sectional study was performed in 71 patients affected by metabolic syndrome with CKD (stages 2–3) with normal serum P concentration. A 3-day dietary survey was performed to estimate the average daily amount and the source of P ingested. The daily intake of P was  $1086.5 \pm 361.3$  mg/day; 64% contained in animal proteins, 22% in vegetable proteins, and 14% as inorganic P. The total amount of P ingested did not correlate with daily phosphaturia, but it did correlate with the P/UUN ratio ( $p < 0.018$ ). Patients with the highest tertile of the P/UUN ratio  $>71.1$  mg/g presented more abundant inorganic P intake ( $p < 0.038$ ). The P/UUN ratio is suggested to be a marker of inorganic P intake. This finding might be useful in clinical practices to identify the source of dietary P and to make personalized dietary recommendations directed to reduce inorganic P intake.

**Keywords:** phosphaturia; phosphate intake; FGF23; PTH; CKD

## 1. Introduction

In the early stages of chronic kidney disease (CKD), an increase in fibroblast growth factor-23 (FGF23) and parathyroid hormone (PTH) cause a reduction in the tubular resorption of phosphate (P). Thus, the serum concentration of P is maintained within normal values despite the decrease in the glomerular filtration of P [1]. However, in advanced CKD (stages 4–5) the serum P concentration may be increased [2] because the phosphaturic effects of FGF23 and PTH are not sufficient to overcome the marked reduction in the

glomerular filtration of P. Consequently, at some stage of CKD, a reasonable strategy would be to reduce the intestinal absorption of P in an attempt to prevent the development of hyperphosphatemia. Ideally, it would be desirable to reduce the intake of inorganic P, which is easily absorbed, rather than limiting the intake of P contained in proteins that are necessary to prevent poor nutrition and muscle wasting.

Almost all food contains P. A large amount of P is found in proteins of animal origin. Moreover, P salts (inorganic P) contained in some beverages and additives of processed foods are a major source of highly absorbable P [3–6]. It has been shown that the restriction of additives containing P contributes to the control of serum P [6]. The P contained in animal proteins is hydrolyzed and then absorbed; P from plant proteins is poorly absorbed since it is bound to phytate, and humans lack phytase, the enzyme required to extract P from phytate [7]. The intestinal absorption of P from animal protein ranges from 50% to 70%, and from vegetable proteins, the intestinal absorption is only 30% to 50%. In contrast, the absorption of inorganic P is close to 100% [3,8,9]. Hence, the net absorption of P [10] is influenced by several factors, such as total P intake, food source, and vitamin D levels, which increased the intestinal absorption of P [7,11]. Given all these factors affecting P absorption, it is not surprising to find reports showing that the urinary excretion of P does not correlate with total P intake [12]. Therefore, nephrologists may not have a strong reason to measure urinary excretion of P.

High serum values of P should be corrected because there is an association between high serum P and increased mortality both in CKD patients and in the general population [13–16]. Recently, we observed that in the early stages of CKD, P overload, as reflected by high urinary P excretion, induces renal injury and accelerates renal disease progression [17]. Other authors suggest that an increased P intake is associated with cardiovascular morbidity and mortality, even if the serum level of P remains within the normal range [18,19]. Therefore, even with normal serum P, it may be essential to reduce P load in CKD, because it would decrease the demand for PTH and FGF23. Recent reports indicate that an increased tubular load of P, required to maintain P balance, may contribute to the progression of CKD [5,17]. Furthermore, there is increasing evidence indicating that the elevation of FGF23, necessary to maintain serum P, is associated with negative cardiovascular outcome [20]. Considering that the restriction of dietary P is a desirable therapy in CKD patients, it would be important to have an easy method available to assess the source of dietary P and make personalized nutritional recommendations. Ideally, protein intake should be preserved and restrict the easily absorbable inorganic P.

Urinary excretion of P should reflect the intestinal absorption of P, which includes both inorganic and organic P (from proteins). It is well established that the content of urinary urea nitrogen (UUN) is a measure of the amount of protein that has been absorbed and metabolized [21]. Hypothetically, an excessive intake of inorganic P relative to the intake of organic P should be reflected in an increase in the ratio of P/UUN in the urine.

The aim of the present study is to determine whether the ratio of P to UUN in urine helps to differentiate the sources of P ingested in a homogeneous group of patients with metabolic syndrome and CKD stages 2–3.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

This is a cross-sectional study of patients being followed regularly at the outpatient kidney and hypertension clinic. All subjects gave their informed consent for inclusion in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Cordoba (Cordoba Research Ethics Committee, Spain. Record number: 240; committee's referencenumber: 2730) and *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* (Spain. EudraCT number: 2015-000619-42).

## 2.2. Inclusion Criteria

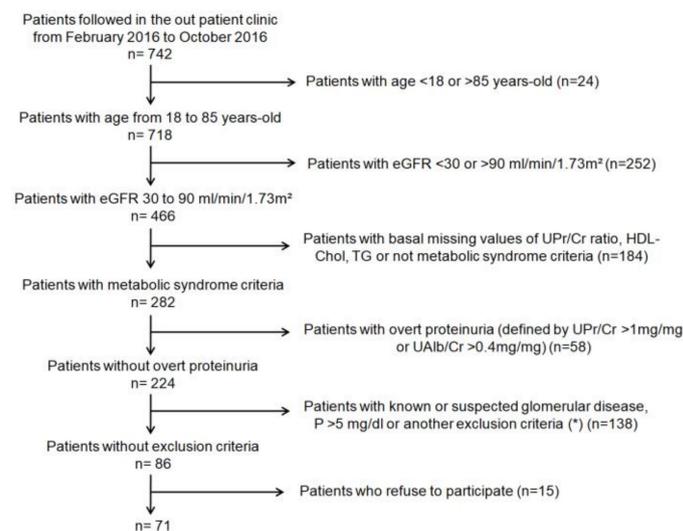
The total number of patients included in the study was 71. There were 18 to 85 years old with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) between 30 and 90 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> (CKD stages 2–3) [22]. All patients had been diagnosed with metabolic syndrome, fulfilling at least three of the following five criteria [23]: (1) waist circumference  $\geq 88$  cm in women and  $\geq 102$  cm in men; (2) serum triglycerides  $\geq 1.69$  mmol/L or drug treatment for hypertriglyceridemia; (3) low high-density lipoprotein; men  $< 1.03$  mmol/L, women  $< 1.29$  mmol/L or drug treatment; (4) elevated fasting glucose ( $\geq 6.11$  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 high blood pressure. All patients had limited proteinuria (albumin/creatinine ratio  $< 0.4$  mg/mg and a protein/creatinine ratio  $< 1$  mg/mg).

## 2.3. Exclusion Criteria

Patients with serum P concentration  $> 1.61$  mmol/L, 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.

## 2.4. Patients

Participant flow chart is shown in Figure 1. All patients were followed in the outpatient clinic by the same physician at least twice yearly. Baseline data included age, gender, body mass index, waist circumference, blood pressure, and comorbidities, or prevalent diseases. 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. Abnormalities in glucose metabolism were defined as a fasting glucose level  $> 6.11$  mmol/L or the use of hypoglycemic medication.



**Figure 1.** Participant flow chart. eGFR: estimated glomerular filtration rate; UPr/Cr ratio: ratio of protein to creatinine in urine; HDL-Chol: high-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; UAlb/Cr: ratio of albumin to creatinine in urine; P: phosphate. (\*) Congestive heart failure, HIV infection, hepatitis B or C, chronic liver disease, systemic inflammatory disease or previous history of cancer in the last 5 years.

Patients underwent a detailed 3-day dietary survey prior to the extraction of blood and urine samples to estimate the average daily amount and the source of P ingested. The intake of P was estimated from a table with the composition of aliments consumed in Spain, particularly in the south of Spain [24]. This extensive table has been very helpful to obtain the P content of many homemade dishes that are common in this region. The in-

formation on the content of P shown in this table matched the values indicated in another source of food information, the Spanish Food Composition Database “BEDCA” [25] developed by the Spanish Federation of Food and Beverage Industries (“FIAB: *Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas*”) and the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (“AESAN”). The food composition values collected in this database have been obtained from different sources, including laboratories, food industry, and scientific publications. This database is built according to European standards developed by the EuroFIR European Network of Excellence, and is included in the list of food composition databases of the EuroFIR Association [26]. The dietary record has been used as an appropriate assessment method for a pan-European dietary survey of the European Food Safety Authority (EFSA). However, with the information available, it is not possible to estimate with precision the amount of inorganic P contained in the diet; the data collected and the values reported are only a brief estimation based in the amount of processed food ingested (self-reported) by the patients. Before obtaining dietary information, patients were trained on how to adequately describe the foods, amounts consumed, cooking methods, etc. Food consumption was recorded daily both per meal and between meals. Food quantities were assessed by a description of the utensils commonly used for cooking and serving and indicating the amount consumed of each product [27]. Patients were asked to report if, independently of the amount consumed, the diet included processed food. The survey was reviewed with the patient during the clinic visit with the aim of clarifying the entries and adding any omitted items and amounts.

### 2.5. Blood and Urine Chemistries

Blood was collected for measurements of serum biochemistry and complete blood count. Laboratory tests included serum creatinine, urea, glucose, uncorrected calcium, P, magnesium, albumin, lipids, ferritin, iron, and C reactive-protein (CRP). The 24-h urine samples were collected and used for quantification of P electrolytes, albumin, protein, urea with an Architect c-16000 (Abbott<sup>®</sup>, Chicago, IL, USA). The eGFR was calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formula [22]. Complete blood count was measured with a ABX Pentra 120 Retic<sup>®</sup> (Horiba, Kyoto, Japan). Human plasma c-terminal FGF23 (c-FGF23) was determined by ELISA (Immuno-topics, San Clemente, CA, USA). Intact PTH level was quantified by ELISA (Immuno-topics, San Clemente, CA, USA).

Parameters measured in the 24-h urine collection were: Urine P excretion (mg/day) that should match daily intestinal absorption of P. Fractional excretion of P (FeP) (%) calculated as  $FeP = ([Serum\ creatinine \times Urine\ P] / [Urine\ creatinine \times Serum\ P]) \times 100$ . Urine P excretion/eGFR (mg/day/eGFR), that reflects the urine P excretion relative to kidney function. Urine P/creatinine ratio (P/Cr ratio) (mg/mg). Urine Urea nitrogen (UUN) excretion (mg/day) ( $UUN\ (mg/dL) = Urea\ (mg/dL) / 2.1428$ ), UUN/Cr ratio (mg/mg). P/UUN ratio (mg/g) that reflects daily intestinal absorption of P relative to daily amount of absorbed and metabolized protein.

### 2.6. Animal Studies

To obtain additional information about the relationship between inorganic P intake and the ratio P/UUN in urine, we analyzed urine samples stored in our Biobank. These are samples from previous experiments using experimental rat model of 5/6 nephrectomy (Nx) fed diets with inorganic phosphate added to achieve a 0.2%, 0.4%, 0.6%, and 0.8% of total dietary content of phosphate. The normal P content in rat diet is 0.6%.

#### 2.6.1. Animals

Male Wistar rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA), 9–10 weeks old and weighing 250–300 g, were individually housed using a 12-h/12-h light/dark cycle and given ad libitum access to 1318 Altromin breeding diet (Altromin, Germany). Rats received humane care in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by

the National Society for Medical Research. Ethics approval was obtained from the Ethics Committee for Animal Research of the University of Cordoba.

Renal failure was induced by subtotal nephrectomy (5/6 Nx), a two-step procedure. In the first step, animals were anesthetized using xylazine (5 mg/kg intraperitoneally) and ketamine (80 mg/kg intraperitoneally). A 5 to 8 mm incision was made on the left mediolateral surface of the abdomen. The left kidney was exposed, and the two poles (two thirds of the renal mass) were ablated. After 1 week, animals underwent right Nx under anesthesia. The control group underwent sham operation.

### 2.6.2. Dietary Inorganic Phosphorus Modulation

One day after the second surgery, rats were randomly distributed into groups and fed diets with inorganic P added to achieve a 0.2%, 0.4%, 0.6%, and 0.8% of total dietary content of P for 15 days. During the last 3 days of the 15-day experiment, rats were housed in metabolic cages to collect urine samples. Urine Urea nitrogen and P were quantified by spectrophotometry (Biosystems, Barcelona, Spain).

### 2.7. Statistical Analysis

Continuous variables are shown as mean ( $\pm$  standard deviation, SD) or median (interquartile range, IQR). Categorical variables are presented as a percent (%). Simple correlation analysis (Spearman) was used to identify the relationship between phosphaturia variables and other variables. P/UUN ratio was categorized into tertiles to compare P intake, phosphaturia, FGF23, and PTH. The Kruskal–Wallis test was used to compare the difference between means of more than two groups. Multivariable logistic regression was used to evaluate the association between various factors and the odds of having consumed processed food as patients included were asked to answer whether they ingested known processed food in a binary fashion (Yes/No). Two models were performed, and model 2 was selected as the final model because it had the best goodness-of-fit. Discrimination ability was performed using the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve and Youden's Index identified the optimal cutpoint to discriminate patients whoself-reported having consumed processed food from those who did not. The area under the curve (AUC), sensitivity, specificity, and the accuracy of the model were also assessed. A  $p$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS statistical program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R 3.6.1 (R Core Team, 2019), the *tableOne* (v0.10.0 [28]), the *corrplot* (V0.84 [29]), and *cutpoint packages* [30].

## 3. Results

Demographics and clinical characteristics of the 71 patients are shown in Table 1. Mean age  $61 \pm 9$  years-old, (range 38 to 77), 72% ( $n = 51$ ) were male, with a mean eGFR of  $68 \pm 28$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Hypertension was present in 100% of patients ( $n = 71$ ), insulin resistance in 49% ( $n = 35$ ) and dyslipidemia in 77% ( $n = 55$ ). The mean body mass index (BMI) was  $32.5 \pm 4.1$  kg/m<sup>2</sup>, and the mean body weight was  $90.6 \pm 13.8$  kg. Serum and urine biochemistry and calculated urine P parameters are shown in Table 2.

**Table 1.** Demographics and clinical characteristics of the study patients ( $n = 71$ ).

Characteristic	Mean $\pm$ SD
Age (years)	61 $\pm$ 9
Gender (male, n/%)	51/72
Type 2 diabetes (n/%)	35/49
Dyslipidemia (n/%)	55.0/77
Hyperuricemia (n/%)	43.0/61
Smokers (n/%)	8.0/11
Ischemic cardiopathy (n/%)	8.0/11
Peripheral arteriopathy (n/%)	9.0/13
Cardiovascular events (n/%)	12.0/17

Table 1. Cont.

Characteristic	Mean ± SD
Hypertension (n/%)	71.0/100
ACEI (n/%)	7.0/10
ARB (n/%)	61.0/86
Diuretics (n/%)	41.0/58
CCB (D) (n/%)	45.0/63
Beta-blocker (n/%)	28.0/39
Central Alfa-Blocker (n/%)	31.0 /44
Other antihypertensive drugs (n/%)	4.0/6
Body weight (kg)	90.6 ± 13.0
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	32.0 ± 4.0
Waist circumference (cm) in men	110.3 ± 10.1
Waist circumference (cm) in women	108.0 ± 10.1
Systolic blood pressure (mmHg)	136.3 ± 25.5
Diastolic blood pressure (mmHg)	84.1 ± 16.6
Mean blood pressure (mmHg)	108.4 ± 19.0
Heart rate (bpm)	64.0 ± 13.3

Quantitative and qualitative variables are presented as mean ± standard deviation and number/percentage, respectively. ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin receptor blocker; CCB (D): calcium channels blocker dihydropyridine.

Table 2. Biochemical parameters for serum and 24-h urine.

Serum	Mean ± SD
Creatinine (mmol/L)	0.105 ± 0.036
Urea (mmol/L)	17.1 ± 5.7
Glucose (mmol/L)	7.14 ± 2.71
Sodium (mEq/L)	139.4 ± 2.4
Potassium (mEq/L)	4.4 ± 0.5
Chloride (mEq/L)	106.1 ± 3.3
Calcium (mmol/L)	2.37 ± 0.07
Phosphate (mmol/L)	1 ± 0.16
Magnesium (mmol/L)	0.8 ± 0.1
Triglycerides (mmol/L)	1.70 ± 0.74
Cholesterol (mmol/L)	4.60 ± 0.96
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.01 ± 0.23
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.80 ± 0.83
Albumin (µmol/L)	652 ± 30
CRP (µg/L)	26,000 (12,000–55,000)
Iron (µmol/L)	14.9 ± 6
Ferritin (µg/L)	74 (39–130)
PTH (pmol/L)	6.1 (4.2–8.5)
c-FGF23 (RU/mL)	77.0 (61.8–112.6)
URINE (24-h Collection)	Mean ± SD
Creatinine (mg/day)	1402.3 ± 618.4
UUN (g/day)	12.2 ± 4.5
Sodium (mEq/day)	183 ± 76
Potassium (mEq/day)	67 ± 28
Calcium (mg/day)	106 ± 79
Urine P Parameters (24-h Collection)	Mean ± SD
Urine Phosphate excretion (mg/day)	797.2 ± 324.7
Fractional excretion of phosphate (FeP) (%)	23.3 ± 10.0
Urine Phosphate excretion/eGFR (mg/day/eGFR)	13.1 ± 7.1
Phosphate/Creatinine ratio (mg/mg)	0.60 ± 0.17
Phosphate/UUN ratio (mg/g)	66.5 ± 16.3

Biochemical parameters for serum and 24-h urine summarized as mean ± standard deviation. c-FGF23: c-terminal fibroblast growth factor-23; CRP: C-reactive-protein; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; P: phosphate; PTH: parathyroid hormone; UUN: urine urea nitrogen.

The average intake of P was  $1086.5 \pm 361.3$  mg/day (range 286.2 to 2093.7 mg/day). The sources of P were: animal protein ( $64 \pm 13\%$ ,  $677.3 \pm 215.1$  mg/day), vegetable protein ( $22 \pm 10\%$ ,  $236.5 \pm 130.2$  mg/day), and inorganic P ( $14 \pm 13\%$ ,  $174.8 \pm 205.1$  mg/day).

Simple linear correlation analyses of daily intake of P versus urine parameters are shown in Table 3. There was no correlation between P intake and the 24-h Urine P excretion or any of the urinary P parameters, except with the P/UUN ratio in urine ( $p = 0.018$ ). The P/UUN ratio reflects total P absorbed and excreted in urine relative to the amount of protein absorbed and metabolized. Linear correlation between P/UUN ratio in urine and different dietary sources of P is shown in the lower panel of Table 3. The urine P/UUN ratio showed a significant correlation with the amount of inorganic P ingested ( $p = 0.005$ ) and failed to show a correlation with P intake from animal or vegetable origin.

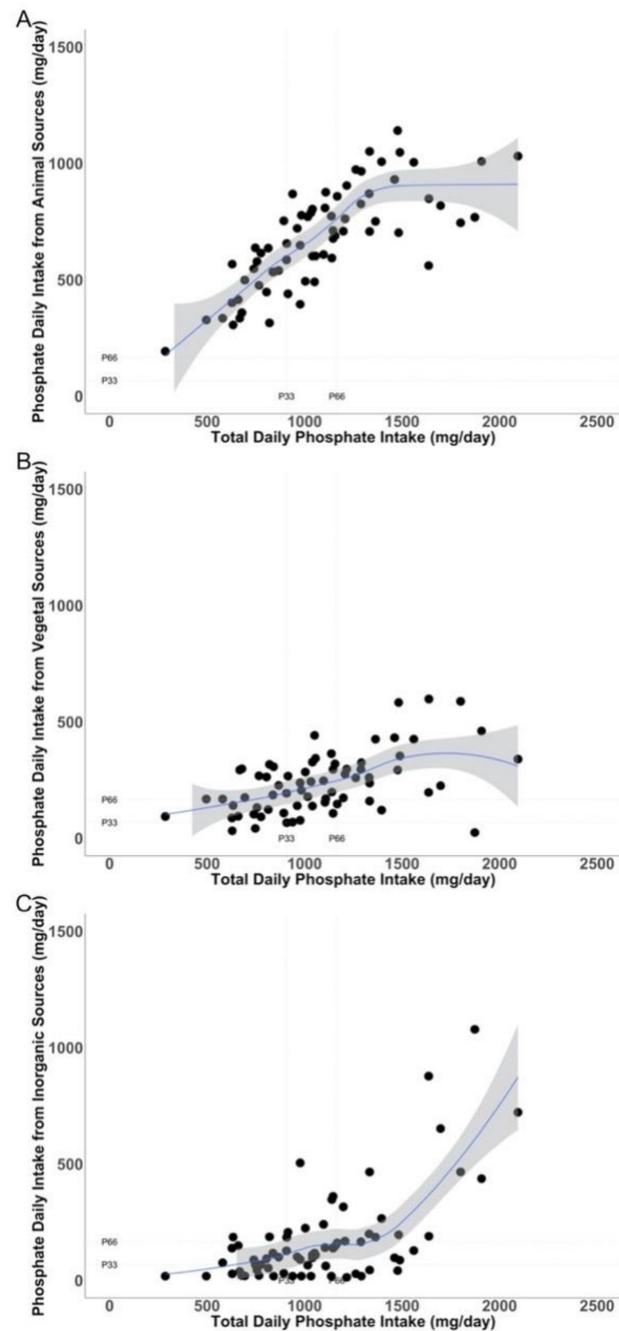
**Table 3.** Simple linear correlation analysis.

Variable	Spearman Coefficient	Significance ( $p$ )
(A) Total P intake (mg/day)		
Urine P Excretion (mg/day)	0.189	0.128
FeP (%)	−0.088	0.484
Urine P Excretion/eGFR (mg/day/GFR)	−0.032	0.797
P/Creatinine ratio (mg/mg)	0.110	0.373
UUN (g/day)	−0.11	0.927
UUN/Creatinine ratio(mg/mg)	−0.088	0.471
P/UUN ratio (mg/g)	0.284	0.018
(B) P/UUN ratio (mg/g)		
P from Animal protein (mg)	0.160	0.189
P from Vegetable protein (mg)	0.223	0.066
Inorganic P (mg)	0.332	0.005

(A) Total phosphate intake (mg/day) (dependent variable) vs.independent variables, measured in 24-h urine collection. (B) Phosphate/UUN ratio (mg/mg/g) (dependent variable) vs.independent variables: phosphate ingested from animal protein; phosphate ingested from vegetable protein and inorganic phosphate ingested. P: phosphate; eGFR: estimated glomerular filtration rate using CKD-EPI; FeP: fractional excretion of phosphate; UUN: urine urea nitrogen.

These findings are not surprising since inorganic P augments the numerator of the P/UUN ratio, whereas animal or vegetable sources of P increase both the numerator and the denominator of the P/UUN ratio. Therefore, according to the results presented in Table 3, the P/UUN ratio, but not the daily phosphaturia, appear to reflect the intake of inorganic P.

To assess to what extent the different sources of P ingested account for the total P intake, the amount of P ingested from the different sources (animal, vegetable, and inorganic) was plotted against total P intake (Figure 2A–C, respectively). Patients within the highest tertile of P intake show a disproportionately high intake of inorganic P (Figure 2C) relative to the amount of P ingested of animal (Figure 2A) or vegetable (Figure 2B) origin. Therefore, patients within the highest tertile of P intake eat proportionally more inorganic P than P from proteins; thus, in these patients, it is expected to find an elevation in the P/UUN in the urine.



**Figure 2.** Relationship between the amounts of phosphate intake (mg/day) from different sources (Y axis): animal (A), vegetal (B), and inorganic (C), and the total phosphate intake (mg/day) (X axis). Tertiles of phosphate intake and the tertiles of the different sources of phosphate are shown as dotted line in the Y and X axis. P: phosphate.

Subsequently, patients were categorized into tertiles of P/UUN ratio in urine to determine if patients with the higher P/UUN ratio show a high intake of inorganic P. Patients in the highest tertile of P/UUN ratio showed a significantly higher intake of P mainly from inorganic sources. Moreover, it exhibited more phosphaturia (Table 4). Although the average intake of inorganic P is substantially less than that of organic P, the intestinal absorption of inorganic P double that of organic P. The age and eGFR were similar in the different tertiles of P/UUN (Table 4).

**Table 4.** Patients separated by tertiles of urine phosphate/urine urea nitrogen ratio. Comparisons of age; glomerular filtration; total intake of phosphate; phosphate intake from animal, vegetable and inorganic sources; fractional excretion of phosphate; urine phosphate excretion per day.

Variable	T1 (<58.9 mg/g) n = 24	T2 (58.9–71.1 mg/g) n = 23	T3 (>71.1 mg/g) n = 24	<i>p</i>
Age (years)	62 ± 10	62 ± 8	61 ± 9	0.863
GFR (CKD-EPI) (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	65 ± 23	66 ± 20	73 ± 19	0.441
Total intake of P (mg/day)	979.3 ± 348.5	1042.1 ± 355.2	1227.2 ± 347.3	0.047
P intake from animal source (mg/day)	628.5 ± 98.9	673.0 ± 726.2	726.2 ± 164.8	0.243
P intake from vegetable source (mg/day)	194.0 ± 98.9	257.3 ± 143.9	255.4 ± 137.2	0.185
Inorganic P intake (mg/day)	160.1 ± 211.1	113.4 ± 103.6	247.1 ± 253.1	0.038
FeP (%)	22.9 ± 12.3	24.1 ± 10.6	22.9 ± 6.8	0.653
Urine P Excretion (mg/day)	696.7 ± 237.2	770.1 ± 313.7	923.6 ± 356.1	0.049

FeP: fractional excretion of phosphate; GFR: glomerular filtration; P: phosphate; P/UUN ratio: phosphate/urine urea nitrogen ratio.

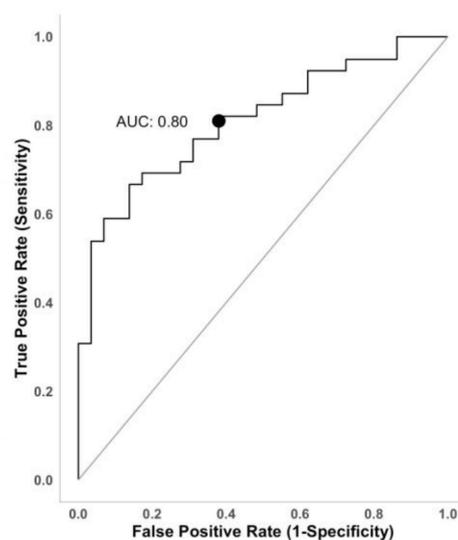
The amount of inorganic P in the diet is not quantified with precision. However, we had available a self-reported questionnaire from patients indicating whether they had eaten processed foods, bakery, beverages, and others that are known to contain different amounts of inorganic P. Patients were asked to answer whether they ingested known processed food in a binary fashion (Yes/No). This is not an estimation of the amount of inorganic P ingested, it was just a yes/no answer. A logistic regression was performed to analyze if the urinary P/UUN ratio was associated with the probability of having consumed processed food. The mean (SD) values of P/UUN were: 71.4 ± 15.9 mg/g and 60.6 ± 14.9 mg/g, *p* = 0.005, in patients who, respectively, reported having consumed processed food and those who did not. Results of logistic multivariable regression analysis using eat vs did not eat processed food as dependent variables showed the following information (Table 5):

**Table 5.** Multivariable logistic regression showing the factors associated with the probability of having consumed processed food.

Characteristic	Model 1			Model 2		
	OR	95 % CI	<i>p</i> -Value	OR	95% CI	<i>p</i> -Value
Gender (F vs. M)	0.939	0.232, 3.696	0.93			
Age (Years)	0.885	0.811, 0.95	<b>0.002</b>	0.883	0.807, 0.95	<b>0.003</b>
P/UUN ratio (mg/g)	1.058	1.015, 1.111	<b>0.013</b>	1.061	1.019, 1.112	<b>0.007</b>
P from animal sources (mg/day)	1.000	0.997, 1.003	0.82			
P from vegetal sources (mg/day)	1.002	0.997, 1.007	0.52			
GFR (CKD-EPI) (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )				1.000	0.97, 1.029	0.99

Model 1: adjusted for age, gender, P/UUN ratio, daily P intake from animal and vegetable sources. Model 2: adjusted for age/P/UUN ratio, and eGFR by CKD-EPI equation. The bold means *p* < 0.05. OR: odds ratio; CI: confidence interval; F: female; M: male.

P/UUN ratio is independently associated with the probability of having consumed P from inorganic sources. Age, on the contrary, is associated with the probability of having consumed P from other than inorganic P sources. The AUC of the model is 0.809 (Figure 3). Sensibility and specificity of the model were 82% and 62%, respectively. Youden's index with bootstrap estimation for simulating the cutpoint variability (1000 replications) was used to estimate the optimal cutpoint to discriminate patients who self-reported having consumed processed food from those who did not. Patients with a urine P/UUN ratio >67.3 mg/g have 80% probability of eating processed food.



**Figure 3.** ROC curve representing the diagnostic accuracy of model 2. Area under the curve (AUC) = 0.80. The sensitivity of the model was 82% meaning the ability of the model to properly recognize the subjects that consumed processed food. Specificity was 62%, indicating that 62 out of 100 non-processed food consumers were properly identified. The accuracy of the model was 75%.

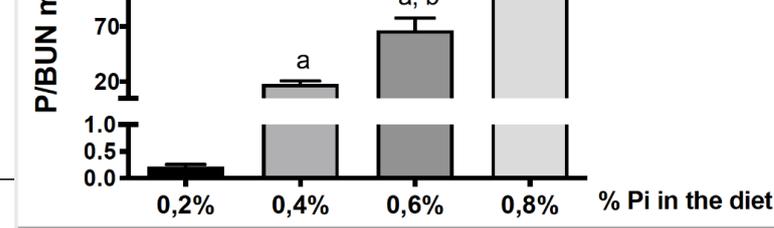
The relationship between urine P parameters and phosphaturic hormones c-FGF23 and PTH was also analyzed. A simple linear correlation analysis is shown in Table 6. The 24-h urine P excretion, the urine P/Cr ratio, and the P/UUN ratio failed to show a significant correlation with c-FGF23 or PTH. However, eGFR, and the FeP correlated significantly with both c-FGF23 and PTH. Therefore, circulating levels of c-FGF23 and PTH correlated with the tubular load of P, but not with the total urinary excretion of P. The serum concentration of calcium, P, CRP, albumin, and iron did not show significant correlation with, c-FGF23 or PTH (data not shown).

**Table 6.** Simple linear correlation analysis between phosphate parameters obtained from 24-h urine collection and phosphaturic hormones.

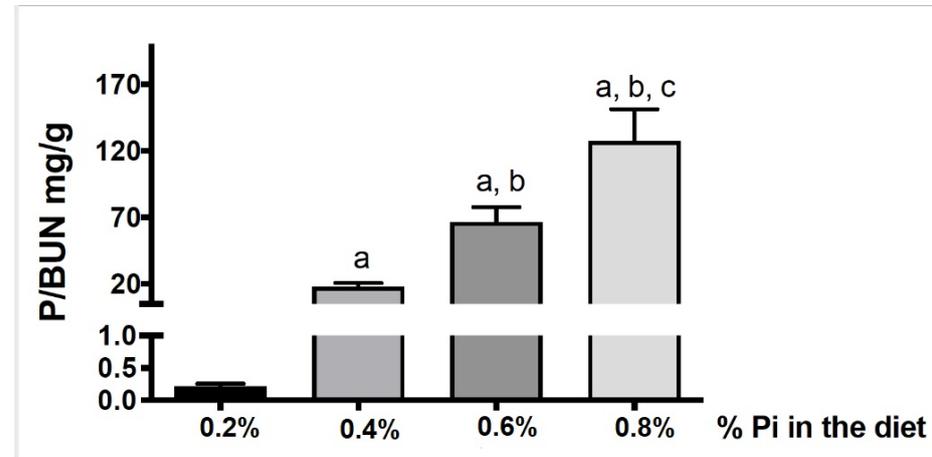
Variable	Spearman Coefficient	Significance ( <i>p</i> )
<b>Urine P excretion (mg/day)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	−0.149	0.225
PTH (pg/mL)	−0.096	0.435
<b>Urine P/Cr ratio (mg/mg)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	−0.009	0.938
PTH (pg/mL)	0.148	0.221
<b>Urine P/UUN ratio (mg/g)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	−0.022	0.859
PTH (pg/mL)	0.147	0.228
<b>eGFR (CKD-EPI)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	−0.534	<0.001
PTH (pg/mL)	−0.265	0.050
<b>FeP (%)</b>		
c-FGF23 (RU/mL)	0.367	0.002
PTH (pg/mL)	0.381	0.001

Fibroblast growth factor 23 (c-FGF23) and parathyroid hormone (PTH). Dependent variables: urine P excretion (mg/day): urine phosphate excretion (mg/day). Urine P/Cr ratio (mg/mg): urine phosphate/creatinine ratio (mg/mg). Urine P/UUN ratio (mg/g): urine phosphate/urine urea nitrogen ratio (mg/mg). eGFR (CKD-EPI): glomerular filtration rate estimated by CKD-EPI (mL/min/1.73 m<sup>2</sup>). FeP (%): fractional excretion of P (%).

To obtain additional information about the relationship between inorganic P intake and the urine ratio P/UUN ratio we used an experimental rat model of uremia by 5/6 Nxfed diets with increasing amounts of inorganic P (0.2%, 0.4%, 0.6% and 0.8%). Figure 4



shows that urine P/UUN increases significantly with the percentage of inorganic P ingested. This result supports that the urine P/UUN ratio could be useful to evaluate an excessive intake of inorganic P.



**Figure 4.** Relationship between inorganic P intake and P/UUN ratio. P/UUN was significantly higher as inorganic phosphate intake increases. a  $p < 0.001$  vs. 0.2% group. b  $p < 0.001$  vs. 0.4% group. c  $p < 0.01$  vs. 0.6% group. Values are mean  $\pm$  standard deviation.

**4. Discussion**

**4. Discussion**

The present study shows that the daily intake of P does not correlate with the amount of P excreted in 24-h urine collection. However, it was found that the intake of inorganic P correlates with the ratio of P/UUN in urine and patients including processed food in their diets have an increase in P/UUN in urine. In our patients, an excessive intake of P is not entirely due to high protein intake; it is due to an excess of inorganic P intake. Results obtained from animal studies demonstrate that adding inorganic P to the diet produce a commensurate increase in the ratio P/UUN in urine. The study was performed in a uniform group of CKD stages 2–3 patients with metabolic syndrome and a normal serum P concentration. This study also analyzed whether serum levels of phosphaturic hormones (PTH and c-FGF23) were useful to evaluate phosphaturia. The serum concentrations of c-FGF23 and PTH did not correlate with total urinary P excretion but with tubular load of P, FeP, and eGFR. We learned from this study that the ratio of P/UUN could be a useful tool for clinicians to assess the intake of inorganic P and to make dietary recommendations.

Our results agree with previous findings by others [12], showing that phosphaturia measured in a 24-h urine collection does not correlate with the total amount of P ingested. Phosphaturia reflects the amount of P absorbed, which varies according to the source of P ingested. The intestinal absorption of P is lower from vegetables than from meat (30 to 50% vs. 50 to 70%) [10], whereas almost all inorganic P is absorbed. The proportion of P ingested from the different sources is not uniform among the different individuals; with such variability in factors affecting intestinal absorption of P, it is not a surprise to find no correlation between total P intake and the urinary excretion of P.

Protein malnutrition is frequent in CKD patients with advanced age. Protein restriction should not be recommended in patients with elevation of the P/UUN ratio. The total amount of inorganic P ingested is less than the P intake from animal and vegetable protein; however, it is almost totally absorbed and should contribute notably to the value of the numerator of the P/UUN ratio. The P intake from proteins of animal origin contributes to the numerator, but it also increases the amount of UUN, which tends to reduce the P/UUN ratio. It is widely accepted that the value of 24-h UUN excretion is a measure of the protein intake [31], so the P/UUN ratio reflects the amount of P excreted relative to the protein intake. It can be assumed that if protein intake is maintained and the amount of inorganic P ingested is decreased, the P/UUN ratio will be reduced. This hypothesis could

be validated in future studies. From the results obtained in the present study, it is clear that if the patient has a high P/UUN ratio ( $>71.1$  mg/g), the total P intake is high and with a high proportion of inorganic P (Figure 1, Table 4). Of interest is the study by Caravaca et al., showing that the reduction in intestinal absorption of P by P binders is reflected by a decrease in urine P/urea ratio [32].

Serum levels of PTH and c-FGF23 did not correlate with the total amount of P excreted. However, these phosphaturic hormones did correlate with the eGFR and the FeP, suggesting that it is the load of P relative to the prevailing GFR what dictates the stimulation of PTH and c-FGF23.

In our patients, it was not observed a correlation between P intake and phosphaturia. Others have reported the same observation. Twenty four-hour urine P excretion was considered a parameter that reflects P intake in a situation of P balance, assuming that net P absorption is linearly related to intake. This relationship has been assumed to apply to patients with CKD [33]. Ix et al. showed that the circadian pattern of serum P is modifiable by P intake [34], and the same author showed that P intake did not correlate with phosphaturia [12]. Stremke ER et al. have recently published that 24-h urine P was highly variable and was not correlated with dietary P intake in eight patients with moderate CKD on a tightly controlled dietary intake [35].

In the western diet, P is ingested primarily as protein. The recommended dietary allowance for P in our area is 900–1100 mg/day in healthy adults. The EFSA in Europe, reports that the P intake ranges should be between 1000–1767 mg/day [36]. Our patients have an average P intake of  $1086.5 \pm 361.3$  mg/day, and only 14% is inorganic P, and much of this is contained in additives [7]. P ingested as additives are easily absorbed and excreted in the urine. The amount of P ingested as additives is low but contribute in large proportion to the P collected in urine obscuring the relationship with the total P intake. Despite their widespread use, P additives are typically unaccounted in the estimated P content of processed foods. P additives represent a significant and “hidden” P load in modern diets [3,37]. It must be recognized that the quantification of inorganic P in the diet is difficult because the foods do not have the necessary information to make the calculations. A high proportion of inorganic P is contained processed food. It was very interesting to observe that patients who reported the intake of processed food presented a high P/UUN in urine, in fact, if the value is  $>67.3$  mg/g, they have 80% probability of having processed foods in their diets. We believe that this may be a valuable information in daily clinical practice. The results obtained from groups of uremic rats fed increasing amount of inorganic P indicate that maintaining P intake of animal or vegetable origin the addition of known amounts of inorganic P to the diet will produce predictable increases in the P/UUN ratio in urine. Of course, an increase in the P/UUN may be detected if the protein intake is reduced, which would be reflected by low amounts of urinary UUN excretion.

It is not clear whether dietary P should be restricted in CKD stages 2–3 normophosphatemic patients. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines do not recommend the use of P binders in these patients if the serum P is not elevated. However, it is important to educate patients to select foods without P additives [38]. Certainly, a serum P within the high level of the normal laboratory range ( $<1.45$  mmol/L) is a risk factor for vascular calcification [15]. An argument favoring the dietary restriction of specific sources of P is the fact that the tubular load of P is associated with an increase in both c-FGF23 and PTH, which is observed before there is a significant increase in serum P concentration. Reports indicate that a progressive increase in FGF23 predicts rapid progression of kidney disease and mortality [39].

The serum concentration of PTH and c-FGF23 correlated with the tubular load of P but did not correlate with the total amount of P in the urine. The degree of renal failure determines the amount FGF23 and PTH required to excrete an excess of P intake [11]. In animals, with renal failure, the increase in the renal load of P is accompanied by a reduction in tubular expression of klotho, which generates resistance to the phosphaturic

effect of FGF23 [40]. The association between high levels of FGF23 and mortality [39] supports the importance of dietary restriction of inorganic P; therapeutic approaches to reduce the intestinal absorption of P, according to urinary P/UUN ratio, may prevent the increase in FGF23 [7,41]. Some authors have shown that short-term dietary P restriction tends to reduce FGF23 levels in patients with moderately decreased kidney function [42].

This study has several limitations. A high P load may be associated with a decrease in serum bicarbonate level, unfortunately serum bicarbonate was not measured. Moreover, it was not taken into account that patients on proton-pump inhibitors may have changed the intestinal absorption of P [43,44]. An important limitation of this type of study is the difficulty of a precise calculation of the P content in the diet despite a conscious training of patients in how to complete the dietary survey. Databases of food composition do not specify with enough precision the amount of P contained in food additives, a main source of inorganic P.

It was decided to performed this study in patients with CKD stages 2–3 with the same cause of renal failure in an attempt to collect more uniform results; however, a reasonable question is whether the results could be unrestrictedly applied to the general population. Nonetheless it is likely that the data obtained in these patients with metabolic syndrome could be useful in the general population.

## 5. Conclusions

In conclusion, our results suggest that the proportion between P and UUN excreted in urine increases with the relative amount of inorganic P ingested. Thus, the P/UUN ratio in 24-h 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/UUN ratio urine is useful to guide the dietary advice of patients with CKD.

**Author Contributions:** M.V.P.-R.d.M., R.S., J.R.M.-C., and M.R. conceived and designed the work. M.V.P.-R.d.M., N.V., C.R.-H., M.D.L.-Z., C.M.-G., R.L.-B., and E.J.D.I.T. performed substantial contributions to the acquisition and analysis of data for the work. M.V.P.-R.d.M., N.V., R.S., C.R.-H., J.R.M.-C., F.C., A.M.-M., A.J.F., S.S., and M.R. were involved in the interpretation of the data. All authors participated in drafting the work or revising it critically, and provided intellectual insights of critical importance. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Cordoba (Cordoba Research Ethics Committee, Spain. Record number: 240; committee's reference number: 2730) and *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* (Spain. EudraCT number: 2015-000619-42).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data is available on request.

**Acknowledgments:** This work was supported by a Spanish government grant from the Programa Nacional I+D+I 2013–2016 and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Grants PI18/0138, PI17/01010 co-financing from European Funds (FEDER), Consejería de Salud and EUTOX and REDinREN from the ISCIII. J.R.M.-C. is senior researcher supported by the Nicolás Monardes Programme, Consejería de Salud-Servicio Andaluz de Salud (Junta de Andalucía). All authors have read and approved the final manuscript.

**Conflicts of Interest:** M.R. received an honorarium for lectures from Amgen, Kiowa, Fresenius, Sanofi; A.M.-M.—lecture fees from Vifor pharma, Medtronic, Astellas, and AstraZeneca. The other authors declare no conflict of interest.

## References

1. Isakova, T.; Wolf, M.S. FGF23 or PTH: Which comes first in CKD? *Kidney Int.* **2010**, *78*, 947–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Block, G.A.; Wheeler, D.C.; Persky, M.S.; Kestenbaum, B.; Ketteler, M.; Spiegel, D.M.; Allison, M.A.; Asplin, J.; Smits, G.; Hoofnagle, A.N.; et al. Effects of Phosphate Binders in Moderate CKD. *JASN* **2012**, *23*, 1407–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Kalantar-Zadeh, K.; Gutekunst, L.; Mehrotra, R.; Kovesdy, C.P.; Bross, R.; Shinaberger, C.S.; Noori, N.; Hirschberg, R.; Benner, D.; Nissenson, A.R.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Vervloet, M.G.; Sezer, S.; Massy, Z.A.; Johansson, L.; Cozzolino, M.; Fouque, D. On behalf of the ERA–EDTA Working Group on Chronic Kidney Disease—Mineral and Bone Disorders and the European Renal Nutrition Working Group; The role of phosphate in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 27–38. [[CrossRef](#)]
5. St-Jules, D.E.; Goldfarb, D.S.; Pompeii, M.L.; Sevick, M.A. Phosphate Additive Avoidance in Chronic Kidney Disease. *Diabetes Spectr.* **2017**, *30*, 101–106. [[CrossRef](#)]
6. Vervloet, M.G.; van Ballegooijen, A.J. Prevention and treatment of hyperphosphatemia in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2018**, *93*, 1060–1072. [[CrossRef](#)]
7. Moe, S.M.; Zidehsarai, M.P.; Chambers, M.A.; Jackman, L.A.; Radcliffe, J.S.; Trevino, L.L.; Donahue, S.E.; Asplin, J.R. Vegetarian Compared with Meat Dietary Protein Source and Phosphorus Homeostasis in Chronic Kidney Disease. *CJASN* **2011**, *6*, 257–264. [[CrossRef](#)]
8. Karp, H.; Ekholm, P.; Kemi, V.; Itkonen, S.; Hirvonen, T.; Närkki, S.; Lamberg-Allardt, C. Differences Among Total and In Vitro Digestible Phosphorus Content of Plant Foods and Beverages. *J. Renal Nutr.* **2012**, *22*, 416–422. [[CrossRef](#)]
9. Calvo, M.S.; 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. [[CrossRef](#)]
10. Moorthi, R.N.; Armstrong, C.L.H.; Janda, K.; Ponsler-Sipes, K.; Asplin, J.R.; Moe, S.M. The Effect of a Diet Containing 70% Protein from Plants on Mineral Metabolism and Musculoskeletal Health in Chronic Kidney Disease. *Am. J. Nephrol.* **2014**, *40*, 582–591. [[CrossRef](#)]
11. Chang, A.R.; Anderson, C. Dietary Phosphorus Intake and the Kidney. *Annu. Rev. Nutr.* **2017**, *37*, 321–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Selamet, U.; Tighiouart, H.; Sarnak, M.J.; Beck, G.; Levey, A.S.; Block, G.; Ix, J.H. 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.* **2016**, *89*, 176–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. 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* **2005**, *112*, 2627–2633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dhingra, R. Relations of Serum Phosphorus and Calcium Levels to the Incidence of Cardiovascular Disease in the Community. *Arch. Intern. Med.* **2007**, *167*, 879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kendrick, J.; Kestenbaum, B.; Chonchol, M. Phosphate and Cardiovascular Disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2011**, *18*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vart, P.; Nigatu, Y.T.; Jaglan, A.; van Zon, S.K.R.; Shafique, K. Joint Effect of Hypertension and Elevated Serum Phosphorus on the Risk of Mortality in National Health and Nutrition Examination Survey-III. *JAMA* **2015**, *4*. [[CrossRef](#)]
17. Santamaría, R.; Diaz-Tocados, J.M.; Pendón-Ruiz de Mier, M.V.; Robles, A.; Salmerón-Rodríguez, M.D.; Ruiz, E.; Vergara, N.; Aguilera-Tejero, E.; Raya, A.; Ortega, R.; et al. Increased Phosphaturia Accelerates The Decline in Renal Function: A Search for Mechanisms. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ritz, E.; Hahn, K.; Ketteler, M.; Kuhlmann, M.K.; Mann, J. Phosphate Additives in Food. *Deutsches Ärzteblatt Online* **2012**. [[CrossRef](#)]
19. Uribarri, J.; Calvo, M.S. Dietary Phosphorus Excess: A Risk Factor in Chronic Bone, Kidney, and Cardiovascular Disease? *Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 542–544. [[CrossRef](#)]
20. Qin, Z.; Liu, X.; Song, M.; Zhou, Q.; Yu, J.; Zhou, B.; Wu, Y.; He, Y.; Huang, L. Fibroblast growth factor 23 as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in prospective studies. *Atherosclerosis* **2017**, *261*, 1–11. [[CrossRef](#)]
21. Perlmutter, M. Urine-serum urea nitrogen ratio: Simple test of renal function in acute azotemia and oliguria. *JAMA* **1959**, *170*, 1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Levey, A.S.; Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Zhang, Y.; Castro, A.F.; Feldman, H.I.; Kusek, J.W.; Eggers, P.; Van Lente, F.; Greene, T.; et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.-C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith, S.C. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mataix Verdú, J. *Food Composition Table*, 5th ed.; University of Granada: Granada, Spain, 2009; ISBN 978-84-338-4980-9.
25. Spanish Food Composition Database published by the BEDCA Network of the Ministry of Science and Innovation. Available online: <https://www.bedca.net/bdpub/> (accessed on 12 July 2020).
26. European Food Information Resource. Available online: <http://www.eurofir.org> (accessed on 12 July 2020).
27. EFSA NDA Panel General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA J.* **2009**, *7*, 1435. [[CrossRef](#)]

28. Yoshida, K.; Bartel, A.; Chipman, J.J.; Bohn, J.; D'Agostino McGowan, L.; Barrett, M.; Christensen, R.H.B. Tableone: Create "Table 1" to Describe Baseline Characteristics with or without Propensity Score Weights. 2020. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=tableone> (accessed on 12 July 2020).
29. Taiyun, W.; Viliam, S. R Package "Corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). 2017. Available online: <https://github.com/taiyun/corrplot> (accessed on 12 July 2020).
30. Christian, T. Cutpointr: Determine and Evaluate Optimal Cutpoints in Binary Classification Tasks. R package Version 1.0.32. 2020. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=cutpointr> (accessed on 12 July 2020).
31. Bingham, S.A. Urine Nitrogen as a Biomarker for the Validation of Dietary Protein Intake. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 921S–924S. [[CrossRef](#)]
32. Caravaca, F.; Caravaca-Fontán, F.; Azevedo, L.; Luna, E. Cómo estimar la eficacia de un captor del fósforo. *Nefrología* **2017**, *37*, 311–319. [[CrossRef](#)]
33. Palomino, H.L.; Rifkin, D.E.; Anderson, C.; Criqui, M.H.; Whooley, M.A.; Ix, J.H. 24-Hour Urine Phosphorus Excretion and Mortality and Cardiovascular Events. *CJASN* **2013**, *8*, 1202–1210. [[CrossRef](#)]
34. Ix, J.H.; Anderson, C.A.; Smits, G.; Persky, M.S.; Block, G.A. Effect of dietary phosphate intake on the circadian rhythm of serum phosphate concentrations in chronic kidney disease: A crossover study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 1392–1397. [[CrossRef](#)]
35. Stremke, E.R.; McCabe, L.D.; McCabe, G.P.; Martin, B.R.; Moe, S.M.; Weaver, C.M.; Peacock, M.; Hill Gallant, K.M. 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. *CJASN* **2018**, *13*, 1002–1012. [[CrossRef](#)]
36. EFSA NDA Panel Scientific Opinion on Dietary Reference Values for phosphorus. *EFSA J.* **2015**, *13*, 54.
37. Gutiérrez, O.M. 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*, 150–156. [[CrossRef](#)]
38. Ketteler, M.; Block, G.A.; Evenepoel, P.; Fukagawa, M.; Herzog, C.A.; McCann, L.; Moe, S.M.; Shroff, R.; Tonelli, M.A.; Toussaint, N.D.; et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: What's changed and why it matters. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 26–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Isakova, T.; Cai, X.; Lee, J.; Xie, D.; Wang, X.; Mehta, R.; Allen, N.B.; Scialla, J.J.; Pencina, M.J.; Anderson, A.H.; et al. Longitudinal FGF23 Trajectories and Mortality in Patients with CKD. *JASN* **2018**, *29*, 579–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. 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.; et al. Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. *FASEB J.* **2017**, *31*, 3858–3867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Scialla, J.J.; Wolf, M. Roles of phosphate and fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2014**, *10*, 268–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tsai, W.-C.; Wu, H.-Y.; Peng, Y.-S.; Hsu, S.-P.; Chiu, Y.-L.; Chen, H.-Y.; Yang, J.-Y.; Ko, M.-J.; Pai, M.-F.; Tu, Y.-K.; 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.* **2018**, *33*, 1977–1983. [[CrossRef](#)]
43. Minakuchi, H.; Yoshida, T.; Kaburagi, N.; Fujino, T.; Endo, S.; Takemitsu, T.Y.; Yamashita, N.; Itoh, H.; Oya, M. Proton pump inhibitors may hinder hypophosphatemic effect of lanthanum carbonate, but not of ferric citrate hydrate or sucroferric oxyhydroxide, in hemodialysis patients. *Ren. Fail.* **2020**, *42*, 799–806. [[CrossRef](#)]
44. Afshan, S.; Farah Musa, A.R.; Echols, V.; Lerant, A.A.; Fülöp, T. Persisting Hypocalcemia After Surgical Parathyroidectomy: The Differential Effectiveness of Calcium Citrate Versus Calcium Carbonate With Acid Suppression. *Am. J. Med. Sci.* **2017**, *353*, 82–86. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.**

**URL:** <https://hype-submit.aha-journals.org/>

**Manuscript Number:** HYPE/2021/17817

**Title:** FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 INCREASES ARTERIAL STIFFNESS THROUGH CHANGES IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL PHENOTYPE

**Authors:**

Noemi Vergara (Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Cordoba, Spain. University of Cordoba, Spain)

M Victoria Pendon-Ruiz de Mier (Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Cordoba, Spain. University of Cordoba, Spain. Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. Spanish Renal Research Netwo)

Cristian Rodelo-Haad (Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Cordoba, Spain. University of Cordoba, Spain. Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. Spanish Renal Research Network (REDinREN), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain.)

Gonzalo Revilla-Gonzalez (Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla)

Cristina Membrives (Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Cordoba, Spain. University of Cordoba, Spain. Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. Spanish Renal Research Netwo)

Juan M. Díaz-Tocados (IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba)

Julio Manuel Martinez-Moreno (IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba)

Carmen Herencia (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Spain)

María Encarnación Rodríguez-Ortiz (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Spain)

Rodrigo López-Baltanas (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Spain)

William Richards (ProNeuroTech)

Arnold Felsenfeld (Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System and the David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, California, USA)

Yolanda Almaden (Maimonides Institute for Research in Biomedicine of Cordoba/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba)

Alejandro Martin-Malo (1Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC); University of Cordoba; Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain., Spanish Renal Research Network (REDinREN), Instit)

Juan Urena (Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/ Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla)

Rafael Santamaria (Reina Sofia University Hospital)

Sagrario Soriano (Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Cordoba, Spain. University of Cordoba, Spain. Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain. Spanish Renal Research Network (REDinREN), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain.t)

Mariano Rodriguez (Hospital Universitario Reina Sofia)

Juan Muñoz-Castañeda (IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba)

1 **FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 INCREASES ARTERIAL STIFFNESS THROUGH**  
2 **CHANGES IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL PHENOTYPE**

3 Noemi Vergara<sup>a,b,#</sup>, M Victoria Pendón-Ruiz de Mier<sup>a,b,c,d,#</sup>, Cristian Rodelo-Haad<sup>a,b,c,d,#</sup>,  
4 Gonzalo Revilla-González<sup>e</sup>, Cristina Membrives<sup>a,b</sup>, Juan M Díaz-Tocados<sup>a,b</sup>, Julio M  
5 Martínez-Moreno<sup>a,b</sup>, Carmen Herencia<sup>a,b</sup>, Marien Rodríguez-Ortiz<sup>a,b</sup>, Rodrigo López-  
6 Baltanás<sup>a,b</sup>, Williams G Richards<sup>f</sup>, Arnold Felsenfeld<sup>g</sup>, Yolanda Almadén<sup>a,h,i</sup>, Alejandro Martin-  
7 Malo<sup>a,b,c,d</sup>, Juan Ureña<sup>e</sup>, Rafael Santamaría<sup>a,c,d\*</sup>, Sagrario Soriano<sup>a,b,c,d</sup>, Mariano  
8 Rodríguez<sup>a,b,c,d,+</sup>, Juan R. Muñoz-Castañeda<sup>a,b,c,d,+\*</sup>.

9 #These authors share the first authorship. +These authors share the last authorship.

10 <sup>a</sup>Maimonides Institute for Biomedical Research of Cordoba (IMIBIC), Córdoba, Spain.  
11 <sup>b</sup>University of Cordoba, Spain <sup>c</sup>Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital,  
12 Córdoba, Spain., <sup>d</sup>Spanish Renal Research Network (REDinREN), Instituto de Health Carlos  
13 III, Madrid, Spain, and the European Uremic Toxins (EUTOX) group <sup>e</sup>Instituto de  
14 Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de  
15 Sevilla, Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica, Sevilla, Spain. <sup>f</sup>Amgen Inc. Thousand Oaks  
16 Ca, USA. <sup>g</sup>Department of Medicine, Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare  
17 System and the David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles,  
18 California, USA. <sup>h</sup>Internal Medicine Service, Reina Sofia University Hospital, Córdoba,  
19 Spain. <sup>i</sup>Spanish Biomedical Research Networking Centre consortium for the area of  
20 Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Instituto de Health Carlos III, Madrid,  
21 Spain.

22  
23 **Running title: FGF23 promotes arterial stiffness**

24 \*Corresponding authors: PhD. Juan R. Muñoz-Castañeda.

25 [juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es](mailto:juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es) and MD, PhD. Rafael Santamaría Olmo.  
26 [rsantamariao@gmail.com](mailto:rsantamariao@gmail.com). Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC).  
27 Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Avd. Menendez-Pidal s/n. 14004,  
28 Córdoba, Spain. Phone: +34957212721.

29 Subject codes: Pathophysiology/Vascular Disease/Nephrology and Kidne

