

Susana Lucea Arnas

Regulación de la Homeostasis del Fósforo: Dieta, Inhibidores e Identificación de Nuevos Transportadores

Director/es

Sorribas Alejandre, Víctor
Guillén Monzón, Natalia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL
FOSFATO: DIETA, INHIBIDORES E
IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS
TRANSPORTADORES

Autor

Susana Lucea Arnas

Director/es

Sorribas Alejaldre, Víctor
Guillén Monzón, Natalia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

2022

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO: DIETA,
INHIBIDORES E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS
TRANSPORTADORES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS

PRESENTADA POR

Susana Lucea Arnas

DIRECTORES

Víctor Sorribas Alejaldre

Natalia Guillén Monzón

Zaragoza, Octubre de 2021

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una subvención destinada a la contratación de personal investigador predoctoral en formación para el período 2016-2020 (ORDEN IIU/1/2017) financiado por el Departamento de Innovación, Investigación y Universidad del Gobierno de Aragón, cofinanciado con el Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020.



VÍCTOR SORRIBAS ALEJALDRE, con DNI nº 25136445K, y Catedrático de Toxicología, y NATALIA GUILLÉN MONZÓN, con DNI nº 72967612C y Profesora Contratada Doctor, ambos de la Universidad de Zaragoza

HACEN CONSTAR:

Que la memoria de Tesis Doctoral presentada por Doña Susana Lucea Arnas, con el título **"REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO: DIETA, INHIBIDORES E IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS TRANSPORTADORES"**, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, ha sido realizada bajo nuestra dirección, cumple los requisitos necesarios por la legislación vigente, se enmarca dentro de las líneas de investigación seguidas por el candidato durante sus estudios del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas, coincide con el proyecto de Tesis presentado originalmente, y posee la calidad científica y ética necesaria para la obtención de dicho título.

Y para que así conste, firmo el presente en Zaragoza a 1 de octubre de 2021

Fdo. Víctor Sorribas Alejaldre

Fdo. Natalia Guillén Monzón

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, comenzar dando las gracias al Gobierno de Aragón que ha hecho posible la realización de esta tesis mediante un contrato predoctoral del que he sido beneficiaria durante estos 4 años.

Me gustaría continuar agradeciendo a todas las personas que han compartido espacio conmigo en el laboratorio. A mi director Víctor por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y compartir conmigo todos sus conocimientos, ha sido todo un privilegio; me voy sin entender muchas de tus bromas y llevándome algún que otro susto, pero ha sido divertido. A mi codirectora Natalia por aguantar mis múltiples dudas siempre con una sonrisa y una paciencia infinita, y enseñarme gran parte de las técnicas usadas, no se me ocurre nadie mejor para haber estado a mi lado estos 4 años. Pero en estas líneas no me quiero olvidar de darle las gracias a Cecilia, aunque no hayas sido mi directora en muchas ocasiones me has ayudado y aconsejado como si lo fueras. A María Jesús siempre dispuesta a ayudarme en cualquier cosa que estuviera en su mano, no te puedes imaginar lo que se te echa de menos cuando no estás (y no solo por tu trabajo) y ya para acabar a Gema y Darío mis compis de despacho, por las bromas y risas, estoy segura de que sacareis unas tesis estupendas.

A mis padres, Antonio y Mari Tere, por apoyarme siempre en aquello en lo que quisiera embarcarme, aunque os sonara un poco raro y no lo comprendierais del todo, y por estar siempre ahí por si me caía, pero dándome siempre total libertad para elegir; sin todo lo que me habéis inculcado desde pequeña todo esto sería imposible. A mi hermana Leticia y mis bichillos, Alex e Ibai; por darme tanto cariño y estar siempre a un paso de mí si lo necesitaba. A mi tía Mari y mi abuela Rosa, soy muy afortunada de tener a tantas mujeres fuertes a mi alrededor. A mis primas Carla y Andrea y a mi tío Carlos al que en algunas cosas tanto me parezco.

A mis amigas, la familia que yo he elegido; a todas mis albalatinas en Zaragoza, Carol, Piwi, Cris, Susi, Sara y Sara (no es una errata, están repetidas) con las que quedar después del trabajo en esas charlas y cenas interminables en las que reímos de todo lo bueno, pero sobretodo de lo malo. A Esther, Amaya y Noelia, que sin compartir tanto

tiempo conmigo, siempre se han preocupado por mí ya sea desde Albalate, Pamplona o pasando una semana de desconexión conmigo en Lanzarote. A Ana, te he dejado para el final no por despiste si no porque tú te mereces una mención especial, por estar siempre ahí, ser un apoyo incondicional pase lo que pase y por todas esas cervezas tan necesarias después de un mal día. ¿para qué quiero yo mindfulness si te tengo a tí?

Y estas líneas no pueden acabar de otra manera más que agradeciéndoselo a Adrián porque siempre has creído en mí, sobretodo en los momentos de desánimo donde yo no lo veía del todo claro, por escuchar siempre atentamente todas mis “historias del fosfato” (aunque no entendieras demasiado) y por toda la ayuda indirecta e incluso directa en algunas ocasiones; mentiría si dijera que esta tesis no es un poquito tuya también.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. HOMEOSTASIS DEL FOSFATO.....	5
2. TRANSPORTADORES DE FOSFATO SODIO DEPENDIENTES.....	7
2. 1. FAMILIA SLC34 (TIPO II).....	7
2.1.1. NaPi-IIa	7
2.1.2. NaPi-IIb	8
2.1.3. NaPi-IIc.....	8
2. 2. FAMILIA SLC20 (TIPO III)	9
3. FACTORES DE REGULACIÓN DEL FOSFATO.....	10
3. 1. APORTE DE FOSFATO EN LA DIETA.....	10
3. 2. HORMONA PARATIROIDEA	11
3. 3. VITAMINA D ₃ (1,25-(OH) ₂ D ₃).....	13
3. 4. FOSFATONINAS.....	14
3.4.1. Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23).....	14
3.4.2. sFRP4 (<i>secreted frizzled related protein-4</i>)	16
3.4.3. Fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE)	17
3.4.4. Factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF-7).....	17
3. 5. KLOTHO.....	17
3. 6. OTROS FACTORES.....	18
4. ABSORCIÓN INTESTINAL DE FOSFATO.....	19
5. HIPOFOSFATEMIA.....	21
6. HIPERFOSFATEMIA.....	22
6. 2. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO (NAD).....	24
7. TRANSPORTE DE FOSFATO SODIO INDEPENDIENTE.....	25
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y METODOS.....	35
1. REACTIVOS.....	37
2. INSTRUMENTAL.....	37
3. ANIMALES EXPERIMENTACIÓN.....	39
3. 2. RATAS DE LABORATORIO (<i>RATTUS NORVEGICUS</i>)	39
3.1.1. Adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fosfato en la dieta.....	40
3.1.2. Privación de fosfato.....	41
3.1.3. Caracterización de la inhibición del transporte de fosfato por NAD	42
3.1.4. Caracterización de la inhibición del transporte de fosfato por furosemida.....	42
3.1.5. Sacrificio y obtención de muestras	42
3.1.6. Análisis sanguíneo de electrolitos y gases	43
3. 2. RANAS <i>XENOPUS LAEVIS</i>	44

4. CULTIVO CELULAR.....	44
4. 1. MANTENIMIENTO DE CELULAS OK-P.....	44
4. 2. TRATAMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AMONIO Y LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.....	45
5. CUANTIFICACIÓN DE AMONIACO	46
6. MEDICIÓN pH INTRACELULAR.....	46
6. 1. MEDICIÓN pH INTRACELULAR INICIAL.....	46
6.1.1. Reactivos	46
6.1.2. Procedimiento	47
6. 2. PROTOCOLO DE RECUPERACIÓN DE PH INTRACELULAR.....	47
6.2.1. Reactivos	48
6.2.2. Procedimiento	48
7. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANAS DE BORDE EN CEPILLO	49
7. 1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	49
7. 2. PREPARACIÓN DE BBMV DE CORTEZA RENAL.....	50
7.2.1 Reactivos	50
7.2.2. Procedimiento	50
7. 3. PREPARACIÓN DE BBMV DE INTESTINO DELGADO.....	51
7.2.1 Reactivos	51
7.2.2. Procedimiento	51
8. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	52
8. 1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN CÉLULAS OK.....	52
8. 2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE MEMBRANA PLÁSMATICA EN CELULAS OK.....	53
8.2.1. Reactivos	53
8.2.2. Procedimiento	53
8. 3. METODO BCA.....	54
9. WESTERN-BLOT.....	55
9.1. Reactivos.....	55
9.2. Procedimiento.....	56
10. ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	57
11. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA	59
11. 1. EXTRACCIÓN DE RNA EN HUESO.....	59
11. 2. EXTRACCIÓN RNA CORTEZA RENAL Y YEYUNO	60
11. 3. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL RNA EXTRAÍDO.....	60
12. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA	60
13. PCR EN TIEMPO REAL.....	61
14. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ÓSEA EN TIBIAS.....	62
15. TRANSPORTE DE FOSFATO EN BBMV	63
15.1. Reactivos	63

15.2. Procedimiento	64
16. ESTUDIOS DE TRANSPORTE EN PRESENCIA DE NAD⁺, NADH Y NAM.....	65
16. 1. TRANSPORTE DE FOSFATO	65
16.1.1. Calculo de la IC ₅₀	65
16.1.2. Calculo de la K _i y determinación del mecanismo de inhibición.....	66
16.1.3. Inhibidores de la ribosilación.....	67
16. 2. TRANSPORTE DE GLUCOPIRANOSIDO MARCADO CON ¹⁴ C.....	67
16.2.1. Reactivos.....	67
16.2.2. Procedimiento.....	67
17. DEMOSTRACIÓN DE LA RIBOSILACIÓN DE NaPi-IIA Y NaPi-IIB	68
17.1. Reactivos	68
17.2. Procedimiento	69
18. DETERMINACIÓN DE NAD EN MUESTRAS DE TEJIDO	71
19. TRANSPORTE DE FOSFATO EN CÉLULAS OK-P	71
19.1. Reactivos	71
19.2. Procedimiento	72
20. NANOINYECCIÓN EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>.....	73
20. 1. OBTENCIÓN OVOCITOS.....	73
20.1.1. Reactivos.....	73
20.1.2. Procedimiento.....	73
20. 2. NANOINYECCIÓN EN OVOCITOS.....	74
20.2.1. Procedimiento de obtención del cRNA.....	74
20. 3. TRANSPORTE DE FOSFATO EN OVOCITOS.....	76
20.3.1. Reactivos.....	76
20.3.2. Procedimiento.....	76
20. 4. INYECCIÓN DE ³² P EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	77
20.4.1. Reactivos.....	77
20.4.2. Procedimiento.....	77
20. 4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA BIOTINILADA DE OVOCITOS.....	77
20.4.1. Reactivos.....	77
20.4.2. Procedimiento.....	78
21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
RESULTADOS	81
PARTE 1. ADAPTACIONES AGUDAS A CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL FOSFATO EN LA DIETA	83
1. 1. EXPERIMENTO DE ADAPTACIONES AGUDAS EN RATAS	83
1.1.1. Cuantificación del consumo de pienso, ingestión de Pi y crecimiento.....	83
1.1.2. Efecto sobre la concentración de Pi y pH en orina.....	85
1.1.3. Análisis de gases en sangre entera.....	85
1.1.4. Cuantificación de Pi en plasma y transporte de Pi en BBMV	87
1.1.5. Determinación de los factores de regulación en la homeostasis del Pi.....	88
1. 2. ADAPTACIONES AGUDAS EN RATAS PARATIROIDECTOMIZADAS (PTX).....	91

1.2.1. Cuantificación del consumo de pienso, ingestión de Pi y crecimiento	91
1.2.2. Efecto sobre el pH y la concentración de Pi y calcio en orina	92
1.2.3. Análisis de gases en sangre entera	93
1.2.4. Cuantificación de Pi y calcio en plasma y transporte de Pi en BBMV	94
1.2.5. Expresión de NaPi-IIb en BBMV de yeyuno.....	96
1.2.6. Determinación de los factores de regulación en la homeostasis del Pi	96
PARTE 2. PRIVACIÓN DE FOSFATO	99
2. 1. EFECTO DE LA PRIVACIÓN DE FOSFATO <i>IN VITRO</i>	99
2.1.1 Efecto de la privación de Pi sobre el pH intracelular	101
2. 2. EFECTO DE LA PRIVACIÓN DE FOSFATO <i>IN VIVO</i>	102
2.2.1. Cambios en orina en respuesta a bajas concentraciones de Pi en la dieta	102
2.2.2. Análisis sanguíneo en respuesta a bajas concentraciones de Pi en la dieta	105
2.2.3. Expresión proteica de diferentes transportadores en BBMV de corteza renal ..	108
2.2.4. Efecto de la privación de Pi sobre la estructura y densidad ósea.....	109
2.2.5. Análisis de la expresión de diferentes osteogenes	114
PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR NAD.....	117
3. 1. EFECTO DE NAD ⁺ , NADH Y NAM SOBRE EL TRANSPORTE DE FOSFATO EN BBMV	117
3. 2. ANÁLISIS CINÉTICO DE LA INHIBICION SODIO-DEPENDIENTE DE FOSFATO POR PARTE DE NAD ⁺ Y NADH EN BBMV	118
3. 3. EFECTO DE NAD ⁺ , NADH Y NAM SOBRE COTRANSPORTADORES Na/Pi EXPRESADOS EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	121
3. 4. ANÁLISIS DE LA RIBOSILACIÓN DE NaPi-IIA Y NaPi-IIB COMO POSIBLE MECANISMO DE INHIBICIÓN	122
3. 5. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO EN LA DIETA EN LA CONCENTRACION DE NAD EN RIÑON E INTESTINO	123
PARTE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR FUROSEMIDA	124
4. 1. EFECTO DE FUROSEMIDA SOBRE COTRANSPORTADORES Na/Pi EXPRESADOS EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	124
4. 2. EFECTO DE FUROSEMIDA SOBRE DEL TRANSPORTE DE FOSFATO SODIO-DEPENDIENTE EN CÉLULAS OK.....	126
4. 3. EFECTO DE FUROSEMIDA EN RATAS.....	127
PARTE 5. BÚSQUEDA DE NUEVOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SLC4A1	129
5. 1. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE FOSFATO PROVOCADA POR LA EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	130
5. 2. EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN RATAS ADAPTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO EN LA DIETA.....	134
DISCUSIÓN	137
PARTE 1. ADAPTACIONES AGUDAS A CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL FOSFATO EN LA DIETA	139

1. 1. REGULACIÓN EN LA INGESTA DE PI.....	139
1. 2. ESTADO ÁCIDO BASE.....	140
1. 3. TRANSPORTE DE FOSFATO EN CORTEZA RENAL Y YEYUNO.....	141
1. 4. FACTORES DE REGULACIÓN EN LA HOMEOSTASIS DEL PI.....	144
PARTE 2. PRIVACIÓN DE FOSFATO.....	146
2. 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE NHE3.....	146
2. 2. PRODUCCIÓN DE AMONIACO EN CÉLULAS OK-P.....	150
2. 3. EFECTOS DE LA PRIVACIÓN DE FOSFATO SOBRE EL HUESO.....	151
PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR NAD.....	155
3. 1. REGULACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE NAD EN CORTEZA RENAL Y YEYUNO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO EN LA DIETA.....	158
PARTE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR FUROSEMIDA.....	159
PARTE 5. BÚSQUEDA DE NUEVOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SLC4A1.....	161
5. 1. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE FOSFATO PROVOCADA POR LA EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	161
5. 2. EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN RATA ADAPTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO EN LA DIETA.....	164
CONCLUSIONES.....	165
REFERENCIAS.....	171
Anexo 1: Formulación de piensos.....	194

RESUMEN

El conocimiento preciso de la homeostasis del fosfato es necesario, ya que el fosfato inorgánico (Pi) es parte constituyente de las membranas celulares, ácidos nucleicos y huesos y regula múltiples procesos como la señalización celular o el metabolismo energético. Por ello esta tesis ha intentado abordar los siguientes objetivos.

En primer lugar, el control de la homeostasis del Pi se lleva a cabo por mecanismos tanto hormonales como no hormonales que se han estudiado mediante adaptaciones crónicas y cambios agudos a las concentraciones de Pi en la dieta en ratas. La hormona paratiroidea (PTH) se muestra como uno de los agentes principales en la regulación del transporte de Pi renal sobre todo frente a cambios agudos en la concentración de Pi, pero carece de efecto sobre la absorción intestinal que se mantiene regulada en su ausencia, así como la expresión de NaPi-IIb.

En segundo lugar, cuando la homeostasis del Pi se altera tanto por defecto (hipofosfatemia) como por exceso (hiperfosfatemia) puede suponer graves trastornos para el organismo. Más concretamente la hipofosfatemia tiene como resultado una marcada bicarbonaturia de la cual se desconocen sus causas. Por ello se ha estudiado la posible implicación del intercambiador NHE3 en la privación de Pi en células OK-P y en ratas alimentadas con una dieta de 0,1% de Pi. Los resultados indican una posible disminución de la actividad de NHE3 en células OK-P con un aumento de su fosforilación en Serina-552 tanto en OK-P como en ratas adaptadas durante 1 semana a 0,1% de Pi. Sin embargo, a 8 semanas dicho efecto desaparece y se produce una marcada remodelación ósea en respuesta a una privación de Pi prolongada.

Por otro lado, la toxicidad derivada de la hiperfosfatemia hace imprescindible la búsqueda y caracterización de inhibidores específicos del transporte de Pi como por ejemplo NAD, cuyo mecanismo de acción permanece siendo una incógnita. En BBMV de corteza renal y yeyuno se observa inhibición del transporte de Pi únicamente cuando son preincubadas con NAD⁺ y NADH tanto a temperatura ambiente como a 4°C con un mecanismo de inhibición de tipo competitivo. Sin embargo, dicha inhibición en el transporte de Pi no se reproduce en ovocitos que expresan los transportadores

conocidos de Pi. Además, el uso de furosemida en ovocitos que expresan la familia Slc34 causa inhibición del transporte de Pi e incluso su administración en ratas produce aumento en la excreción renal de Pi, por lo que abre nuevas posibilidades en su utilización.

Para finalizar, existen todavía múltiples incógnitas respecto a la identidad molecular de algunos de los transportadores implicados en el transporte de Pi sobretodo en la absorción intestinal y en la membrana basolateral de las células. Por ello en este último estudio sobre la identificación de nuevos transportadores de Pi se ha utilizado el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los resultados obtenidos en ovocitos indican la posibilidad de que Slc4a1 actúe como un canal de salida de Pi, aunque no se ha podido desentrañar su relevancia *in vivo*, ya que no se han encontrado cambios en su expresión en ratas adaptadas a diferentes concentraciones de Pi en la dieta.

I. INTRODUCCIÓN

1. HOMEOSTASIS DEL FOSFATO

El fósforo es un elemento esencial en la formación y estructura de los huesos y un compuesto limitante en múltiples procesos metabólicos. En los sistemas biológicos, el fósforo se encuentra en forma de fosfato, siendo el anión más abundante en el organismo. En humanos, el 85% del fosfato total se encuentra en hueso y dientes, el 14% en tejidos blandos y menos del 1% en el espacio extracelular, siendo esencial el mantenimiento de concentraciones de fosfato fisiológicas en este último compartimento.

En el plasma, el fosfato está presente principalmente como fosfato inorgánico (Pi) en forma de iones solubles, HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- que se encuentran en equilibrio pH dependiente ($\text{pK}_a=6,8$). Por lo tanto, a pH 7.4 la proporción entre HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- es de 4:1. En condiciones normales, la concentración de Pi en plasma es de 2,56-4,26 mg/dl de manera que hablaremos de hiperfosfatemia o hipofosfatemia si se ve aumentada o disminuida la concentración de Pi respectivamente.

La regulación de la homeostasis del fosfato se mantiene gracias al equilibrio entre la absorción intestinal, la excreción renal y la movilización ósea. En un adulto con balance metabólico cero, la cantidad de fosfato excretado a través de la orina será equivalente a la cantidad absorbida en el intestino (1).

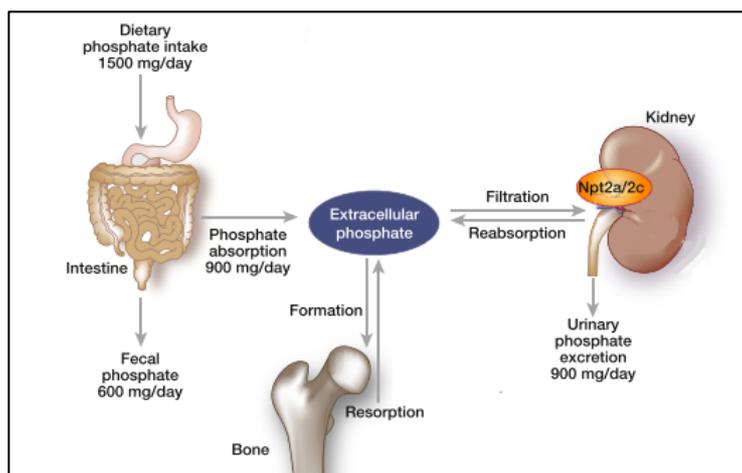


Figura I1: Homeostasis del fosfato en condiciones fisiológicas. Imagen modificada de Fukagawa et al. (2016).

El aporte diario de fosfato en la dieta en humanos varía entre 800 y 1500 mg, de los cuales aproximadamente el 65% se absorbe en intestino delgado, más concretamente en yeyuno (2). Las dietas occidentales actuales contienen un alto contenido de fosfato en forma de aditivos y conservantes fácilmente absorbibles, en contraposición al fosfato aportado por alimentos de tipo vegetal, en forma de ácido fítico, el cual es difícil de digerir (3). El fosfato es absorbido en el intestino mediante dos mecanismos, una vía transcelular llevada a cabo por transportadores, y una vía pasiva paracelular, que depende del gradiente electroquímico del fosfato en la luz intestinal. El transporte activo consta de un componente sodio dependiente y otro sodio independiente, mayoritariamente desconocido tanto en sus características funcionales como en los transportadores implicados. En cuanto a los transportadores sodio dependientes que se conocen se encuentran NaPi-IIb, considerado en la actualidad el principal transportador de Pi en intestino, Pit-1 y Pit-2 (1,3,4).

Tras la absorción, el Pi es utilizado en el organismo para muchos procesos biológicos. Por ejemplo, forma parte de los ácidos nucleicos y del ATP, mantiene la integridad estructural de la membrana plasmática (fosfolípidos), está implicado en el mantenimiento del pH y en procesos de señalización celular mediados por fosforilación y ribosilación. Además, el fosfato es utilizado por osteoblastos y osteocitos en la mineralización de la matriz extracelular ósea, ya que es uno de los componentes necesarios para la formación de los cristales de hidroxapatita, siendo el proceso de remodelación ósea uno de los factores determinantes en la concentración de fosfato en el plasma. (1).

Finalmente, el riñón es el órgano más importante en la regulación de los valores séricos de Pi. En situaciones normales (ingesta de Pi moderada), el 80% del fosfato filtrado es reabsorbido en el túbulo contorneado proximal principalmente en el segmento S1, mediado por los transportadores sodio dependientes, NaPi-IIa y NaPi-IIc (2). El 20% restante es excretado en la orina, aunque existen evidencias que apuntan a una posible reabsorción de Pi en túbulo contorneado distal en situaciones de privación de Pi (5).

2. TRANSPORTADORES DE FOSFATO SODIO DEPENDIENTES

Existen tres familias de transportadores sodio dependientes, aunque solo dos de ellas han sido reconocidas como funcionales: los de tipo II y tipo III. Los transportadores de tipo I (familia Slc17) presentan cotransporte Na^+/Pi en ovocitos, pero *in vivo* su función reside en el transporte dependiente de cloro y aniones orgánicos como el urato (6).

2. 1. FAMILIA SLC34 (TIPO II)

La familia Slc34 cuenta con tres isoformas (NaPi-IIa (SLC34A1), NaPi-IIb (SLC34A2) y NaPi-IIc (SLC34A3)) que presentan preferencia por el Pi divalente (HPO_4^{2-}). Dado que el pH determina la proporción de Pi monovalente/divalente, los transportadores tipo II incrementan el transporte de Pi cuando aumenta el pH. Además, tienen como característica común el ser inhibidos competitivamente por el ácido fosfonofórmico (PFA) (7).

2.1.1. NaPi-IIa

La isoforma NaPi-IIa se expresa en riñón, en la membrana apical de borde en cepillo de las células del túbulo contorneado proximal, predominando en el segmento S1 de las nefronas yuxtaglomerulares, aunque se extiende a los segmentos S2 y S3. También se ha detectado expresión de mRNA en cerebro y hueso, pero no se ha confirmado la presencia de proteína (8,9). NaPi-IIa actúa como un cotransportador electrogénico cuya estequiometría Na^+/Pi es de 3:1, por lo que traslada una carga positiva neta en cada ciclo (10).

La importancia de NaPi-IIa en la reabsorción de Pi en los riñones es manifiesta, en estudios realizados con ratones carentes en NaPi-IIa se estimó que este transportador es responsable de un 70% del transporte de fosfato en riñón. Además, la ausencia o mutaciones del mismo producen graves trastornos óseos y un fenotipo de hipofosfatemia (11).

2.1.2. NaPi-IIb

Se ha detectado expresión de mRNA de *NaPi-IIb* en diversos órganos incluidos pulmones, intestino delgado, glándulas salivares, glándula mamaria y útero (12). Aunque la mayor importancia reside en intestino delgado, donde se ha detectado en la membrana de borde en cepillo de los enterocitos (13).

De la misma forma que NaPi-IIa, NaPi-IIb también es un cotransportador electrogénico con una estequiometría 3:1 (Figura I2) (10). Además, tanto NaPi-IIa como NaPi-IIb en ausencia de Pi modifican su modo de transporte causando una fuga de Na⁺, dependiente del gradiente electroquímico, con una estequiometría probable de 1 ion de Na⁺ (14,15).

La importancia de NaPi-IIb en la homeostasis del Pi recae en la absorción intestinal de Pi. Sin embargo, el ratón *knock-out* de NaPi-IIb no presenta hipofosfatemia ya que la reabsorción renal parece compensar el posible descenso en la absorción intestinal. Únicamente, se observa descenso en los valores sanguíneos del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) (16). No obstante, cuando esos ratones carentes de NaPi-IIb fueron adaptados a una concentración de Pi reducida en el pienso, sí que disminuye la concentración de Pi en plasma (17). Por lo tanto, NaPi-IIb tendría una mayor relevancia cuando se reduce la ingesta de Pi.

2.1.3. NaPi-IIc

La expresión de NaPi-IIc está circunscrita a riñón, donde se encuentra en la membrana apical de borde en cepillo de las células del túbulo contorneado proximal, más concretamente en el segmento S1 de las nefronas yuxtaglomerulares. Aunque a diferencia de NaPi-IIa, no se localiza en otros segmentos del túbulo proximal (S2 y S3) (8).

NaPi-IIc difiere en su cinética, ya que es electroneutro, incorporando 2 Na⁺ por cada HPO₄²⁻ que transporta (18). Además no presenta la fuga de Na⁺ descrita en las dos isoformas anteriores, ya que el ion de Na⁺ que se une inicialmente, no es transportado al interior de la célula debido a la ausencia en su secuencia peptídica del ácido aspártico, que actúa como una carga intrínseca negativa en NaPi-IIa y NaPi-IIb (19).

Aunque el papel principal en la reabsorción del Pi en el riñón recae sobre NaPi-IIa, la función de NaPi-IIc sigue siendo relevante ya que mutaciones que alteran su funcionalidad repercuten en la homeostasis del Pi causando entre otros síntomas hipofosfatemia (20).

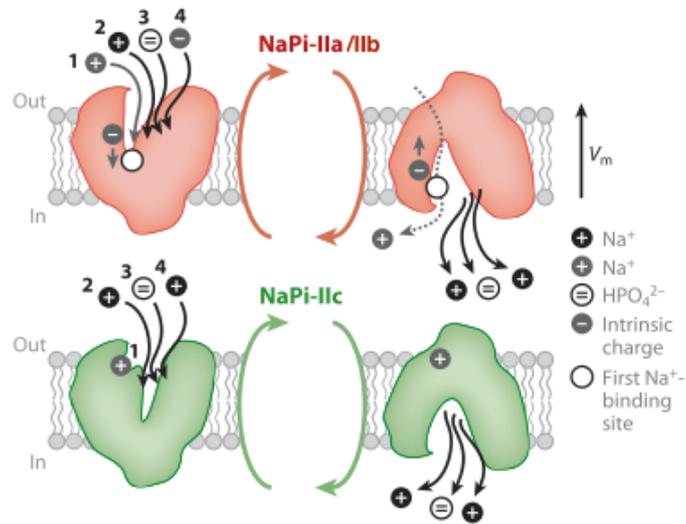


Figura I2: Mecanismo de transporte de NaPi-IIa, NaPi-IIb y NaPi-IIc. Imagen modificada de Biber et al. (2013).

2. 2. FAMILIA SLC20 (TIPO III)

La familia Slc20 tiene 2 isoformas (Pit-1 (SLC20A1) y Pit-2 (SLC20A2)), que a diferencia de los transportadores tipo II presentan preferencia por el Pi monovalente (H₂PO₄⁻) como sustrato. Por lo tanto, su actividad también se verá condicionada por el pH, aumentando a pH ácido, cuando la función de los transportadores Slc34 se ve comprometida. En cuanto a su cinética son electrogénicos, transportando dos Na⁺ por cada H₂PO₄⁻ (Figura I3). Además, se diferencian de los transportadores de tipo II en que no son inhibidos competitivamente por PFA (21).

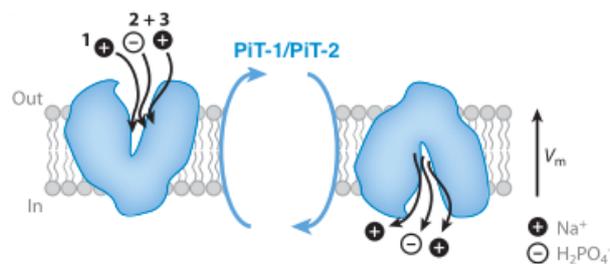


Figura I3: Mecanismo de transporte de Pit-1 y Pit-2. Imagen modificada de Biber et al. (2013).

Tanto Pit-1 como Pit-2 tienen una expresión ubicua, es decir, se encuentran en múltiples órganos y tejidos. En cuanto a su función o relevancia no parece estar muy clara. Respecto a la homeostasis del fósforo, existe expresión en la membrana apical de borde en cepillo de enterocitos (Pit-1 y Pit-2) y en el epitelio del túbulo proximal (Pit-2). En este último, la expresión de Pit-2 en ratas se encuentra regulada por el contenido de Pi en la dieta (22,23), lo que puede indicar cierta repercusión en la reabsorción del Pi.

Además, Pit-1 ha sido asociado a múltiples procesos como la osificación endocondral (24), la secreción de la hormona paratiroidea (25) o la calcificación vascular (26). Aunque cabe añadir que el transporte de Pi por Pit-1 se encuentra ya saturado en condiciones fisiológicas en las células del músculo liso vascular (27), por lo cual sería de escasa relevancia en la calcificación vascular mediada por hiperfosfatemia ya que no estaría transportando una mayor cantidad de Pi al interior de las células.

3. FACTORES DE REGULACIÓN DEL FOSFATO

La homeostasis del fósforo está controlada por una serie de mecanismos neuroendocrinos (hormona paratiroidea, fosfatoninas, vitamina D₃, etc.) que actúan sobre el intestino, hueso y riñón de forma simultánea y que a su vez pueden estar interrelacionados entre sí, estimulándose e inhibiéndose.

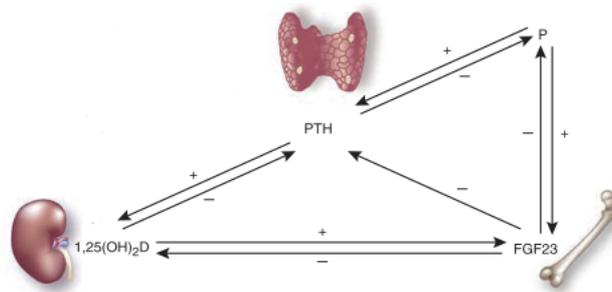


Figura I4: Esquema de las interacciones entre los principales factores de regulación de la homeostasis del fósforo, que incluyen a la hormona paratiroidea (PTH), FGF-23 y vitamina D₃. Imagen modificada de Tally et al. (2009).

3. 1. APOORTE DE FOSFATO EN LA DIETA

El aporte de Pi en la dieta supone el principal factor de regulación de la homeostasis del fósforo. La disminución en el aporte de fósforo en la dieta produce un rápido incremento (en minutos) de la reabsorción renal de Pi, mediado por un aumento en la

expresión de NaPi-IIa, seguido de NaPi-IIc y Pit-2 en la membrana apical de las células del túbulo contorneado proximal (22,28,29). De la misma manera, un aumento en la concentración de Pi en la dieta supone una disminución en la reabsorción renal de Pi, disminuyendo la expresión de NaPi-IIa, NaPi-IIc y Pit-2 (22,30).

En concreto, estos cambios se deben a la redistribución de dichos transportadores. Con alta ingesta de fosfato, NaPi-IIa es internalizado y degradado por lisosomas, mientras que NaPi-IIc se acumula en la zona subapical por lo que puede ser parcialmente reciclado (31). De la misma manera, en respuesta a baja ingesta de fosfato se produce la salida de NaPi-IIa y NaPi-IIc a la superficie de la membrana apical, mediada por los microtúbulos (32). Además, los cambios prolongados (de al menos horas) en la concentración de Pi en la dieta modifican la transcripción y traducción de los transportadores de la familia Slc34. Sin embargo, las adaptaciones rápidas a distintas concentraciones de Pi en la dieta no suponen alteraciones en la expresión de RNA (33).

Respecto a la absorción intestinal de fosfato, se ha demostrado que con adaptación crónica a baja ingesta de fosfato se produce un aumento en la absorción intestinal de Pi y aumento en la expresión de NaPi-IIb en intestino, tanto mRNA como proteína (34,35).

Además, la adaptación a las diferentes concentraciones de fosfato en la dieta, ya sean agudas o crónicas, va acompañada por una serie de cambios en la concentración de diferentes hormonas y factores. Por ejemplo, con alta ingesta de fosfato se estimulan la producción de hormona paratiroidea (36), factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) (37) y de la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE) (38). Además, variaciones de Pi en plasma son capaces de modificar la concentración sanguínea de la vitamina D₃ (39).

3. 2. HORMONA PARATIROIDEA

La hormona paratiroidea (PTH) es secretada por la glándula paratiroidea y regulada principalmente por la concentración sanguínea de calcio, aunque también puede ser regulada directamente por los valores de Pi en sangre (36). Principalmente, actúa sobre los receptores PTH1R que se encuentran en el hueso y en las células del túbulo renal. El efecto neto de las acciones de PTH en riñón y hueso tiene como resultado el aumento

de la concentración sanguínea de calcio y la disminución de la concentración sérica de fosfato.

En tejido óseo, la administración crónica de PTH produce un aumento en la resorción ósea ya que estimula la producción del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) por osteoblastos, que tiene como consecuencia el incremento del número de osteoclastos y de su actividad (40). Sin embargo, también puede aumentar el número de osteoblastos y la formación ósea al inhibir la producción de esclerostina en osteocitos (41) y la administración intermitente de PTH provoca anabolismo óseo y aumento de osteoblastos (42). En resumen, PTH produce un aumento de la remodelación ósea que puede resultar en una ganancia o pérdida de masa ósea dependiendo del equilibrio entre resorción y formación.

En cuanto al efecto sobre la regulación renal, PTH produce el aumento de la reabsorción renal de calcio, efecto contrario al que produce sobre la homeostasis del Pi donde ocasiona la disminución de la reabsorción renal de Pi mediante la internalización de NaPi-IIa, NaPi-IIc y Pit-2 en túbulo proximal (30,43,44). A través de los receptores PTHR1 que se encuentran tanto en la membrana apical como basolateral de las células tubulares, se produce la activación de la vía fosfolipasa C/proteína quinasa C (PKC). Sin embargo, desde los receptores basolaterales puede activar también la vía adenilato ciclasa/proteína quinasa A (PKA) (45). Independientemente de la vía de activación inicial, parecen tener en común la activación de ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinase*) como paso previo a la internalización de los transportadores (46). Asimismo, la internalización de NaPi-IIa en respuesta a PTH requiere como paso final la fosforilación de los dominios PDZ de la proteína de interacción NHERF1 (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1*) (Figura 15) (47).

Además, PTH estimula la síntesis de vitamina D₃ mediante el incremento de la actividad de la enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa (48) e incrementa la expresión de la fosfatonina FGF-23 (49).

La PTH tiene un papel muy importante en la adaptación renal a cambios en la ingesta de Pi, de manera que en respuesta a incrementos agudos en la concentración

de Pi en la dieta se ha descrito el aumento de forma rápida de los valores de PTH sanguíneos (50). Sin embargo, ese aumento de la concentración de PTH no siempre se ha visto acompañado de un aumento en los valores de FGF-23, fosfatonina a la cual se le atribuye en determinados estudios una relevancia comparable a PTH en la regulación de la reabsorción renal (50–53).

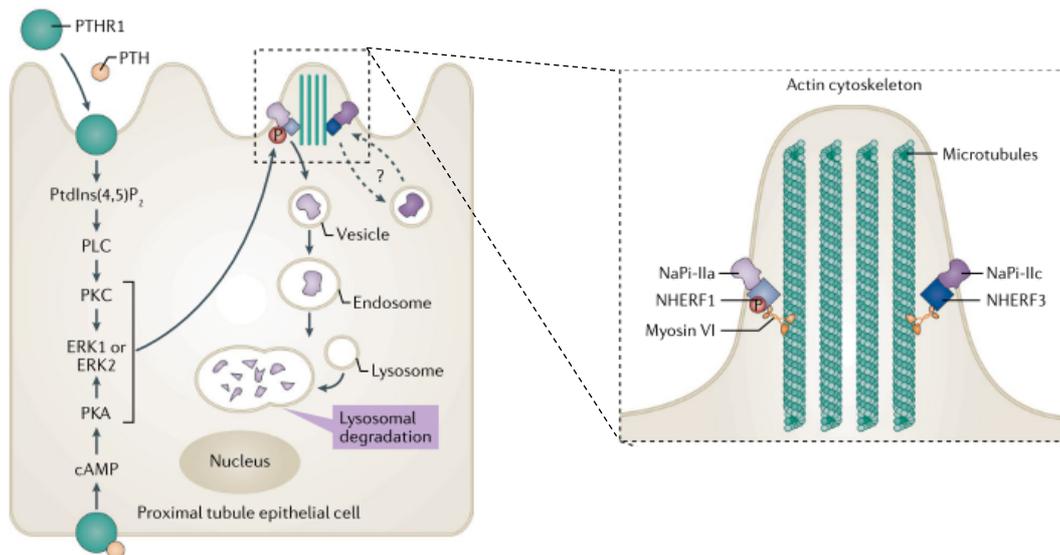


Figura 15: Mecanismo de acción por el que PTH internaliza a NaPi-IIa y NaPi-IIc. Imagen modificada de Levi et al. (2019).

3. 3. VITAMINA D₃ (1,25-(OH)₂D₃)

La vitamina D₃ se origina a partir de 7-dihidrocolesterol y ergosterol en la piel gracias a la radiación UV. A continuación, en el hígado sufre la primera hidroxilación, dando lugar al 25-hidroxicolecalciferol. Posteriormente en el riñón se produce la segunda hidroxilación, gracias a la enzima 25-hidroxivitamina D-1α-hidroxilasa, dando como resultado la 1,25-hidroxivitamina D₃ o también llamada calcitriol, forma activa de la vitamina D₃ a la que se le atribuyen sus efectos en intestino, hueso y riñón.

El efecto neto de la vitamina D₃ es un incremento del calcio y del fósforo sanguíneo. En el caso del calcio, aumenta la absorción intestinal mediante el incremento de la expresión del canal TRPV6 y de la Ca²⁺ATPasa (PMCA) facilitando el transporte transcelular. Además, induce la formación de nuevos osteoclastos y estimula la actividad de los ya existentes, lo que produce un aumento en la resorción ósea, provocando la movilización de calcio y fósforo del hueso (54).

En cuanto a la homeostasis del fosfato, ha sido ampliamente estudiada y demostrada la capacidad de la vitamina D₃ para aumentar el transporte de Pi en intestino, en especial de tipo sodio dependiente principalmente debido a un aumento en la expresión proteica de NaPi-IIb en intestino (34,55,56). Por ello se teorizó sobre el papel de la vitamina D₃ y de sus receptores VDR en el aumento en la expresión de NaPi-IIb en respuesta a baja ingesta de fosfato. Sin embargo, estudios recientes muestran que la adaptación a dietas con baja concentración de fosfato es independiente de la vitamina D₃ (34,35), pese al aumento sanguíneo de la misma gracias a la estimulación de la enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa (57).

Aunque la importancia en riñón es menor, se ha demostrado que la administración crónica de vitamina D₃ produce un descenso en el transporte cortical de Pi y reduce la expresión de NaPi-IIa en presencia de PTH (58). En cambio, en otros estudios se observó que producía un incremento en la reabsorción de Pi en túbulo proximal (59). Además, animales *knock-out* para VDR muestran disminución de la expresión proteica tanto de NaPi-IIa como de NaPi-IIc (34). Por lo tanto, no está claro el mecanismo de acción directo y su función en riñón parece ser más bien secundaria, ya que su impacto principal viene determinado por su capacidad para reducir la síntesis y secreción de PTH (60) y estimular la síntesis y secreción de FGF-23 por parte de osteoblastos y osteocitos (61).

3. 4. FOSFATONINAS

El término fosfatona fue introducido para referirse a factores responsables de la inhibición de la reabsorción renal de fosfato capaces de regular a la vitamina D₃, observados en pacientes con osteomalacia tumoral (62). Varios factores han sido relacionados con un aumento en la excreción renal, como FGF-23, sFRP4, FGF-7 y MEPE.

3.4.1. Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23)

La fosfatona más estudiada es el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) mayoritariamente expresado en hueso. FGF-23 es producido por osteocitos y osteoblastos y liberado a la circulación sanguínea, donde se caracteriza por inhibir la reabsorción renal de Pi y disminuir los valores séricos de vitamina D₃ (63).

Esta fosfatona actúa sobre receptores de tipo FGF tirosina quinasa (FGFR1-4), aunque en ocasiones precisa de la presencia de la proteína transmembranosa klotho que actúa como co-receptor, aumentando la afinidad por FGF-23 y facilitando la activación de los receptores. Mientras que FGF-23 puede activar a FGFR3 y a FGFR4 con independencia de klotho, en el caso de FGFR1 que es su principal receptor endocrino, necesita la presencia de este (64), de manera que en la mayor parte de situaciones FGF-23 actúa sobre el complejo formado por el co-receptor klotho con las diferentes isoformas de FGFR (principalmente FGFR1c, FGFR3c y FGFR4) produciendo la activación de ERK1 y 2 (65–67). Sin embargo, se han descrito otras vías de señalización que implican la activación de MAPK, de la ruta calcineurina/NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) y de la fosfolipasa C (64).

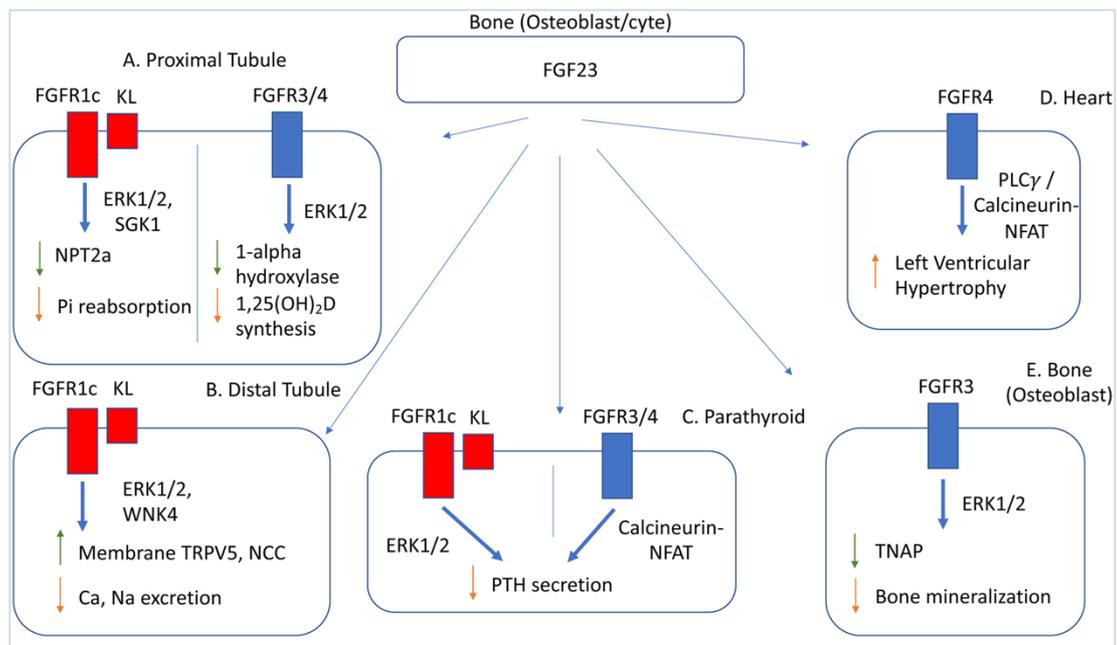


Figura 16: Esquema de las diferentes rutas de señalización descritas para FGF-23. Imagen obtenida de Bergwitz et al. (2020).

Las principales funciones de FGF-23 están relacionadas con la homeostasis de Pi, pero también puede producir aumento de la reabsorción de calcio y sodio en el túbulo contorneado distal mediante el incremento de la presencia en la membrana apical del canal de calcio TRPV5 y del cotransportador de Na⁺ /Cl⁻ NCC (68). Asimismo, se ha descrito su capacidad para producir hipertrofia cardíaca a concentraciones elevadas y de aumentar la mineralización ósea mediante el aumento de TNAP (64).

En cuanto a la homeostasis del Pi, FGF-23 inhibe la reabsorción renal de Pi a partir de la disminución de la expresión de NaPi-IIa y NaPi-IIc en la membrana apical, produciendo su internalización y redistribución en las células epiteliales del túbulo proximal, con independencia de PTH (69–71). Además, se asume que realiza dicha función principalmente mediante los FGFR1 dependientes de klotho (65,72). Aunque klotho se expresa principalmente en la región distal (73), también podemos encontrarlo en túbulo proximal donde la activación de los FGFR1 en presencia de klotho tendría como resultado la fosforilación de NHERF1 y, consecuentemente, la internalización y degradación de NaPi-IIa y NaPi-IIc (67,74).

La inhibición de la síntesis de la vitamina D₃ por parte de FGF-23 se produce gracias a la reducción de la expresión de la enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa y el incremento de la enzima catabólica 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (71,75). En cuanto al mecanismo de acción, actúa sobre receptores FGFR1, FGFR3 y FGFR4 (72), situación de la cual se puede deducir que al menos en parte podría actuar con independencia de klotho. Además, FGF-23 inhibe la secreción de PTH de forma directa actuando sobre receptores FGFR1, FGFR3 y FGFR4 presentes en la glándula paratiroidea (64).

Para finalizar cabe añadir que hay estudios que han descrito la capacidad de FGF-23 de inhibir el transporte de fosfato sodio dependiente en intestino, al menos en parte gracias a un descenso en la expresión de NaPi-IIb (76,77).

3.4.2. sFRP4 (*secreted frizzled related protein-4*)

Este inhibidor de la ruta Wnt se encuentra sobreexpresado en osteomalacia tumoral con aumento en la excreción renal de Pi (78). Se ha demostrado que sFRP4 desciende la reabsorción de Pi en túbulo proximal y reduce la expresión de NaPi-IIa en la superficie de las células del túbulo contorneado proximal en riñón de rata (79). Además, sFRP4 puede alterar el metabolismo de la vitamina D₃ causando un fallo en el incremento de su concentración en respuesta a hipofosfatemia. De manera que en ratas tratadas con sFRP4 de forma crónica se produce hipofosfatemia, pero no el aumento esperado de la 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa (80).

Sin embargo, en un estudio reciente llevado a cabo con ratones transgénicos en los que se sobreexpresó sFRP4, se determinó la ausencia de variaciones en los valores normales de Pi en plasma y orina. Los ratones transgénicos únicamente mostraron alteraciones en la mineralización ósea (81), por lo que el papel de sFRP4 en la homeostasis del fosfato es objeto de duda en estos momentos.

3.4.3. Fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE)

MEPE fue identificada por primera vez en un paciente con osteomalacia tumoral que presentaba entre otros síntomas, un aumento en la excreción renal de Pi, hipofosfatemia y alteraciones en la mineralización ósea (82). Más concretamente, MEPE se ha relacionado con la inhibición de la mineralización ósea (38).

Esta glicoproteína miembro de las SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) se caracteriza por inhibir la reabsorción renal de Pi, disminuyendo la expresión de NaPi-IIa, pero no de NaPi-IIc. Al contrario que FGF-23 y sFRP4 no inhibe la síntesis de la vitamina D₃. Además, se ha visto que es capaz de inhibir la absorción intestinal de Pi con independencia de PTH, FGF-23 y vitamina D₃ (83).

3.4.4. Factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF-7)

Es la fosfatonina menos estudiada y al igual que las anteriores se encuentra sobreexpresada en pacientes con osteomalacia tumoral. FGF-7 es capaz de inhibir el transporte sodio dependiente en células OK (Opossum Kidney) (84) y más recientemente se ha demostrado que inhibe la reabsorción renal de Pi *in vivo* (85), pero se desconoce si FGF-7 está regulado por la concentración de fosfato en plasma.

3. 5. KLOTHO

Klotho es una proteína transmembranosa expresada principalmente en riñón (túbulo contorneado distal y en menor medida túbulo contorneado proximal) y glándula paratiroidea. Posee dos dominios bien diferenciados, una fracción transmembranosa y una fracción extracelular, constituida a su vez por dos dominios (KL1 y KL2). En cuanto a su funcionalidad, el ratón *knock-out* de klotho muestra un síndrome de envejecimiento

prematureo acompañado de osteopenia, calcificaciones vasculares y ectópicas, hiperfosfatemia e hipervitaminosis D₃, entre otros síntomas (73).

Como ya se ha descrito en el apartado dedicado a FGF-23, se presenta como un co-receptor imprescindible para la acción fosfática de FGF-23 en túbulo proximal, reduciendo la expresión de NaPi-IIa y NaPi-IIc (65,74). Además el complejo klotho/FGFR con FGF-23 actúa inhibiendo la síntesis de la vitamina D₃ (72) y suprimiendo la secreción de PTH (64).

Sin embargo, la fracción extracelular de klotho puede ser liberada por proteasas de membrana al líquido extracelular o bien entera (KL1-KL2) o únicamente el dominio KL1, el cual a su vez puede ser transcrito mediante *splicing* alternativo y liberado directamente por las células (86). Tanto las diferentes fracciones de klotho liberadas mediante proteasas como las secretadas de forma directa conforman el llamado klotho soluble que puede actuar con independencia de FGF-23 teniendo un efecto fosfático propio, mediante la inactivación de los transportadores NaPi-IIa (87), Pit-1 y Pit-2 (88).

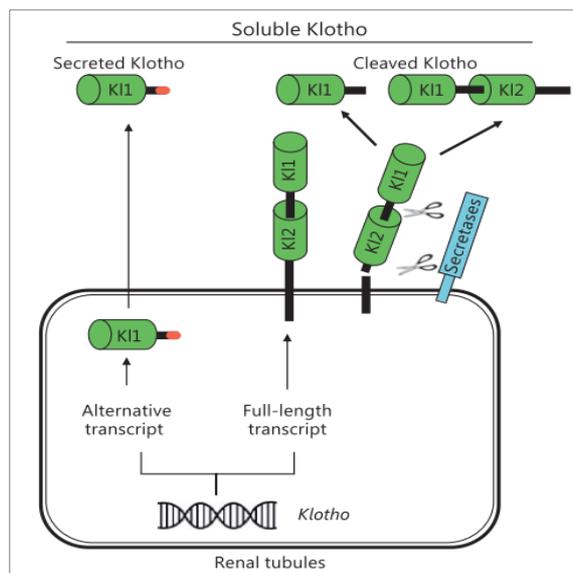


Figura 17: Diferentes formas de klotho soluble. El riñón es la principal fuente del klotho soluble bajo condiciones fisiológicas. Imagen obtenida de Hu et al. (2017).

3. 6. OTROS FACTORES

Existen otros muchos factores con mayor o menor relevancia que también pueden influir en la homeostasis del fosfato como:

- **La hormona tiroidea:** incrementa la reabsorción de fosfato en túbulo proximal mediante el aumento tanto de mRNA como de proteína del transportador NaPi-IIa (89).
- **Insulina:** aumenta la reabsorción de Pi en túbulo proximal por sí misma y previene el efecto fosfatúrico de PTH (90,91).
- **Glucocorticoides:** inhiben el transporte sodio dependiente de Pi en túbulo proximal en rata, ratón y humano (92).
- **Dopamina:** es generada en el túbulo proximal a partir de su precursor L-dopa en estímulo a altas concentraciones de fosfato y produce la internalización de NaPi-IIa y por lo tanto disminuye la reabsorción de Pi en riñón (93,94).

4. ABSORCIÓN INTESTINAL DE FOSFATO

La reabsorción renal de Pi siempre se ha descrito como el punto clave en la homeostasis del Pi. Si bien es cierto que sigue siendo así, la absorción intestinal de Pi ha ido adquiriendo mayor relevancia a lo largo de las últimas décadas. En parte se debe a que la absorción intestinal de Pi se tenía como un proceso escasamente regulado, pero actualmente se conoce que al menos NaPi-IIb, Pit-1 y Pit-2 regulan su expresión en respuesta a las concentraciones de Pi en la dieta y de vitamina D₃ (57,93,95). Además, se ha visto que cambios en la concentración de Pi en la dieta suponen cambios en la absorción intestinal. Sin embargo, cuando la ingesta de Pi aumenta la reabsorción renal siempre disminuye, pero en intestino la respuesta varía en función del régimen de alimentación ya que en cambios agudos de la concentración de Pi en la dieta, pasando de una dieta con bajo contenido en Pi a otra con alto contenido en Pi, el transporte de Pi no disminuye, si no que incluso en algunos casos aumenta (23,29).

El principal inconveniente a la hora de estudiar el mecanismo de absorción intestinal es la complejidad existente, ya que consta de dos rutas, la vía paracelular y la vía transcelular; mientras que en la reabsorción renal la vía paracelular es prácticamente inexistente (46). La vía pasiva paracelular es no saturable y dependiente del gradiente

de Pi en la luz intestinal; en cuanto a su importancia respecto a la ruta transcelular varia según el estudio y las condiciones del mismo (96–98).

En la vía transcelular predomina el componente sodio dependiente, el cual viene determinado por NaPi-IIb el principal transportador de Pi clonado en intestino delgado. Además de NaPi-IIb, se encuentran también los transportadores Pit-1 y Pit-2. Todos ellos se encuentran presentes en la membrana apical de los enterocitos, aunque difieren en sus cinéticas, especificidad por el sustrato y dependencia de pH (10,15,21). Sin embargo, se desconoce la identidad de los transportadores que estarían eliminando el Pi de la célula a través de la membrana basolateral de los enterocitos y propiciando su salida a la circulación sanguínea.

Estudios en ratones *knock-out* para NaPi-IIb han demostrado que pese a tener una importancia central en la absorción intestinal de Pi, su eliminación no supone una disminución en la concentración sanguínea de Pi cuando los animales son alimentados con una dieta con concentraciones normales o altas de Pi (17). Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores de Pi presentes en las dietas actuales en países desarrollados, NaPi-IIb podría estar saturado adquiriendo mayor relevancia la vía paracelular. Sin embargo, cuando existe restricción de Pi en la dieta, la expresión de NaPi-IIb aumenta y disminuye el gradiente de Pi determinante para la difusión paracelular, cambiando la predominancia de una ruta a otra.

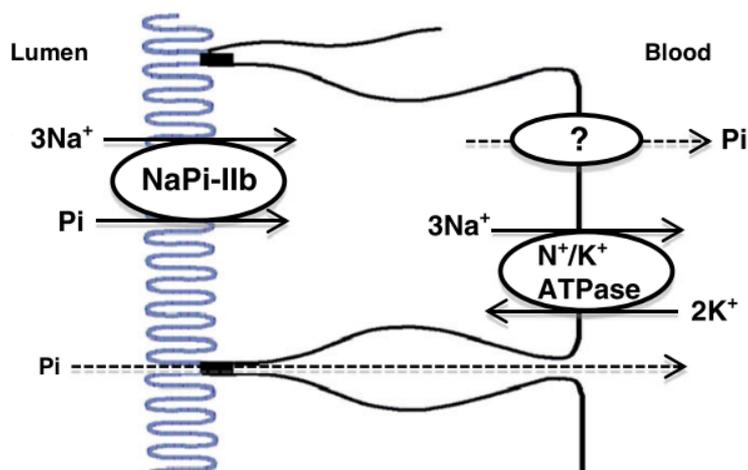


Figura I8: Absorción de Pi en el intestino delgado. Imagen modificada de Marks (2019).

Mientras que el componente sodio dependiente ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, muchas incógnitas se mantienen en cuanto al transporte sodio

independiente de Pi en intestino. Esta vía sodio independiente se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante el uso de vesículas de membrana en borde en cepillo (BBMV); y parece ser independiente de la vitamina D₃ y dependiente de pH (4,95). Además, en la línea celular intestinal humana Caco2BBE se ha caracterizado el transporte de Pi sodio independiente como un transporte específico y dependiente de la concentración de Pi en el medio, así como del pH y que puede ser inhibido por actinomicina D y cicloheximida (99). Todo ello permite concluir que existiría un componente transcelular de transporte sodio-independiente, cuya identidad molecular se desconocería.

Uno de los pocos transportadores sodio independientes descritos en la literatura es el receptor retroviral XPR1, el cual en determinados cultivos celulares actuaría sacando Pi de las células (100). Aunque poco se sabe respecto a sus características funcionales y su repercusión real en la homeostasis del Pi, ya que este estudio no ha sido reproducido y no se ha podido demostrar dicha funcionalidad *in vivo* o mediante el sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Por otro lado, se habla también de que parte de la absorción intestinal de Pi intestinal tendría lugar a través de la ruta paracelular. En concreto, se ha propuesto que proteínas como las claudinas, presentes en las uniones estrechas, pudieran estar regulando la absorción de Pi, ya que se sabe que algunas de ellas presentan selectividad por cationes o aniones (101). Sin embargo, actualmente no se ha confirmado esta posibilidad, pero la aparición y el uso del tenapanor como inhibidor de la absorción intestinal de Pi (102) indican una relación directa entre la permeabilidad del Pi y la función de las uniones estrechas.

5. HIPOFOSFATEMIA

La hipofosfatemia es un descenso en la concentración de Pi en plasma por debajo de 2,5 mg/dl en la especie humana. Aunque su incidencia es menor de un 2,2% en pacientes hospitalizados, se presenta en un alto porcentaje de casos en enfermos con determinadas patologías, incluida la sepsis (103).

Entre las posibles causas de hipofosfatemia se encuentra el hiperparatiroidismo secundario debido a la deficiencia de vitamina D₃, ya que no solo aumenta la excreción renal de Pi debido al aumento en la producción de PTH, si no que la deficiencia de vitamina D₃ disminuye su absorción intestinal (104). Además, en pacientes que sufren de alcoholismo es particularmente común encontrar hipofosfatemia como una de las complicaciones. No obstante, existen otras múltiples causas de hipofosfatemia que pueden estar relacionadas con una absorción intestinal de Pi deficiente, como el síndrome de mala absorción, malnutrición o deficiencia de vitamina D₃ (105); o con un incremento de la excreción renal en ocasiones relacionado con raquitismo o osteomalacia capaces de producir aumentos en la producción de FGF-23 y de otras fosfatoninas (78,82).

Las consecuencias derivadas de la deficiencia de Pi en el organismo pueden ser de diversa índole. Entre las más comunes se encuentran el desarrollo de rhabdomiolisis y diferentes miopatías (106) y alteraciones hematológicas debido al aumento del 2,3-difosfoglicerato en el interior de los eritrocitos causante de un aumento de la afinidad del oxígeno por la hemoglobina, lo que dificulta su liberación en los tejidos (107). Además, se relaciona con fallo cardíaco y alteraciones neurológicas. La hipofosfatemia también puede producir acidosis metabólica y alteraciones renales del túbulo proximal y distal resultantes en bicarbonaturia, calciuria y alcalinización de la orina (108), de las cuales se desconocen los mecanismos moleculares implicados.

El primer paso en el tratamiento de la hipofosfatemia pasa por establecer la patología o alteraciones causantes de la misma, para determinar si es necesaria la suplementación de Pi. En caso necesario se recomienda la administración de Pi ya sea vía oral o parenteral hasta el restablecimiento de los valores normales (105).

6. HIPERFOSFATEMIA

Se habla de hiperfosfatemia cuando los valores de Pi en sangre superan los 4,5 mg/dl en la especie humana. La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las principales causas de hiperfosfatemia, ya que causa una pérdida funcional y progresiva de nefronas en los riñones. Con ello se produce la incapacidad de excretar Pi en la orina, de manera

que la absorción intestinal de Pi excede la tasa de excreción, por lo que se pierde la homeostasis del Pi y se produce hiperfosfatemia, la cual supone un estímulo dañino sobre las nefronas funcionales existentes. Además de la ERC, existen una gran variedad de circunstancias que pueden ocasionar hiperfosfatemia, relacionadas o no con una disminución en la excreción renal de Pi, como pseudohipoparatiroidismo, acidosis láctica, síndrome de lisis tumoral, calcinosis tumoral, etc. (109).

Cuando la función renal es buena y se produce una hiperfosfatemia aguda, suele revertirse en unas 6-12 horas sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, cuando la hiperfosfatemia viene acompañada de fallo renal será necesario tratamiento, esta circunstancia incluye entre otras patologías la ERC, el fallo renal agudo o la calcinosis tumoral. Además, los valores elevados de Pi en plasma de forma prolongada en la ERC están directamente relacionados con la aceleración de la calcificación vascular, una de las principales causas de complicaciones en dichos pacientes (110).

Las posibles estrategias de tratamiento de la hiperfosfatemia incluyen la restricción de Pi en la dieta, uso de fármacos quelantes de Pi e inhibidores de la absorción de Pi. La aplicación de dietas con bajo contenido en Pi junto con la administración de quelantes de Pi han tenido un éxito moderado debido a la dificultad de controlar el Pi en la dieta presente como aditivo en múltiples comidas procesadas, el elevado número de tomas de los fármacos y sus diversos efectos secundarios, tanto en los quelantes basados en calcio como en resinas y metales (111). De esta situación deriva la necesidad de realizar una aproximación terapéutica más selectiva, con el uso combinado de inhibidores de la absorción de Pi junto con quelantes de Pi.

Dentro de los inhibidores de la absorción de Pi hay varios fármacos que presentan características prometedoras, el tenapanor (112), la niacina y derivados de la nicotinamida (NAM) (113). Mientras que el tenapanor inhibe la vía paracelular de absorción intestinal de Pi de forma indirecta al inhibir la isoforma 3 del intercambiador sodio protón NHE3 (102), NAM es capaz de inhibir el transporte renal e intestinal sodio dependiente de Pi (114,115), así como su metabolito la nicotinamida adenina dinucleótido (116).

6. 2. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO (NAD)

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) es una coenzima hidrosoluble cuya importancia en el metabolismo energético radica en su capacidad de experimentar reacciones de oxidación y reducción, actuando como transportador universal de electrones. Por lo tanto, puede encontrarse en dos formas en las células, como NAD⁺ (forma oxidada) o NADH (forma reducida). Pese a existir biosíntesis de novo a partir de triptófano o de la propia niacina ingerida en la dieta, los mamíferos usan principalmente NAM como precursor de NAD mediante rutas de rescate mediadas por la enzima nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt) (117).

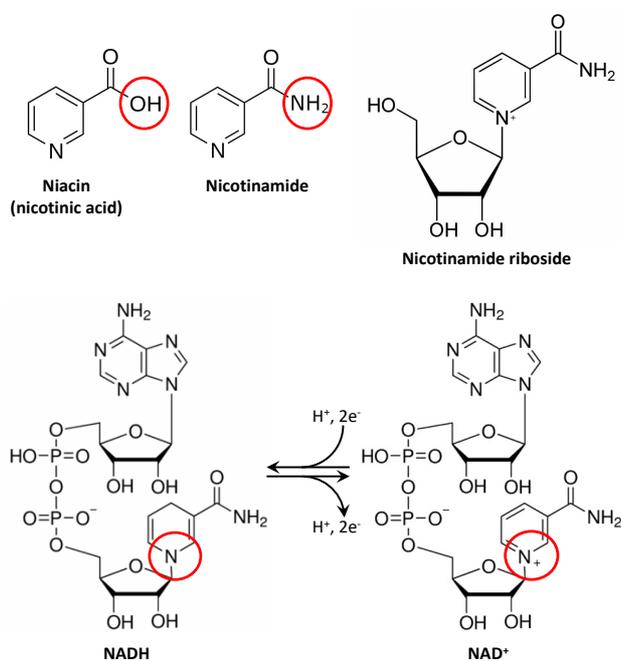


Figura I9: Estructura química de los compuestos derivados de la nicotinamida. En la parte superior los tres derivados de la vitamina B₃ y en la parte inferior el paso de NAD⁺ a NADH mediante reacciones de oxidación-reducción.

En 1981, el grupo del Prof. Dousa identificó por primera vez la capacidad de NAD⁺ de inhibir el transporte de Pi (116), pero múltiples incógnitas permanecen todavía sin resolver en cuanto al mecanismo de inhibición por el cual actúan los compuestos formados por nicotinamida. Aunque existe inhibición sodio dependiente de Pi tanto *in vivo* con la inyección de NAM, como *in vitro* a través de la incubación de BBMV renales con NAD⁺, esa inhibición difiere en su cinética, ya que *in vivo* se trata de una inhibición no competitiva, mientras que *in vitro* es inhibición competitiva (118).

El mecanismo por el cual NAM produce la inhibición no competitiva sobre el transporte de Pi parece estar relacionado con el aumento en la síntesis de NAD⁺ (119,120). Sin embargo, estudios anteriores rebaten esta hipótesis y lo asocian a un incremento en el AMPc (121) o con un cambio en el potencial redox debido a un efecto oxidativo (122).

En cuanto a su efecto, se ha demostrado que la administración de NAM en ratas es capaz de disminuir la expresión de NaPi-IIb en la membrana apical de las células epiteliales de yeyuno (123) y de NaPi-IIa en las células tubulares renales (119). Sin embargo, en las células OK la presencia de NaPi4 (NaPi-IIa presente en células OK) en la superficie celular no es modificada por NAM, y su abundancia solo disminuye cuando sobreexpresan la enzima Nampt (119).

No obstante, pese a las diferentes teorías en cuanto al mecanismo de acción de estos compuestos NAM/NAD⁺/NADH, los últimos estudios remarcan la importancia del sistema Nampt/NAD⁺ hepático en la regulación de la oscilación circadiana de la concentración de Pi en plasma, especialmente durante el periodo de descanso (120). Además, la activación renal Nampt/NAD⁺ en la fase activa indica que NAD inhibe el transporte de Pi principalmente debido a un estímulo metabólico (117,120).

Por lo tanto, se puede concluir que el metabolismo de NAD en intestino, hígado y riñón podría estar regulando estrechamente el transporte de Pi a través de la familia de transportadores Slc34.

7. TRANSPORTE DE FOSFATO SODIO INDEPENDIENTE

Como ya se ha descrito, el transporte sodio dependiente de Pi ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, pero no es el único transporte de Pi observado en el organismo. Existen muchos estudios que hablan sobre el transporte sodio independiente de Pi con diferentes características funcionales, pero se desconoce la identidad molecular de los transportadores implicados.

En la absorción intestinal son diversos los estudios que describen transporte de Pi sodio independiente, como ya se ha descrito previamente. Sin embargo, no es el único

ejemplo, ya que en el túbulo contorneado proximal se desconoce a través de qué transportadores se produce la salida del Pi del interior de la célula en la membrana basolateral y algunos de los estudios llevados a cabo describen este transporte de Pi con características sodio independientes. Más concretamente, Azzarolo et al. demostraron la presencia de transporte de Pi de tipo saturable y específico en ausencia de sodio, mediante el uso de vesículas de membrana basolateral de porcino (124).

En la barrera hematoencefálica existe transporte de Pi no solo independiente de sodio, sino también de cationes y que puede ser inhibido completamente por arsenato, PFA y varios aniones; y parcialmente por DIDS y SITS. Por lo tanto, los resultados indican la existencia de un intercambiador de aniones que tendría una gran importancia en el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de Pi en el líquido cefalorraquídeo (125,126).

Mediante el uso de cultivos primarios se ha caracterizado el transporte de Pi tanto en condrocitos como en células de la musculatura lisa vascular, y en ambos casos, se presenta un componente sodio independiente con una alta afinidad por el Pi y que puede ser inhibido por diversos compuestos (27,127). La importancia de una correcta caracterización del transporte de Pi ayudaría a una mejor comprensión de procesos patológicos relacionados con la calcificación que se pueden producir tanto en el cartílago articular, como en la musculatura lisa vascular. Además, en células *osteoclast-like* (derivadas de la línea celular RAW264.7) se observa transporte de Pi, aunque en este caso dependiente de H⁺ y pH. La importancia de este resultado radica en que la estimulación del transporte de Pi a pH ácido es necesaria para la resorción ósea, así como para la producción de las grandes cantidades de energía necesarias para la acidificación del entorno extracelular (128).

El transporte de Pi sodio independiente también está presente en procesos patológicos. En el cáncer de mama se ha descrito el aumento del transporte sodio dependiente a través del transportador NaPi-IIb, cuya expresión se ha relacionado con la evaluación del pronóstico de la enfermedad, no solo en cáncer de mama, si no también en el cáncer de ovario. Sin embargo, en las células tumorales se ha observado transporte de Pi dependiente de H⁺ que se encuentra incrementado cuando disminuye

el pH o bien cuando el transporte sodio dependiente se encuentra saturado por elevadas concentraciones de Pi (129). Por lo tanto, las células tumorales tendrían una capacidad aumentada de incorporar Pi extra al interior celular gracias a ese transporte sodio independiente de Pi. Además, el transporte de Pi sodio independiente se ha descrito en metástasis y en las células tumorales de Ehrlich (130,131).

II. OBJETIVOS

PARTE 1. ADAPTACIONES AGUDAS A CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL FOSFATO EN LA DIETA

Es necesario tener un conocimiento preciso sobre los mecanismos que regulan la homeostasis del fosfato para poder hacer frente a las diferentes patologías o alteraciones que puedan producirse en el organismo. Los cambios en la concentración de Pi en la dieta vienen acompañados de cambios en el transporte de Pi, así como en los diferentes factores reguladores de la homeostasis del Pi, no obstante, existen estudios con resultados contradictorios.

Por ello el objetivo de este estudio fue profundizar en el conocimiento de la respuesta del organismo a cambios en la concentración de Pi en la dieta tanto en ratas adaptadas de forma crónica, como con particular interés, en ratas adaptadas a cambios agudos en la concentración de Pi en la dieta, analizando tanto el transporte de Pi como los cambios en las diferentes hormonas y fosfatonas implicadas.

PARTE 2. PRIVACIÓN DE FOSFATO

En casos de hipofosfatemia está ampliamente aceptada la presencia de bicarbonaturia y orina alcalina, pero se desconoce el mecanismo por el cual se produce. Existen estudios que apuntan a una menor reabsorción de bicarbonato derivada de una menor secreción de H⁺ por parte del transportador NHE3 en el túbulo contorneado proximal pero actualmente no está claro su papel, ni el mecanismo de inhibición por el cual pudiera estar regulado.

El objetivo de este estudio fue conocer la posible implicación del intercambiador Na⁺/H⁺ NHE3 en la bicarbonaturia asociada a la privación de Pi. Además, se pretendían caracterizar los cambios producidos en orina y sangre, así como los posibles cambios óseos que pudieran estar ocasionados por un aporte deficiente de Pi.

PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR NAD

Como se ha indicado en la introducción, NAD es uno de los inhibidores del transporte de Pi que presenta características prometedoras en el control de la homeostasis del fosfato en pacientes con patologías relacionadas con hiperfosfatemia como puede ser la enfermedad renal crónica. Sin embargo, pese a conocerse su efecto inhibitorio desde hace décadas no se ha llegado a describir de forma clara su mecanismo de acción. Además, el mecanismo inhibitorio competitivo de NAD⁺/NADH se ha observado únicamente *in vitro* en BBMV de corteza renal y su estructura difiere completamente de la del fosfato.

El objetivo en este estudio fue determinar las características y el mecanismo de inhibición de NAD⁺/NADH sobre el transporte sodio dependiente en BBMV y contribuir al esclarecimiento del mecanismo por el cual NAD⁺ pudiera estar interaccionando con los cotransportadores sodio dependientes de Pi.

PARTE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR FUROSEMIDA

Como ya se ha comentado en la Introducción y en el apartado anterior, la búsqueda de nuevos inhibidores específicos del transporte de Pi sería de gran utilidad en el control de la homeostasis del fosfato. Tras probar un grupo de inhibidores entre los que se encontraba furosemida para la caracterización del transporte de Slc4a1 (Parte 5 de la presente tesis) se observó que furosemida era capaz de inhibir el transporte de Pi en ovocitos que expresaban NaPi-IIa, y por ese motivo se propuso continuar con el estudio de ese mecanismo.

Por todo ello, el objetivo de este estudio fue determinar las características y el mecanismo de inhibición por el cual furosemida podría estar actuando sobre el transporte de Pi e identificar los transportadores sobre los que pudiera tener efecto.

PARTE 5. BÚSQUEDA DE NUEVOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SLC4A1

Las características funcionales del transporte de Pi observadas en múltiples estudios no pueden ser explicadas por los transportadores de Pi conocidos hasta la fecha y como se ha descrito en la introducción, existe un componente del transporte de Pi de tipo sodio independiente cuya identidad molecular se desconoce.

El objetivo de este estudio fue la búsqueda de nuevos transportadores de Pi mediante el sistema de expresión proteica en ovocitos de *Xenopus laevis*, más concretamente mediante el análisis de la familia de transportadores Slc4. En caso de encontrar un transportador causante de cambios en el transporte de Pi, proceder a su caracterización e intentar averiguar su posible implicación *in vivo*.

III. MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados durante esta tesis doctoral fueron de calidad para análisis o para Biología Molecular (libres de ribonucleasas, DNAsas y proteasas) en función de las necesidades de cada técnica. Los reactivos fueron adquiridos principalmente en Acros-Organics, Sigma-Aldrich, Panreac y Scharlau.

El agua empleada de rutina fue agua ultrapura. Esta agua fue desclorada, descalcificada, desionizada y doblemente filtrada mediante el proceso de ósmosis inversa. Además, fue autoclavada antes de su uso. Para la extracción y procesado de RNA, el agua ultrapura fue tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) al 0,1% durante al menos 2 horas en agitación con el fin de inactivar RNAsas y fue autoclavada posteriormente para destruir el DEPC.

El material fungible usado en cultivo celular (frascos de Roux, placas, criotubos) fue adquirido a Thermo Scientific, exceptuando las placas estériles para fluorescencia procedentes de Costar. Todos los medios utilizados en cultivo celular fueron adquiridos a Gibco o Lonza: medio Eagle modificado Dulbecco DMEM:F12 (Ref. BE12-719F), DMEM sin fosfato (Ref. 11971-025), Life Cell Imaging Solution (Ref. A14291DJ), suero fetal bovino (Ref. 10270), antibióticos (penicilina + estreptomina) y L-glutamina (Ref. 25030). En Sigma-Aldrich se adquirió únicamente la tripsina (Ref. 59418C) y la Poli-L-Lisina (Ref.4707)

2. INSTRUMENTAL

Los siguientes dispositivos fueron utilizados de rutina a la largo de la tesis:

- La esterilización del material de vidrio, agua, puntas de pipetas, instrumental quirúrgico y de determinadas soluciones se realizó en una autoclave Selecta modelo Austester 437-G.
- El trabajo con cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar vertical de la marca Telstar, modelo Bio-II-A. Para el atemperado de los medios de cultivo y la descongelación de células se utilizó un baño a 37°C de la marca Selecta, modelo Precisdig. La observación de las células se llevó a cabo con un

microscopio invertido de Lan Optics. Las células se mantuvieron congeladas en un tanque de nitrógeno líquido Statebourne Biorack 2400.

- En la preparación de las diferentes soluciones se usaron diferentes balanzas y agitadores. Para pesar los diferentes reactivos y sustancias se usó una balanza ANT, modelo EK600A y una balanza de precisión OHAUS, modelo Discovery. Los agitadores magnéticos utilizados fueron de la marca Selecta y los tipo *vortex* de la marca Heidolph.
- Para las centrifugaciones con microtubos y columnas se usó de rutina la centrifuga 5415 R de Eppendorf. Únicamente se usaron la centrifuga Allegra™ 64R de Beckman Coulter para la obtención de BBMV y la centrifuga Mixtasel de Selecta en cultivos celulares.
- Para las incubaciones a 37°C y a 4°C se usó una estufa de la marca Indelab y una de la marca Selecta modelo Medilow-S, respectivamente.
- En las incubaciones en las que se requirió agitación se usaron agitadores orbitales y un balancín de marca Ovan.
- Las medidas de pH se realizaron con pHmetros de la marca Crison, modelo GLP22, para mediciones en orina y modelo micropH 2002, en la preparación de soluciones.
- Las agujas usadas fueron de la marca BD, modelo Microlance y las jeringas pertenecían a la misma marca, modelo Plastipak, Esmerald y Discardit.
- Los ovocitos fueron manipulados usando lupas y un sistema de luz fría, ambos de la marca Zeiss. El material fungible compuesto por placas de Petri de diferentes tamaños con el que se llevó a cabo las diferentes manipulaciones se adquirió a Corning.

3. ANIMALES EXPERIMENTACIÓN

3. 2. RATAS DE LABORATORIO (*RATTUS NORVEGICUS*)

En todos los estudios incluidos en esta tesis doctoral se han utilizado ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*), machos albinos de la estirpe Wistar de dos meses de edad procedentes de la empresa Janvier S.A.S., con la excepción del estudio sobre furosemida en el cual se usaron hembras. Durante el desarrollo de los experimentos, los animales se mantuvieron en el animalario del Servicio de Experimentación Animal emplazado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, con unas condiciones ambientales de temperatura, luz, ventilación y humedad adecuadas y cumpliendo con los estándares mínimos establecidos en la legislación (Real Decreto 53/2013 modificado por Real Decreto 1386/2018 y 118/2021).

Los piensos fueron encargados a SAFE Lab y diseñados por nuestro grupo de investigación a partir de la combinación de NaH_2PO_4 y K_2HPO_4 , para mantener un pH de 7.4 y las siguientes concentraciones de Pi:

- 0,1% de Pi, dieta con baja concentración de fosfato.
- 0,6% de Pi, dieta con una concentración de fosfato media, usada como dieta control.
- 1,2% de Pi, dieta con una alta concentración de fosfato.

La concentración del resto de electrolitos de la dieta se mantuvo similar, con mínimas variaciones en la concentración de sodio y potasio que fueron compensadas con la adición de NaCl y KCl (Anexo 1: Formulación piensos). El resto de elementos de la dieta como vitaminas, oligoelementos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos se mantuvieron constantes.

Se usaron dos métodos de alimentación diferentes en función del estudio realizado:

- *Ad libitum*: libre disposición de pienso y agua las 24 horas del día.

- Restringida: la administración del pienso se restringió a 4 horas al día, normalmente de 8 a 12 de la mañana. El acceso al agua fue libre durante las 24 horas.

Todos los animales fueron pesados al inicio y al final de los experimentos. Además, se midió la ingesta de pienso media por rata a diario.

3.1.1. Adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fósforo en la dieta

Para este estudio se llevaron a cabo dos experimentos:

El experimento inicial consistió en adaptaciones crónicas a las tres dietas de fósforo y adaptaciones agudas a cambios en la concentración de fósforo (Figura M1). En los grupos con adaptaciones crónicas los animales comieron el mismo tipo de pienso durante 6 días, ya fuera en un modelo *ad libitum* o con alimentación restringida. Mientras que en los grupos donde se realizó la adaptación aguda, la alimentación fue siempre restringida y en el sexto y último día se administró una dieta con una concentración de Pi diferente y opuesta a la que habían ingerido en los 5 días previos. Por lo cual, la última toma fue de 1,2% de fósforo en aquellas ratas adaptadas a 0,1% de fósforo y viceversa.

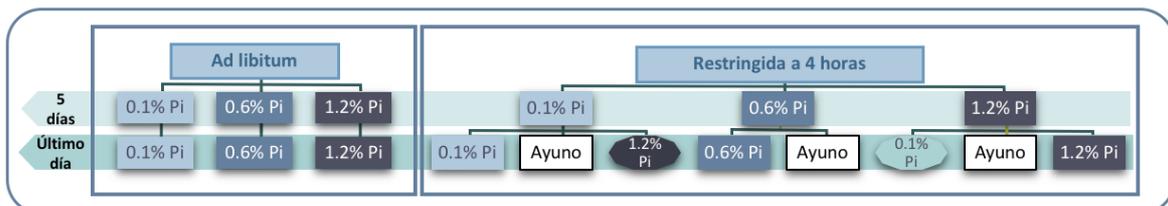


Figura M1: Esquema del experimento inicial de adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fósforo en la dieta.

El sacrificio se realizó el sexto día y en aquellos animales cuya alimentación fue restringida se realizó después de las 4 horas de alimentación correspondientes. Únicamente cuatro de las ratas con adaptación crónica y alimentación restringida fueron sacrificadas en ayunas, por lo que no recibieron pienso ese último día.

La segunda parte del estudio se realizó con ratas paratiroidectomizadas (PTX) y ratas *Sham*. Las ratas *Sham* fueron sometidas a una intervención quirúrgica similar a las

ratas paratiroidectomizadas, pero sin la eliminación de la paratiroides, por lo que actuaron como grupo control para las ratas PTX. Todas ellas fueron alimentadas con alimentación restringida durante 5 días. Tres grupos tuvieron una adaptación crónica a cada una de las tres dietas de fosfato y dos grupos tuvieron una adaptación aguda pasando de 0,1% de fosfato a 1,2% de fosfato en la última toma o viceversa (Figura M2). En este caso el sacrificio se realizó el quinto día tras la ingesta de alimento.

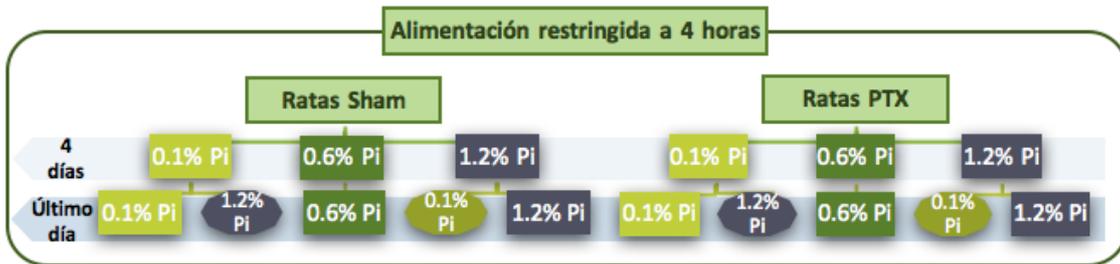


Figura M2: Esquema del estudio de adaptaciones agudas en ratas PTX.

Además, las 24 horas previas al sacrificio todas las ratas, tanto del experimento inicial, como en el estudio con ratas PTX, fueron colocadas en jaulas metabólicas para recoger orina, en la cual se realizaron mediciones de pH y cuantificaciones de fosfato, calcio y creatinina con los kits de BioAssay System.

3.1.2. Privación de fosfato

En este estudio se establecieron dos grupos, cada uno de ellos fue alimentado *ad libitum* con diferentes concentraciones de fosfato en el pienso (0,1% Pi, 0,6% Pi y 1,2% Pi). El sacrificio se realizó a diferentes tiempos con el fin de ver las diferencias entre una adaptación corta (1 semana) y una adaptación prolongada (8 semanas).

En el caso de las ratas sacrificadas tras 8 semanas se realizó un seguimiento del pH en orina, recogiendo orina durante un intervalo de tiempo de dos horas diarias. El pH de la orina se determinó mediante un microelectrodo 5208 (Hach Lange) en pHmetro GLP22 de Crison. Adicionalmente, se midió fosfato, calcio y creatinina en orina mediante kits colorimétricos de BioAssay System y se cuantificó amoníaco con el kit de Abnova (KA0810) y bicarbonato con el kit de Biolabo (99832).

3.1.3. Caracterización de la inhibición del transporte de fosfato por NAD

En este estudio se utilizaron 6 ratas de dos meses de edad alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar de contenido medio de fosfato (0,6% Pi) y fueron sacrificadas a los 7 días, para la obtención de BBMV.

3.1.4. Caracterización de la inhibición del transporte de fosfato por furosemida

En este estudio se utilizaron ratas hembra de la estirpe Wistar de 2 meses de edad. Los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas durante 48 horas, en las cuales cada 24 horas se recogió la orina y las heces eliminadas. El sistema de alimentación fue *ad libitum* cuantificando tanto la ingesta de pienso como de agua. Las ratas control siguieron una alimentación estándar que consistió en el pienso de 0,6 % de Pi, mientras que las tratadas con furosemida consumieron ese mismo pienso, pero con el fármaco integrado en él a 0,5 mg de furosemida/ g pienso.

En las orinas se realizaron mediciones de pH y cuantificaciones de fosfato y creatinina con los kits de BioAssay System. Las heces fueron pesadas tras secarse durante 3 horas y reconstituidas en 0,6 M de HCl a una concentración final de 50 mg de heces/ml y se mantuvieron 2 días en agitación. Pasado dicho tiempo, las muestras fueron homogenizadas y permanecieron de nuevo en agitación 24 horas más, tras las cuales fueron centrifugadas a 2000 g durante 5 minutos (132). El sobrenadante fue utilizado con la correspondiente dilución para la cuantificación de fosfato mediante un kit de BioAssay System.

3.1.5. Sacrificio y obtención de muestras

Este procedimiento fue común en los diferentes estudios realizados en esta tesis doctoral. En primer lugar, se inyectó pentobarbital sódico vía intraperitoneal (50 mg/kg) para anestesiarse a las ratas. Cuando el animal estuvo totalmente anestesiado se abrió la cavidad abdominal por la línea media y se procedió a extraer sangre de la arteria aorta mediante jeringas heparinizadas de la marca Sarstedt, modelo monovette 2 ml LH (heparina de litio), produciendo la muerte por exanguinación. A continuación, se extrajeron los órganos y tejidos de interés, colocándolos inmediatamente en solución

salina fisiológica (0,9% NaCl) a 4°C para su procesado. Inmediatamente, las muestras fueron congeladas en hielo seco, previo paso a su almacenamiento a -80°C.

La sangre fue centrifugada a 1500 g durante 5 minutos a 4°C para separar el plasma, que fue almacenado congelado hasta su utilización. Las determinaciones en plasma de la concentración de fosfato (DIPI-500), calcio (DICA-500) y creatinina (DICT-500) se realizaron mediante kits colorimétricos de BioAssay Systems.

3.1.6. Análisis sanguíneo de electrolitos y gases

Se realizó un análisis sanguíneo de electrolitos y gases a través del analizador Vetstat de IDEXX en los animales pertenecientes al experimento de privación de fosfato y en el de adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fosfato en la dieta. Para ello se utilizó la sangre entera extraída en el momento del sacrificio mediante jeringas heparinizadas de la marca Sarstedt, modelo monovette. En primer lugar, se introdujo un nuevo casete en el analizador y una vez finalizada la calibración, se mezcló e introdujo la muestra. Los parámetros analizados fueron:

- Estado ácido-base:
 - pH.
 - Presión parcial de dióxido de carbono (PCO_2).
 - Bicarbonato (HCO_3^-).
 - Diferencia aniónica o Anión Gap: el valor de los aniones medidos habitualmente restando el valor de los cationes medidos habitualmente.
$$\text{Anión gap} = (Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)$$
 - Cantidad total de dióxido de carbono medido en sangre (tCO_2).
 - Exceso de bases (BE): determina las bases titulables de la sangre.
- Estado oxígeno/hemoglobina:
 - Presión parcial de oxígeno (PO_2).
 - Cantidad total de hemoglobina en sangre (tHb).
 - Saturación de oxígeno (SO_2): este valor es calculado a partir de la curva de disociación del oxígeno y la hemoglobina en sangre.

- Electrolitos: sodio, potasio y cloro.

Antes de cada utilización, se usaron los casetes estándares de referencia (SRC), nivel 1 y nivel 3, para comprobar la electrónica y la óptica del analizador. Además, previamente a cada estudio se realizó un control de calidad (OPTI CHECK) con el fin de asegurar unos valores fiables dentro de los rangos significativos.

3. 2. RANAS *XENOPUS LAEVIS*

Para la obtención de ovocitos se requirió el uso de ranas hembra de la especie *Xenopus laevis*, un total de 14 individuos, que fueron adquiridas al European Xenopus Resource Centre de la Universidad de Portsmouth (Portsmouth, UK). Las ranas fueron mantenidas en un tanque negro de agua con las dimensiones reglamentarias y a una temperatura ambiental de 18°C en una nave del Servicio de Experimentación Animal emplazado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. De la misma manera que con las ratas de laboratorio, los animales fueron mantenidos con unas condiciones ambientales de luz, ventilación y humedad adecuadas y cumpliendo con los estándares mínimos establecidos en la legislación (Real Decreto 53/2013 modificado por Real Decreto 1386/2018 y 118/2021) y se siguió un sistema de alimentación adecuado.

4. CULTIVO CELULAR

Para todos los estudios realizados con cultivos celulares se usaron las células Opossum Kidney (OK), más concretamente el subclon OK-P. Las células OK proceden de una línea celular de zarigüeya americana (*Didelphis virginiana*) y han sido utilizadas como modelo de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal de riñón.

4. 1. MANTENIMIENTO DE CELULAS OK-P

Se partió de células congeladas en nitrógeno líquido con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). La descongelación debe ser rápida, por lo que se procedió a poner el vial en un baño a 37°C. Con el fin de eliminar el DMSO que contienen, fueron centrifugadas y el pellet fue resuspendido con 10 o 20 ml de medio de cultivo, en función de la concentración a la que fueron congeladas.

Las células OK-P crecieron en cultivo en monocapa en frascos de Roux de 75 cm² con DMEM:F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1x de penicilina/estreptomina/L-Glutamina. El medio se cambió cada dos días. Se mantuvieron en una incubadora marca Labline a 37°C con una atmosfera al 5% de CO₂ y saturada de humedad.

Cuando se alcanzó la confluencia se procedió a su tripsinización con 5 ml de tripsina. Las células fueron resemebradas en frascos de Roux (dilución 1:5) con el fin de mantener el linaje celular (indicando el número de pase en el que se encontraban) o fueron sembradas en placas para su uso experimental. En determinados momentos, se procedió a congelar en criotubos parte de esas células en presencia de 10% de DMSO como crioprotector. Los viales se introdujeron en un contenedor de criotubos marca Nalgene con isopropanol en el congelador de -80°C, de esta manera se consigue que el descenso de temperatura sea gradual, evitando la formación de cristales que puedan dañar la integridad celular. Transcurridas 24 horas, los criotubos fueron introducidos en el tanque de nitrógeno líquido (-195°C) para su conservación a largo plazo.

4. 2. TRATAMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AMONIO Y LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Las células OK-P fueron sembradas en placas de 7854 mm² para extracción de proteína y en placas de 6 pocillos (962 mm²) para cuantificación de amoniaco. Una vez alcanzada la confluencia, fueron adaptadas durante 24 horas a 0,1 mM, 1 mM y 2 mM de Pi, adicionado en medio DMEM sin fosfato al 0,2% SFB. Durante estas 24 horas la concentración de CO₂ del incubador se incrementó al 10% para evitar la alcalinización del medio, debido a la elevada concentración de bicarbonato en el medio DMEM. Cuando finalizó la adaptación, las placas fueron colocadas en hielo para evitar la activación de su metabolismo y retirar el medio de cultivo rápidamente (evitando cambios de pH). A continuación, se prosiguió con el procedimiento específico para cada extracción.

5. CUANTIFICACIÓN DE AMONIACO

Para la cuantificación de amoniaco se utilizó el Ammonia Assay Kit (KA0810) de Abnova. Las células fueron homogeneizadas en el Assay Buffer del kit y se centrifugaron para eliminar el material insoluble. Al sobrenadante diluido 1/5 se le añadió el preparado de la reacción que contiene OxiRed, que reacciona con el amoniaco de la muestra generando color. La reacción se incubó a 37°C durante 60 minutos protegida de la luz y se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de placas DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter).

Se normalizó la cantidad de amoniaco con la cantidad de proteína presente en las muestras.

6. MEDICIÓN pH INTRACELULAR

La medición del pH intracelular se realizó con el pHrodo Green AM (Life Technologies), un fluorocromo sensible a los cambios de pH entre 4 y 9, por lo que incluye el rango fisiológico de pH citoplasmático. La técnica se basa en la capacidad del pHrodo Green AM de atravesar la membrana plasmática de las células de forma no invasiva. Tras su entrada queda retenido debido a la eliminación de sus grupos esteres por esterasas no específicas.

Además del pHrodo Green AM, se usó el Intracellular pH Calibration Buffer Kit de Invitrogen, que consigue la fijación de un pH intracelular determinado a partir de un tampón extracelular (pH 4.5, 5.5, 6.5 y 7.5). Mediante la realización de una recta de calibrado con al menos tres puntos diferentes de pH se calculó el pH de las muestras.

6. 1. MEDICIÓN pH INTRACELULAR INICIAL

6.1.1. Reactivos

- pHrodo Green AM y Powerload concentrate de Life Technologies.
- Intracellular pH Calibration Buffer Kit de Invitrogen.
- Tampón con Na⁺ (145 mM NaCl, 7 mM HEPES-Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2 mM Glucosa).

6.1.2. Procedimiento

Previamente al sembrado de las células OK, las placas de 96 pocillos estériles para fluorescencia fueron tratadas con Poli-L-Lisina al 0,01% durante 1 hora. Seguidamente se sembraron las células con medio DMEM:F12 al 10% SFB.

Cuando las células alcanzaron la confluencia fueron adaptadas a las diferentes concentraciones de Pi durante 24 horas. Para ello se usó medio DMEM sin fosfato al 0,2% SFB suplementado con 0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM de Pi (incubadora al 10% de CO₂). Tras el periodo de adaptación, se aspiró el medio y se reemplazó por Live Cell Imaging Solution (LCIS) de Gibco.

Al mismo tiempo se preparó la solución de trabajo, diluyendo el pHrodo en Powerload concentrate, que facilita la entrada del fluorocromo en la célula, y a su vez en LCIS, con las concentraciones correspondientes de Pi para cada condición.

Se reemplazó la solución de lavado con la solución de trabajo con pHrodo Green y se incubaron las células durante 30 minutos a 37°C en estufa (Indelab). A continuación, se retiró la solución fluorescente y tras los lavados, se incubó durante 5 minutos con el tampón con Na⁺ para equilibrar las células. La medida inicial de fluorescencia se realizó en este punto a Ex/Em= 485/535 nm en el lector de placas DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter) atemperado a 37°C.

En los pocillos de calibración, se incubó con el pHrodo Green AM igualmente durante 30 minutos a 37°C, pero tras lavar, se incubó durante 5 minutos a 37°C con los diferentes tampones de calibración con 10 µM de Valinomicina/Nigericina.

6. 2. PROTOCOLO DE RECUPERACIÓN DE pH INTRACELULAR

El protocolo de recuperación (Figura M3) se basa en la premisa de que al añadir NH₄Cl al medio se produce la alcalinización de las células debido a la entrada de NH₃ de forma pasiva al interior de las células donde se une a H⁺. Cuando los niveles de NH₃ intracelular y extracelular se equilibran, el NH₄⁺ del medio puede entrar en la célula y disociarse en NH₃ y H⁺, causando una lenta acidificación debido a su entrada gradual. Cuando se quita el NH₄Cl del medio, el NH₃ difunde hacia el exterior por lo que produce

un descenso rápido y acusado del pH, que se verá aumentado por la disociación del NH_4^+ presente en la célula en NH_3 y H^+ , realizado con el fin de mantener el equilibrio en el interior de la célula. En la última fase, la célula trata de ajustar su pH a los valores previos, sacando los H^+ generados en exceso en la fase anterior mediante transporte activo (133).

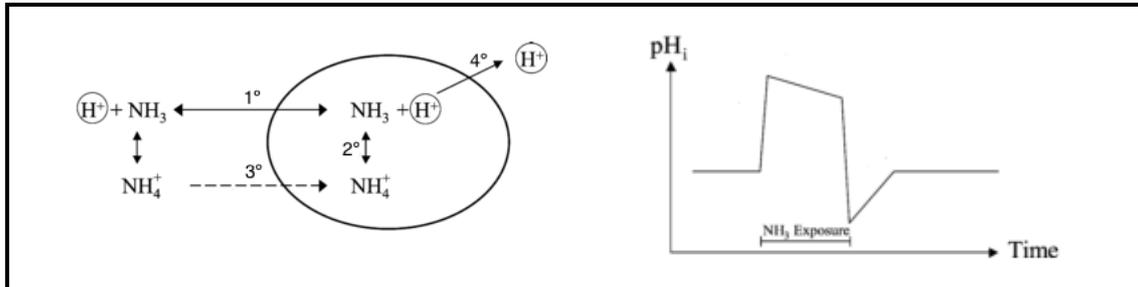


Figura M3: Esquema del protocolo de recuperación de pH con NH_3Cl . Imagen modificada de Ozkan et Mutharasan (2002).

6.2.1. Reactivos

- Tampón sin Na^+ (125 mM N-metil-D-glucamina, 7 mM HEPES-Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 2 mM Glucosa).
- Tampón con Na^+ (145 mM NaCl, 7 mM HEPES-Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 2 mM Glucosa).
- 1 M NH_4Cl .

6.2.2. Procedimiento

Tras la medida inicial de pH intracelular que supone el momento en el cual se realiza la primera calibración, se llevó a cabo el protocolo de recuperación de pH intracelular. En primer lugar, se incubaron las células con 20 mM de NH_4Cl diluido en tampón sin Na^+ durante 5 minutos. En estos 5 minutos se realizaron dos medidas de fluorescencia. A continuación, se hizo un lavado con el tampón sin Na^+ y se realizaron de nuevo dos medidas de fluorescencia separadas por 2 minutos. En este punto se realizó una segunda calibración. Para finalizar, se adicionó el tampón con Na^+ para poder observar la recuperación de las células y se realizaron medidas cada 2 minutos. Simultáneamente se realizó la última calibración.

7. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANAS DE BORDE EN CEPILLO

Existen diferentes técnicas para la preparación de vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV, *Brush Border Membrane Vesicles*) aunque la más ampliamente utilizada ha sido la purificación mediante cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} . Este método permite aislar fragmentos de las membranas apicales de borde en cepillo de enterocitos del intestino delgado y de células del túbulo contorneado proximal del riñón, y su posterior distribución formando vesículas. El epitelio de estos tejidos se encuentra polarizado, con una mayor densidad de cargas negativas en la superficie de las membranas de borde en cepillo del extremo apical, lo cual impide la unión de los cationes divalentes y la formación de agregados que si se forman con el resto de membranas que precipitan al centrifugar a bajas revoluciones.

En el proceso de purificación se usó Mg^{2+} , ya que el Ca^{2+} puede activar fosfolipasas causantes de alteraciones en la composición lipídica. Con el fin de enriquecer el porcentaje de membranas apicales obtenidas se realizó una doble precipitación con Mg^{2+} , ya que aumenta hasta en 15 veces la concentración de proteína respecto al homogeneizado inicial (134).

7. 1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras el sacrificio de las ratas, se extrajeron los tejidos de interés lo más rápido posible, manteniéndolos en solución salina fisiológica 0,9% NaCl a 4°C en hielo.

El intestino delgado fue cortado en las tres secciones que lo forman (duodeno, yeyuno e íleon) y cada una de ellas fue lavada con solución salina fría para eliminar restos del contenido intestinal. Posteriormente, fue cortado longitudinalmente con una tijera de punta roma y se realizó el raspado de la mucosa con la ayuda de un portaobjetos de vidrio.

El riñón, previamente descapsulado, fue diseccionado con la ayuda de un bisturí y una tijera para separar la corteza de la médula renal.

Ambos tejidos fueron recolectados en microtubos de 2 ml y congelados automáticamente en hielo seco para su posterior traslado y almacenamiento a -80°C , donde permanecieron hasta la preparación de las vesículas.

7. 2. PREPARACIÓN DE BBMV DE CORTEZA RENAL

7.2.1 Reactivos

- Tampón I (300 mM Manitol, 5 mM EGTA, 16 mM Hepes-Tris pH 7.5, 0,5 mM PMSF).
- Tampón II (300 mM Manitol, 16 mM Hepes-Tris pH 7.5).
- 1 M MgCl_2 disuelto en agua y filtrado.

7.2.2. Procedimiento

El protocolo llevado a cabo para preparar BBMV de corteza renal fue el siguiente:

- Los fragmentos de corteza renal fueron homogeneizados en 15 ml de tampón I a 15000 rpm con el homogeneizador Diax 600 de marca Heidolph.
- Choque osmótico: se añadieron 15 ml de agua ultrapura fría con el fin de crear un medio hipotónico que ayude a fragmentar las membranas celulares.
- Primera precipitación por Mg^{2+} : se añadieron 450 μl MgCl_2 a 1M para alcanzar una concentración final entre 15-20 mM. Se incubó en hielo durante 15 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos a 4°C . En el sobrenadante se encuentran los fragmentos de las membranas apicales, mientras que en el precipitado están los restos celulares y de otras membranas (fracción microsomal).
- Los sobrenadantes fueron centrifugados a 30000 g, 30 minutos a 4°C . A continuación, se eliminaron los sobrenadantes y los pellets fueron resuspendidos en 1 ml del tampón I. La homogenización se realizó con una jeringa provista de una aguja de 20G y 15 golpes, y al menos otros 15 golpes más con una aguja de 25G.

- Segunda precipitación por Mg^{2+} : se añadieron los 14 ml restantes de tampón I, 15 ml de agua ultrapura y 450 μ l $MgCl_2$ 1M. Se incubaron en hielo durante al menos 15 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Se centrifugaron las muestras a 3000 g durante 15 minutos a 4°C.
- Los sobrenadantes fueron centrifugados a 30000 g, 30 minutos a 4°C. De nuevo se eliminaron los sobrenadantes resultantes y los pellets fueron resuspendidos en 100 μ l de tampón II de la misma manera que en la anterior homogenización con agujas de 20G y 25G.

7.3. PREPARACIÓN DE BBMV DE INTESTINO DELGADO

7.2.1 Reactivos

- Tampón I (300 mM Manitol, 5 mM EGTA, 16 mM Hepes-Tris pH 7.5, 0,5 mM PMSF).
- Tampón II (300 mM Manitol, 16 mM Hepes-Tris pH 7.5).
- 1 M $MgCl_2$ disuelto en agua y filtrado.

7.2.2. Procedimiento

En el caso de las muestras de mucosa intestinal se siguió el mismo protocolo que con la corteza renal con unas mínimas variaciones:

- Las mucosas intestinales fueron homogeneizadas en 15 ml de tampón I a 15000 rpm durante 60 segundos con el homogeneizador DiAx 600 de marca Heidolph.
- Choque osmótico: se añadieron 22 ml de agua ultrapura fría con el fin de crear un medio hipotónico que ayude a fragmentar las membranas celulares.
- Las muestras fueron centrifugadas a 38000 g durante 35 minutos a 4°C. El sobrenadante fue retirado, ya que contiene principalmente proteínas del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. El pellet fue resuspendido en 15 ml de tampón I con la ayuda de una aguja de 18G hasta que no se vio ningún fragmento y 15 golpes con una aguja de 20G. Antes de la primera precipitación, se añadieron 21,5 ml de agua ultrapura fría.

- Primera precipitación por Mg^{2+} : se añadieron 555 μ l $MgCl_2$ a 1M para alcanzar una concentración final de 15 mM. Se incubaron en hielo durante 15 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Se centrifugaron a 2500 g durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante resultante se encuentran los fragmentos de las membranas apicales, mientras que en el precipitado están los agregados de otras membranas y restos de tejido sin homogenizar.
- Los sobrenadantes fueron centrifugados a 38000 g, 35 minutos a 4°C. A continuación, se eliminaron los sobrenadantes y los pellets fueron resuspendidos en 1 ml de tampón I. La homogenización se realizó con agujas de 18G y 20G de la misma forma que con los pellets anteriores.
- Segunda precipitación por Mg^{2+} : se añadieron los 14 ml restantes de tampón I, 21,5 ml de agua ultrapura fría y 555 μ l $MgCl_2$ 1M. Se incubaron en hielo durante al menos 15 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Se centrifugaron las muestras a 2500 g durante 15 minutos a 4°C.
- Los sobrenadantes fueron centrifugados a 38000 g, 35 minutos a 4°C. De nuevo se eliminaron los sobrenadantes resultantes y los pellets fueron resuspendidos en 100 μ l de tampón II con una aguja de 25G hasta que no quedaron fragmentos de pellet.

Previamente a la utilización de las BBMV's obtenidas, se cuantificó la concentración de proteína mediante el método del ácido bicinonínico (BCA). Las BBMV's utilizadas para transporte se usaron en las 24 horas siguientes a su obtención y fueron almacenadas a 4°C. Las BBMV's destinadas a realizar Western-Blot fueron congeladas a -20°C hasta su utilización.

8. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN CÉLULAS OK

Tras quitar el medio de cultivo, se lavó 2 veces con PBS frío y se incubó con el tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% glicerol, 1% CHAPS y 1X inhibidor de proteasas) durante 30 minutos en agitación a 4°C. A continuación, se procedió al

raspado de la superficie del pocillo y su homogenización a través de una aguja de 20G. Para finalizar se centrifugó a 13500 g durante 20 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante, en el cual se encuentra la proteína total.

8. 2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE MEMBRANA PLÁSMÁTICA EN CÉLULAS OK

Con el fin de obtener las proteínas presentes en la membrana plasmática de las células OK-P se utilizó el Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit de Thermo Scientific, con ciertas variaciones en el protocolo. Esta técnica se basa en el marcaje con biotina de las proteínas presentes en la superficie de las células y su posterior aislamiento.

8.2.1. Reactivos

- Solución salina 0,9% NaCl.
- Reactivos provistos en el Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (89881):
 - Sulfo-NHS-SS-Biotina
 - Solución de *quenching* o finalización
 - Solución de lavado
 - NeutrAvidin agarosa
- Solución de biotilación (10 mM trietanolamida pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 3 mg/ml sulfo-NHS-SS-Biotina).
- Inhibidor de proteasas: Protease Inhibitor Cocktail Tablet de Santa Cruz (sc-29130).
- PBS.
- Solución de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% triton X-100).
- SDS-PAGE Sample Buffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 10% glicerol).
- Ditiotretitol (DTT).

8.2.2. Procedimiento

En primer lugar, se lavaron las placas de 6 pocillos (962 mm²) con solución salina 0,9% NaCl fría, ya que era preciso lavar con un tampón libre de Pi y grupos amino.

8.2.2.1. Biotinilación

Se incubó la placa con la solución de biotinilación durante 1 hora a 4°C en agitación suave. Tras aspirar la solución de biotinilación, se incubó con 10 ml de PBS frío y 500 µl de solución de *quenching* durante 20 minutos a 4°C en agitación. A continuación, se lavó tres veces con PBS frío.

8.2.2.2. Lisis celular

Se añadieron 500 µl de tampón de lisis con inhibidor de proteasas y se pasó el contenido de la placa a un tubo de 2 ml. Con el fin de asegurar la lisis total de las células se procedió a resuspender el contenido con una aguja de 23G y se dejaron las muestras en hielo durante 30 minutos. Se centrifugaron a 10000 g, 2 minutos a 4°C obteniendo un sobrenadante que contenía la proteína total de la muestra.

8.2.2.3. Precipitación

Se añadió el sobrenadante en las columnas del kit, previamente tratadas con NeutrAvidin agarosa, y se incubaron en agitación toda la noche a 4°C. De esta manera las proteínas biotiniladas quedaron unidas a la columna.

8.2.2.4. Elución

Se procedió al lavado de las columnas para eliminar el resto de proteínas no biotiniladas. Las proteínas biotiniladas se extrajeron de la columna incubando con 400 µl de SDS-PAGE sample buffer con DTT a 50 mM durante 60 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se centrifugó a 1000 g durante 2 minutos, obteniendo las proteínas biotiniladas que una vez añadido el azul de bromofenol al 0,005 %, se encontraron listas para cargar en geles de poliacrilamida/SDS para separar en función de su peso molecular mediante electroforesis.

8. 3. METODO BCA

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método BCA, el cual se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ , producida por las proteínas en un medio alcalino. Dicha reacción es detectada mediante la formación de un complejo de dos moléculas de

ácido bicinonínico (BCA) con un ion de Cu^+ , dando lugar a una coloración púrpura detectable a 562 nm. El kit usado fue Pierce BCA Protein Assay Kit de Thermo Scientific.

Se siguió el protocolo del kit para placas de 96 pocillos realizando duplicados tanto de las muestras como de los estándares. La concentración de proteína de nuestras muestras fue determinada en referencia a una curva de calibrado de albumina sérica bovina (BSA). El rango de detección del kit es de 20 a 20.000 $\mu\text{g/ml}$, por lo que en caso de ser necesaria la dilución de las muestras se tuvo en cuenta para el cálculo de la concentración. Finalmente, la medición de absorbancia se realizó en el lector de placas DTX 880 Multimode Detector de Beckman Coulter.

9. WESTERN-BLOT

El Western-Blot, inmuno-blot o inmunoadsorción, es una técnica que analiza la expresión proteica de uno o varios genes específicos, y que fue descrita por primera vez por Towbin et al. en 1979. La técnica se basa en la detección inmuno-específica de proteínas previamente separadas en función de su peso molecular, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Para ello, a las proteínas se les adiciona un tampón de carga con detergente aniónico, que aporta uniformidad de cargas eléctricas, densidad, color y mantiene un pH adecuado, además de provocar la desnaturalización y reducción de las proteínas. Posteriormente, las proteínas son transferidas a una membrana que las une e inmoviliza, permitiendo así la unión de anticuerpos específicos frente a la proteína de interés.

9.1. Reactivos

- Tampón de carga (63 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol y 0.005% azul de bromofenol).
- β -mercaptoetanol.
- Geles electroforesis:
 - Gel concentrador o *stacking* gel (5% acrilamida, 0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 0,09% APS y 0,1% Temed): las proteínas son cargadas en él y se encarga de concentrarlas como paso previo al segmento separador.

- Separador (10% o 8% de acrilamida, 0,38 M Tris-HCl pH 8.8, 0,09% APS y 0,1% Temed): separa las proteínas en función de su peso molecular.
- Buffer de electroforesis (0,012 M Tris-base, 0,1 M glicina y 0,1% SDS).
- PBS-T: PBS + 0,1% Tween 20.
- Solución de bloqueo de la membrana: 5% de leche en polvo desnatada disuelta en PBS-T.

9.2. Procedimiento

En primer lugar, se prepararon las muestras calculando la concentración de proteína deseada (20-50 μg) a combinar con el tampón de carga, al cual previamente se añadió β -mercaptoetanol a una concentración final del 5%. Además, las muestras fueron tratadas durante 30 minutos a 37°C para asegurar la total desnaturalización/reducción.

A continuación, se procedió a cargar las muestras en los pocillos del gel que previamente hemos preparado con el porcentaje de acrilamida deseado en función del peso molecular de la proteína de interés. Las proteínas se separaron en el gel mediante electroforesis junto con un indicador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color de BioRad, a un voltaje constante de 100 mV durante al menos 1 hora y 45 minutos, donde migraron en función de su peso molecular hacia el polo positivo de la cubeta. Todo el proceso se realizó dentro de una cubeta Mini-PROTEAN Tetra Cell de BioRad, con Buffer de electroforesis en su interior y la fuente de alimentación utilizada fue PowerPac Basic de BioRad.

Las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) por medio de un Trans-Blot Turbo de BioRad. El programa utilizado consistió en 2,5 A y 25 V durante 10 minutos. Posteriormente, para evitar uniones inespecíficas, las membranas fueron incubadas con la solución de bloqueo que contiene leche en polvo desnatada al 5%, durante 1 hora en agitación (50 rpm).

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de elección disuelto en PBS-T en agitación suave durante toda la noche a 4°C o a temperatura ambiente con

azida de sodio al 0,02%. Las concentraciones y diferentes variaciones en el protocolo en función del anticuerpo primario utilizado aparecen en la tabla.

Al día siguiente se procedió al lavado de las membranas con PBS-T en agitación durante 10 minutos 3 veces y la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa, durante 1 hora en agitación suave. Para finalizar, se lavaron las membranas de nuevo y se procedió a la detección quimioluminiscente, mediante el kit Clarity Western ECL Substrate de BioRad. La señal luminosa resultante de la oxidación del luminol por la peroxidasa, fue captada por Versadoc 4000 MP de BioRad.

Anticuerpo primario	Dilución anticuerpo primario	Tª	Anticuerpo secundario
β -Actina Santa Cruz (sc-69879)	1:2000	Tª ambiente	Antimouse 1:20.000 Sigma (NA931V)
NHE3 Orson W. Moe (135)	1:10	4°C	Antimouse 1:20.000 Sigma (NA931V)
NHE3 [P-Ser 552] Novusbio (110-81529)	1:1000	Tª ambiente	Antimouse 1:20.000 Sigma (NA931V)
NaPi4 Davids Biotech (136)	1:2000	Tª ambiente	Antirabbit 1:20.0000 Invitrogen (31460)
V-ATPasa subunidad B GenScript (A00960-SZ)	1:500	Tª ambiente	Antirabbit 1:20.000 Invitrogen (31460)
NaPi2a Davids (1,5 mg/ml)	1:3000	Tª ambiente	Antirabbit 1:30.000 Invitrogen (31460)
NaPi2b Bioworld (BS71794)	1:500	4°C	Antirabbit 1:20.000 Invitrogen (31460)
Slc4a1 Invitrogen (PA5-80030)	1:4000	4°C	Antirabbit 1:20.000 Invitrogen (315609)

10. ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La técnica ELISA permite la identificación de un determinado antígeno perteneciente a una proteína, a través de su unión a un anticuerpo específico que a su vez está conjugado con una enzima que cataliza una reacción colorimétrica que podemos determinar mediante un espectrofotómetro. Los detalles de la técnica variaran en función del tipo de ELISA.

Los ELISA utilizados fueron kits comerciales basados en dos técnicas: ELISA sándwich, que utiliza dos anticuerpos específicos que reconocen al antígeno; y ELISA competitivo, que usa un antígeno de referencia que competirá con el antígeno particular de la muestra por la unión al anticuerpo. En los ELISA competitivos a mayor absorbancia generada menor concentración de proteína de la muestra, lo que produce una correlación inversa entre la concentración de antígeno en la muestra y el desarrollo de color en el ensayo.

La medición en plasma sanguíneo de las diferentes fosfatoninas y hormonas se realizó con los siguientes kits comerciales:

- PTH: Rat Intact PTH ELISA Kit de Immunotopics (60-2500) con plasma sin diluir.
- FGF-23: FGF-23 ELISA kit de Kainos Laboratories (CY-4000) con plasma sin diluir o diluido 1:2 en altas concentraciones.
- Klotho: Rat Klotho (KLOT) Elisa kit de Blue gene (E02K0027) con plasma sin diluir.
- MEPE: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) de Cloud-Clone Corp (SEB232Ra) con plasma sin diluir.
- Triyodotironina (T3): Rat Tri-iodothyronine (T3) ELISA kit de Cusabio (CSB-E05085r) con plasma diluido 1:2.
- Vitamina D3: se midió la 25-hidroxivitamina D₃, forma inactiva de la vitamina D₃, en el estudio sobre privación de Pi ya que se mantiene durante más tiempo estable en el plasma sanguíneo, con el Vitamin D EIA kit de Cayman Chemical (501050) con una dilución 1:10 de las muestras. En el estudio sobre adaptaciones de Pi se midió calcitriol, forma activa de la vitamina D₃, con el General Calcitriol ELISA Kit de EIAab (E0467Ge) usando plasma diluido 1:50.
- SFRP4: se usó el Rat Secreted Frizzled-Related Protein 4 (SFRP4) ELISA kit de Cusabio (ELO21140RA) para el estudio de privación de Pi y el Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP4) de Biomatik (EKU07221) en el estudio sobre adaptaciones de Pi. En ambos casos se usaron las muestras sin diluir.

- T4: Rat thyroxine (T4) ELISA Kit de Cusabio (E05082r) con una dilución 1:2.
- Dopamina: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Dopamine de Cloud-Clone Corp (CEA851Ge) con una dilución de los plasmas de 1:2.
- Insulina: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Insulin de Cloud-Clone Corp (CEA448Ra) con una dilución del plasma 1:2.
- Corticoesterona: Rat CORT ELISA kit de Elabscience (EL-0160) con dilución 1:2.

En orina para la cuantificación de la deoxipiridinolina (DPD) en el estudio privación de Pi se utilizó el MicroVue DPD EIA kit de Quidel (8007) usando la dilución 1:25 sobre la dilución 1:10 marcada en el protocolo.

11. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA

11. 1. EXTRACCIÓN DE RNA EN HUESO

La extracción de RNA en hueso se realizó en tibias de rata, en las que previamente se extrajo la medula ósea. El hueso fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido y el polvo obtenido se incubó con Trizol (TRI Reagent de Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó para eliminar el material insoluble y se adicionó 1-bromo-3-cloropropano en proporción 1:10 al volumen utilizado de Trizol. Tras centrifugar se habrá separado el contenido en tres fases:

- Fase acuosa: contiene el RNA.
- Interfase: contiene el DNA.
- Fase roja orgánica: contiene la proteína.

En este caso nos interesó la fase acuosa que fue mezclada en proporción 1:1 con etanol 95-100%. A partir de este punto se continuó con la extracción mediante el método de filtrado por columnas con el kit Quick-RNA Miniprep (Zymo Research), incubando con la DNasa I contenida en el propio kit, para eliminar posibles fragmentos de DNA.

11. 2. EXTRACCIÓN RNA CORTEZA RENAL Y YEYUNO

En la extracción de RNA de corteza renal y yeyuno se siguió el protocolo del TRI Reagent (Sigma-Aldrich) utilizado en hueso, con la variación de que el tejido fue homogeneizado directamente en trizol con el homogeneizador DiAx 600 de marca Heidolph. Una vez obtenida la fase acuosa que contiene el RNA se continuó la extracción con el kit Quick-RNA Miniprep (Zymo Research) y el sistema de filtración por columnas ya descrito.

11. 3. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL RNA EXTRAÍDO

La concentración del RNA obtenido se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo-Fisher) a 260 nm, evaluando su pureza con la relación de absorbancias a 260/280 y 260/230.

Adicionalmente, la calidad del RNA se valoró realizando una electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. La visualización se realizó mediante excitación con luz ultravioleta con el aparato Geldoc 1000 de Bio-Rad. En el RNA no degradado se aprecian dos bandas claras pertenecientes al RNA ribosómico, 28S y 18S (subunidad mayor y subunidad menor respectivamente), con una intensidad de la banda del 28S de, al menos, el doble que la del 18S. Igualmente no se observó la acumulación de RNA de pequeños tamaños, característico del RNA degradado.

12. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA

El RNA fue retrotranscrito a cDNA mediante el uso de una retrotranscriptasa (PrimeScript RT reagent kit de Takara), para su posterior cuantificación mediante PCR en tiempo real. Cada muestra fue incubada en un termociclador MJ Mini de Bio-Rad durante 15 minutos a 37°C y posteriormente, 5 segundos a 85°C, pasados los cuales pudo ser almacenada a 4°C o a -20°C hasta su uso.

13. PCR EN TIEMPO REAL

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se basa en la capacidad de la enzima TaqDNA polimerasa de amplificar un fragmento de DNA de forma exponencial. En la PCR en tiempo real la cantidad de DNA se mide tras cada ciclo mediante el uso de un fluorocromo que se intercala en el producto de PCR, en nuestro caso SYBR Green I.

El kit de PCR en tiempo real usado fue SYBR premix Ex Taq II (Takara) y se realizó en un LightCycler 1.5 de Roche.

El protocolo seguido fue el siguiente:

- Desnaturalización: 95°C, 5 segundos, 20°C por segundo.
- Amplificación: 40 ciclos.
 - 95°C, 5 segundos, 20°C por segundo.
 - 60°C, 20 segundos, 20°C por segundo.
- Curva de fusión o de *Melting*:
 - 95°C, 0 segundos, 20°C por segundo.
 - 65°C, 15 segundos, 20°C por segundo.
 - 95°C, 0 segundos, 0,1°C por segundo.
- Enfriamiento: 40°C, 30 segundos, 20°C por segundo.

Se usó como gen de referencia endógeno, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y en todos los casos se contó con un calibrador y un control negativo. Los cebadores usados a una concentración final de 0,4 μ M fueron los siguientes:

Gen	Sentido	Antisentido
GADPH	TCCAGTATGACTCTACCCACG	CACGACATACTCAGCACCAG
Runx2	CTGCCGAGCTACGAAATGCC	GGCCACTTGGGGAGGATTTG
TNAP	CAGAGAAAGAGAAAGACCCAG	CTGTCACTGTGGAGACGC
PHOSPHO1	GCTTCCTCCTGACCTTCGAC	AGACGCGTTGCATGTACTCA
OPG	CTCACTTGGCCTCCTGCTAA	CTTCGCACAGGGTGACATCT
OSP	CCAGCCAAGGACCAACTACA	AGTGTTTGCTGTAATGCGCC
Dkk1	ATTGGAAGGGTGGGAATGTGA	AAGTTGGTGGGTTTCCTTCCA
Dkk2	GGCATAGGGATCGCAACCAT	TGAGGCATCTTGGAGTGTGG

Dkk3	ACACAGCCACAGTCTGGTAT	CTCCTCAAATGCCATCTCCTG
ActR2a	TGCGGGGATTGTCATTTGTG	TCCAGGGTCCTGAGTAGGAA
Sfrp4	TGGCAACGTACCTGAGCAA	AATTGGTGATGAGGGGGACTTG
Acp5 (TRAP)	ATGGGCGCTGACTTCATCAT	GGCAATTTGTGCCGAGACAT
Ctsk	AAGTGCAGAGGGTACAGAGAGA	ACGGTCGCAGTTTTCGTCAT
Cts5	CGTACGACGTCTCATCTGGG	TCTCCCATGTGGTTCATGCC
OCN	GTCTGACAAAGCCTTCATGTCC	TCGTCACAATTGGGGTTGAG
Sost	AACCAGACCATGAACCGGG	GTCACGAAGCGGGTGTAGTG
RANKL	AGCATCGCTCTGTTCTGTGA	CGAGTCCTGCAAACCTGTAT
β -catenin	TGCCATGTTCCCTGAGACAC	GCGCTGGACATTAGTGGGAT
Fzd1	AGTTCTGGACCAGCAATCCG	CAGGAGAACTTTCCCGCTC
Fzd2	TCCTCAAGGTGCCGTCTAT	CGAGAAGAACATGGAGCCGT
Lrp5	ACCTTATCCTACCCCTACACG	CCCAGTAGATGAACTTGCCAG
Lrp6	ATCCGTCGCTCCTTCATTG	CTTCTATCCGATCAGTGCCAG
Wif1	AGAGCAGTGTGAACTCAGCAA	CTCGCAGACAGACTTGCTTTT
Slc4a1	CCCTTGCTTATGGTTGGT	ACCGAGAGTTTCTGCGTGTA

Los resultados fueron analizados por el programa LightCycler Software 4.05, de Roche que se basa en el método $\Delta\Delta CT$ o $\Delta\Delta Cq$ de cuantificación relativa.

14. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ÓSEA EN TIBIAS

Las tibias fijadas por inmersión en paraformaldehído al 3% fueron enviadas a la Unidad de Imagen Preclínica (Bioterio) de Oviedo para analizar su estructura ósea mediante microtomografía computerizada (microCT) 3D de rayos X. Esta técnica realiza una reconstrucción 3D del hueso mediante la cuantificación de la capacidad de absorción del tejido de rayos X emitidos desde diferentes ángulos.

En el estudio microestructural del hueso trabecular se obtuvo una serie de variables cuantitativas:

- BV/TV: Porcentaje de hueso presente en la región de interés (ROI).
- Connectivity density (Conn.Dn): Número de conexiones trabeculares.
- Trabecular pattern factor (Tb.Pf): Inverso del índice de conectividad.
- Trabecular Thickness (Tb.Th): Grosor de las trabéculas.
- Trabecular Number (Tb.N): Número de trabéculas.
- Trabecular Separation (Tb.Sp): Separación trabecular.

En el caso del hueso cortical los parámetros analizados incluyeron:

- Cortical surface/Volume ratio (BS/BV): Relación entre la superficie cortical y el volumen del hueso cortical en un punto sin tener en cuenta los poros.
- Cortical thickness (Ct.Th): Grosor del hueso cortical con los poros.
- Cortical pore diameter (Ct.Po.Dm): Diámetro del poro cortical.
- Cortical bone porosity (Ct.B.Po): Porosidad del hueso cortical.

Los índices de densitometría volumétrica evaluados fueron la densidad mineral ósea (BMD) y la densidad mineral del tejido (TMD). La BMD es la densitometría ósea de la hidroxiapatita cálcica en un tejido biológico en términos de g/cm^3 , por lo que tendrá en cuenta tanto tejido óseo (hueso trabecular incluido) como tejido blando en el caso de que lo hubiera. En la TMD la densidad se restringe al hueso calcificado (preferentemente cortical) desechando el tejido blando de alrededor o de menor densidad por lo que no tiene en cuenta el hueso trabecular, a no ser que alcance un mínimo de espesor.

15. TRANSPORTE DE FOSFATO EN BBMV

Las vesículas no son estructuras vivas, por lo que no generan energía, el transporte sodio dependiente no se encuentra en funcionamiento y la osmolaridad de las soluciones utilizadas debe ser ajustada en función del transporte que se quiera realizar.

15.1. Reactivos

- Ácido ortofosfórico como radionucleido de ^{32}P de Perkin Elmer.
- Soluciones utilizadas:
 - Solución de preincubación (5 mM KH_2PO_4 y K_2HPO_4 a pH 7.4).
 - Solución de transporte (100 mM NaCl o Colina, 0,05 mM PO_4 , 70 mM Manitol, 10 mM Hepes-Tris a pH 7.4 y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P).
 - Solución Stop (100 mM NaCl, 100 mM Manitol y 10 mM TrisCl a pH 7.4).

15.2. Procedimiento

El transporte ^{32}Pi fue determinado mediante la técnica de filtración rápida. En primer lugar, se filtró la solución de transporte a través de filtros con un tamaño de poro de $0,22\ \mu\text{m}$, una vez añadido el ^{32}Pi . Seguidamente se incubaron $5\ \mu\text{l}$ de BBMV, a una concentración proteica de $15\ \text{mg/ml}$, con $45\ \mu\text{l}$ de medio de transporte ($100\ \text{mM}$ de NaCl o Colina) durante 10 segundos a temperatura ambiente. Para que el medio sea isotónico en su concentración final se usó concentrado 1.11 veces. A continuación, se lavaron 4 veces con $3\ \text{ml}$ de solución stop fría y se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ de la marca Sartorius o Millipore. Los filtros fueron previamente sumergidos en solución de preincubación. Las vesículas quedan retenidas en el filtro gracias a la fuerza iónica de la solución stop.

Posteriormente, se introdujeron los filtros en tubos adecuados para medir la radiactividad en modo radiación Cherenkov, en el contador de centelleo Wallac 1409 de Perkin Elmer y más recientemente en el Analizador de Centelleo Líquido TriCarb de Perkin Elmer, mediante el programa QuantaSmart. Los valores obtenidos fueron cuentas por minuto (cpm), y con la siguiente fórmula se calcularon los picomoles de Pi por miligramo de proteína vesicular:

$$\text{pmol Pi / mg protein} = \frac{(\text{cpm}_s - \text{cpm}_{bl}) \times [\text{PO}_4] \times (\text{Vol}_{st}) \times 1000000}{(\text{cpm}_{st} - \text{cpm}_{bl}) \times [\text{protein}] \times V_v}$$

Donde,

cpm_s : cuentas de la muestra

Vol_{st} : volumen del estándar pipeteado

cpm_{bl} : cuentas del blanco

$[\text{PO}_4]$: concentración de fosfato

cpm_{st} : cuentas del estándar

$[\text{protein}]$: concentración de proteína de las vesículas

V_v : volumen de vesículas utilizado en el transporte

Para calcular la velocidad de transporte, en la ecuación se introdujo el tiempo de transporte, en segundos. Todos los blancos y las muestras fueron realizados por triplicado, así como las alícuotas de los estándares.

16. ESTUDIOS DE TRANSPORTE EN PRESENCIA DE NAD⁺, NADH Y NAM

16. 1. TRANSPORTE DE FOSFATO

El procedimiento general consistió en la preparación de BBMV de corteza renal y yeyuno con las que se llevó a cabo el transporte de Pi-³²P en medio con Na⁺ con el mismo procedimiento detallado en el apartado anterior. En estos experimentos se adicionó al medio de transporte la concentración indicada de NAD⁺, NADH o NAM y las muestras fueron preincubadas con esas mismas concentraciones de NAD⁺, NADH o NAM durante 30 minutos en hielo, a no ser que se especifique lo contrario. La concentración de manitol en el medio de transporte fue ajustada a la de inhibidores con el fin de mantener la osmolaridad.

Además, se realizó el cálculo de la IC₅₀ para NAD⁺ y NADH en corteza renal y yeyuno y la determinación de la constante de inhibición (K_i) y del mecanismo de inhibición de NAD⁺ en BBMV de corteza renal.

16.1.1. Cálculo de la IC₅₀

La IC₅₀ es la concentración del inhibidor necesaria para reducir el transporte a la mitad de la máxima inhibición obtenida. El cálculo de la IC₅₀ se realiza con una concentración fija de sustrato y concentraciones variables del inhibidor y, por lo tanto, varía con la concentración del sustrato a transportar.

Para NAD⁺ y NADH se usó una concentración fija de 0,05 mM Pi y las siguientes concentraciones crecientes de NAD⁺ y NADH: 0, 10, 30, 100, 300 y 1000 μM. Las BBMV de riñón y yeyuno fueron preincubadas durante 30 minutos con dichas concentraciones, previo al transporte con ³²Pi, que se realizó de la forma habitual, con medio de transporte con Na⁺ y dichas concentraciones de inhibidor. Los cálculos cinéticos se realizaron mediante regresión no lineal, utilizando el programa Prism 9 de GraphPad.

16.1.2. Cálculo de la K_i y determinación del mecanismo de inhibición

Para el cálculo de la constante de inhibición (K_i) y la determinación del mecanismo de inhibición se deben conocer los siguientes parámetros:

- La velocidad máxima o capacidad de transporte (V_{max}).
- Constante aparente de afinidad Michaelis-Menten (K_m): es la concentración de sustrato (P_i) a la que la velocidad de transporte es la mitad de la V_{max} .
- Constante de afinidad aparente observada (K_m^{Obs}): es la concentración de sustrato (P_i) a la que la velocidad de transporte se reduce a la mitad de la V_{max} cuando se añade el inhibidor (NAD^+).
- Constante de difusión o unión inespecífica, que representa el componente no saturable (K_d).

La K_i representa la afinidad del inhibidor por el transportador y será independiente de la concentración de sustrato, al contrario que la IC_{50} . Con una inhibición competitiva, cuando aumenta la concentración de inhibidor la afinidad aparente del sustrato disminuye (aumenta la K_m), pero la V_{max} no se modifica (Figura M4 A). Sin embargo, con una inhibición no competitiva la afinidad no varía, es decir, K_m y K_m^{Obs} son iguales, pero la V_{max} disminuye (Figura M4 B), por lo que la capacidad global de transporte (V_{max}^I) depende de la afinidad del inhibidor por el transportador (137).

A) $K_{m_{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$	B) $V_{max}^I = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$
--	--

Figura M4: La K_i se determina a través de las siguientes ecuaciones en función de si el mecanismo de inhibición es competitivo (A) o no competitivo (B).

La K_i se obtuvo a través de diferentes curvas de saturación de Michaelis-Menten con concentraciones fijas de inhibidor, pero distintas en cada curva. Así, se realizaron 4 curvas de saturación con diferentes concentraciones de inhibidor (0, 30, 100 y 300 μM de NAD) y en cada una de ellas se obtuvo el transporte con concentraciones ascendentes del sustrato PO_4 : 0,01 mM, 0,05 mM, 0,25 mM, 1 mM, 3 mM y 6 mM. La K_i fue calculada con un ajuste global usando regresión no lineal de las diferentes curvas de saturación con el programa Prism 9 GraphPad.

16.1.3. Inhibidores de la ribosilación

Se estudió la inhibición del efecto de NAD^+ sobre el transporte de Pi en BBMV de corteza renal utilizando compuestos inhibidores de la ribosilación:

- 3-Metoxibenzamida diluida en DMSO a 0,1 mM y 1 mM.
- Metayodobencilguanidina (MIBG) a 0,05 mM y 0,5 mM.
- Bisulfito sódico de menadiona (vitamina K_3) a 0,5 mM.
- Novibiocina sal sódica a 0,1 mM y 1 mM.
- Vitamina K_1 diluida en etanol a 0,1 mM.

Se realizó el transporte de Pi preincubando dichos inhibidores a las concentraciones detalladas durante 30 minutos en hielo con NAD^+ . Además, dichos compuestos fueron adicionados al medio de transporte a la misma concentración. Se utilizó como control positivo la muestra sin NAD^+ y como control negativo la muestra incubada con NAD^+ sin inhibidores.

16. 2. TRANSPORTE DE GLUCOPIRANOSIDO MARCADO CON ^{14}C

16.2.1. Reactivos

- 3-O- ^{14}C Metil-D-Glucopiranosido a 0,2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$.
- Soluciones utilizadas:
 - Solución de transporte (100 mM NaCl, 0,1 mM D-Glucopiranosido, 70 mM Mannitol, 10 mM Hepes-Tris a pH 7.4 y 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de 3-O- ^{14}C Metil-D-Glucopiranosida).
 - Solución Stop (100 mM NaCl, 100 mM Mannitol y 10 mM TrisCl a pH 7.4).
- Líquido de centelleo de Amersham International.

16.2.2. Procedimiento

En primer lugar, las BBMV a la concentración proteica final de 15 mg/ml, fueron preincubadas con 0,5 mM de NAD^+ , NADH y NAM durante 30 minutos en hielo. A continuación, se incubaron 5 μl de BBMV con 45 μl de medio de transporte durante 10

segundos a temperatura ambiente. Tras los 4 lavados con 3 ml de solución stop fría, se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm de la marca Sartorius o Millipore. Los filtros fueron previamente sumergidos en agua ultrapura. Las vesículas quedan retenidas en el filtro gracias a la fuerza iónica de la solución stop.

Posteriormente, se introdujeron los filtros en tubos y se añadieron 2 ml de líquido de centelleo en todos los tubos, incluidos blancos y estándares. Para finalizar, se procedió a su medición en el contador de centelleo Wallac 1409 de Perkin Elmer. Los resultados se expresaron en pmol D-Glucopiranosido/mg de proteína/seg.

Todos los blancos y las muestras fueron realizados por triplicado, así como la medición de los estándares.

17. DEMOSTRACIÓN DE LA RIBOSILACIÓN DE NaPi-IIA Y NaPi-IIB

Con el fin de determinar si la inhibición del transporte de Pi era debida a la ribosilación de los transportadores o de proteínas asociadas, se llevaron a cabo varios experimentos. Uno de ellos consistió en una ribosilación *in vitro*, con un marcaje radiactivo de las proteínas ribosiladas (Figura M5), incubando las BBMV de corteza renal y yeyuno con ³²P-NAD. Tras lavar para eliminar el radiomarcador no unido, se lisaron

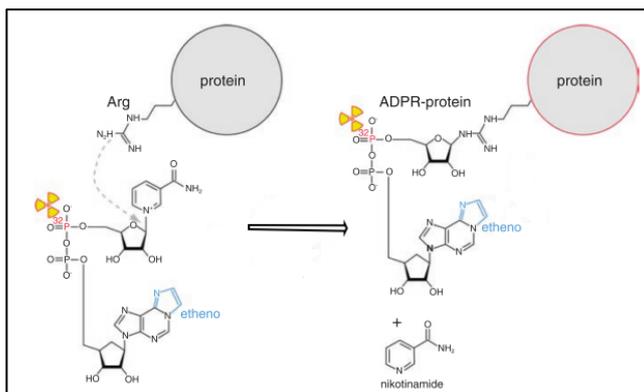


Figura M5: Esquema del marcaje con ³²P-NAD de proteínas ribosiladas. Imagen modificada de Menzel et Koch-Nolte (2018).

con un detergente no iónico y se procedió a inmunoprecipitar con los anticuerpos de interés, NaPi-IIa en BBMV de corteza renal y NaPi-Iib en BBMV de yeyuno. Para detectarlo se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS y autoradiografía del gel (138).

17.1. Reactivos

- Recombinant Protein G-Sepharose 4B de Thermo Scientific.

- Tampón de lisis no desnaturizante (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA y 0,02% azida de sodio).
- Nicotinamide adenine dinucleotide (adenylate-³²P) 50 µCi/ml de Perkin Elmer.
- Solución 10x NAD (10 µM NAD⁺ y 5 mM ADPribosa) en PBS.
- Solución de lavado (1% BSA y 1 mM ADPribosa) en PBS.
- Tampón de lisis: 3% Triton X-100 en PBS.
- Inhibidor de proteasas: Protease Inhibitor Cocktail Tablet de Santa Cruz (sc-29130).
- Solución TSA (0,01 M Tris-HCl pH 8, 0,14 M NaCl y 0,025% NaN₃).
- Solución TSA Tris-HCl pH 6.8 (0,05 M Tris-HCl pH 6.8, 0,14 M NaCl y 0,025% NaN₃).
- Tampón glicina: 0,1 M glicina a pH 2.
- Tampón de carga (63 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol y 0.005% azul de bromofenol) + 5% β-mercaptoetanol.

17.2. Procedimiento

17.2.1. Ribosilación

La cantidad de BBMV a utilizar se fijó en 400 µg de proteína, teniendo en cuenta que parte puede perderse en los lavados y la inmunoprecipitación. Las BBMV fueron incubadas con la solución de NAD al 1X y 50, 100 y 200 µCi/ml del ³²P-NAD durante 30 minutos en hielo. Después, se realizaron 4 lavados por centrifugación con la solución de lavado y se resuspendió el pellet resultante con 60 µl de tampón de lisis (con inhibidor de proteasas). Para asegurar el lisado total de las muestras, éstas se incubaron a 4°C durante 30 minutos. A continuación, se eliminó el material insoluble mediante centrifugación a 14000 g durante 20 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante, una parte como proteína total ribosilada y el resto para la inmunoprecipitación con NaPi-IIa y NaPi-IIb.

17.2.2. Inmunoprecipitación

El día previo, se incubaron 100 µl de protein G-Sepharose y 500 µl de PBS con el anticuerpo a 4°C en rotación durante toda la noche:

- NaPi-IIa: 10 µg.
- NaPi-IIb: 8 µg.

Al día siguiente, se centrifugó a 3000 g durante 2 minutos, para eliminar el anticuerpo no unido a la proteína G. Seguidamente, se realizaron dos lavados con tampón de lisis no desnaturizante (al que previamente se añadió inhibidor de proteasas). De este modo, se obtuvieron las bolitas de protein G-Sepharose listas para usar.

Al conjugado anticuerpo-Proteína G-Sepharose se añadieron 60 µl de la proteína total ribosilada con 40 µl de TSA y se dejó en rotación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 200 g durante 1 minuto y se guardó el sobrenadante como control negativo, ya que la proteína de interés se habrá enriquecido en el pellet y disminuido en el sobrenadante. A continuación, se realizaron 4 lavados por centrifugación a 200 g durante un minuto con 1 ml de diferentes soluciones en el siguiente orden:

- 1º. Solución TSA + 0,1% de triton X-100.
- 2º. Solución TSA + 0,1% de triton X-100.
- 3º. Solución TSA.
- 4º. Solución TSA Tris-HCl pH 6.8.

Finalmente, el pellet fue eluido incubando con 40 µl de tampón glicina 0,1 M pH 2 a temperatura ambiente durante 10 minutos. Antes de realizar la electroforesis de las proteínas en un gel de poliacrilamida/SDS, se neutralizó el pH de la muestra con Tris 1M.

17.2.3. Detección mediante electroforesis en gel poliacrilamida y autorradiografía

A las muestras se les añadió el tampón de carga usado de rutina en Western-blot con β-mercaptoetanol al 5% y se incubaron 30 minutos a 37°C. A continuación, las proteínas se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 10% para ser separadas en función del peso molecular. En el gel se cargaron tanto el inmunoprecipitado como el control negativo y el lisado total.

Después de la electroforesis, el gel puede desecarse o las proteínas pueden ser transferidas a membranas de PVDF. En este experimento, los geles fueron desecados con el GelAir Drying System de Bio-Rad y en aquellos geles en los que se optó por la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF se usó el Trans-Blot Turbo de BioRad con el mismo programa utilizado en Western-Blot. Con el fin de detectar las proteínas marcadas, se procedió a la exposición de películas de rayos X Hyperfilm MP (GE Healthcare) con los geles desecados o las membranas de PVDF dentro de un casete para rayos X con pantallas intensificadoras para ^{32}P en oscuridad. Las películas permanecieron en exposición en el congelador de -80°C de una semana a un mes.

El revelado se realizó en oscuridad con el Developer Agfa G150 y la fijación con el Fixing Bath Agfa G354. Tras el revelado, fijación y lavado, las películas se dejaron secar.

18. DETERMINACIÓN DE NAD EN MUESTRAS DE TEJIDO

La determinación de NAD total se realizó mediante el NAD^+/NADH Assay Kit de Abcam (ab65348) en muestras de corteza renal y yeyuno de ratas pertenecientes al estudio de adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fosfato en la dieta. El kit se basa en una reacción colorimétrica a través de una enzima capaz de detectar y reaccionar con NAD^+ y NADH ; por lo cual permite la cuantificación de NAD total con independencia del estado redox.

Para ello, se pesaron 20 mg de tejido y se homogenizaron con 400 μl del buffer de extracción. Se centrifugó para eliminar el material insoluble a 15000 g durante 5 minutos y con el sobrenadante se siguió el protocolo del kit, en el caso de corteza renal con una dilución 1:2. Finalmente la medición se realizó a 450 nm en el lector de placas DTX 880 Multimode Detector de Beckman Coulter, tras hora y media de incubación con el revelador.

19. TRANSPORTE DE FOSFATO EN CÉLULAS OK-P

19.1. Reactivos

- Ácido ortofosfórico como radionucleido de ^{32}P de Perkin Elmer.
- Soluciones utilizadas:

- Solución de transporte (137 mM NaCl, 0,05 mM PO₄, 5,4 mM KCl, 2,8 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 14 mM Tris-HCl a pH 7.4 y 2 μCi/ml de ³²P).
- Solución de lavado (137 mM Colina, 5,4 mM KCl, 2,8 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 14 mM Tris-HCl a pH 7.4).
- Solución Stop (137 mM Colina y 14 mM Tris-HCl a pH 7.4).
- Solución de lisis: 0,5% triton X-100 en agua.

19.2. Procedimiento

Para realizar el transporte de Pi en células OK-P, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos en condiciones estándares hasta que alcanzaron la confluencia y para cada una de las condiciones de estudio se utilizaron 6 pocillos.

En primer lugar, se eliminó el medio de las células por aspiración y se realizaron 3 lavados con 500 μl de la solución de lavado. A continuación, se añadieron 200 μl de la solución de transporte en cada pocillo. Las células permanecieron durante 6 minutos en la solución de transporte, tras los cuales se aspiró el medio de transporte y fueron lavadas tres veces con 2 ml de la solución stop fría. Por último, se aspiró la solución stop y se añadieron 300 μl de solución de lisis. Del sobrenadante final obtenido, 250 μl fueron usados para su medición en el Analizador de Centelleo Líquido TriCarb de Perkin Elmer, mediante el programa QuantaSmart, y los 50 μl restantes para la cuantificación de proteína del pocillo mediante el método BCA. Además, se realizó la medida de los estándares por triplicado, que corresponden a la solución de transporte en la que son incubadas las células. Los valores obtenidos fueron cuentas por minuto (cpm), y con la siguiente fórmula se calcularon los nanomoles de Pi por miligramo de proteína:

$$\text{nanomol Pi/mg proteína} = \frac{\text{cpm}_s \times \text{Vol}_{st} \times [\text{PO}_4] \times 1000}{\text{cpm}_{st} \times \text{Vol}_s \times [\text{prot}]}$$

Donde,

cpm_s: cuentas de la muestra

cpm_{st}: cuentas del estándar

[PO₄]: concentración de fosfato

Vol_{st}: volumen pipeteado del estándar

Vol_s: volumen de la muestra pipeteado

[prot]: concentración de proteína por pocillo

20. NANOINYECCIÓN EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Los ovocitos de rana *Xenopus laevis* han sido ampliamente utilizados como un sistema de expresión de proteína. Mediante la nanoinyección de cRNA en el citoplasma del ovocito, se produce la síntesis y expresión de las proteínas a las que codifican (139).

20. 1. OBTENCIÓN OVOCITOS

20.1.1. Reactivos

- Solución OR II (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂ y 10 mM Hepes-Tris a pH 7.5).
- Colagenasa tipo 4 de Worthington.
- Solución Barth (1 mM KCl, 0,82 mM MgSO₄, 0,41 mM CaCl₂, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 2,4 mM NaHCO₃, 88 mM NaCl, 10 mM Hepes-Tris pH 7.4 y 20 mg/l gentamicina).

20.1.2. Procedimiento

Se utilizaron ranas hembra de la especie *Xenopus laevis* activas y sanas que no hubieran sido operadas desde hace al menos 2 meses. Las ranas fueron anestesiadas con metasulfonato de tricaina (MS-222) a una dosis de 1 g/l disuelto en el agua en la que son sumergidas, ya que absorben el anestésico a través de la piel. Dicha solución previamente fue tamponada a pH 7 con bicarbonato sódico (140). Se realizó una incisión en la piel de unos 7-8 mm en el lateral del abdomen, equidistante de la última costilla y la cadera. A continuación, se practicó una segunda incisión en la capa muscular subyacente de la misma longitud y se accedió a la cavidad abdominal en la cual se localizan los sacos ováricos. Con una pinza roma se extrajo parte de los sacos ováricos.

Una vez finalizada la extracción, se suturó por planos de incisión. En primer lugar, la capa muscular y posteriormente la piel con dos puntos simples de sutura reabsorbible. Como analgésico postquirúrgico se inyectó buprenorfina intramuscular en la zona de incisión (141).

Los ovocitos fueron introducidos en un tubo de 15 ml con solución OR II con colagenasa a 2 mg/ml y se dejaron en agitación durante al menos 90 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo fueron observados en la lupa para evaluar el grado de desfoliculación. En caso de persistencia de capas foliculares se repitió la incubación con colagenasa en OR II durante otros 45 minutos en agitación una segunda o tercera vez.

Cuando los ovocitos estuvieron libres de capas foliculares se realizaron 2 lavados con OR II y 5 lavados con solución Barth. Tras los lavados, se procedió a seleccionar los ovocitos aptos para realizar nanoinyección, serán aquellos en fase V y VI que no presenten decoloraciones o bultos. Finalmente, fueron colocados en una placa de Petri con solución Barth en oscuridad a 16°C en la estufa de marca Selecta, modelo Medilow-S, donde se mantuvieron hasta su utilización.

20. 2. NANOINYECCIÓN EN OVOCITOS

La nanoinyección requiere del uso de agujas de vidrio muy finas que fueron preparadas a partir de capilares de Drummond Scientific, con el sistema Inject Matic de Narishige, que genera dos agujas a partir de un capilar mediante la aplicación de calor con una resistencia más estiramiento. Las agujas se colocaron en los nanoinyectores Nanoject de émbolo directo (Drummond Scientific) y fueron rellenas con 1-2 μ l de agua DEPC o con el cRNA de elección a la concentración deseada.

Los ovocitos fueron inyectados en la zona central del polo vegetal con 50 nl de agua o RNA, y se mantuvieron en solución Barth a 16°C durante tres o cuatro días, eliminando aquellos ovocitos que murieron o presentaron decoloraciones. Pasado ese periodo de tiempo, la proteína codificada por el cRNA inyectado aparecerá expresada en la membrana plasmática de los ovocitos, y podrán ser usados para transporte o extracción de proteína.

20.2.1. Procedimiento de obtención del cRNA

El cDNA de NaPi-IIa, Pit-1 y Slc4a1 fue clonado mediante PCR con una Taq polimerasa de alta fidelidad (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity de Life

Technologies) a partir de muestras de cDNA retrotranscritas de RNA de riñón de rata. Posteriormente, dichos fragmentos de DNA de interés fueron insertados por ligación en diferentes vectores de clonaje: pSPORT, pBluescript II SK y pCR2.1 TOPO, respectivamente. En el caso de SLC4A1 humano, el plásmido fue adquirido en la casa comercial Transomic, concretamente el Human SLC4A1 pCR-BluntII-TOPO.

Los vectores que contenían el inserto fueron introducidos en bacterias competentes por transformación mediante choque térmico. Dichas bacterias se sembraron en placas LB agar con el antibiótico correspondiente (Ampicilina (100 µg/ml) o Kanamicina (50µg/ml)) según el gen de resistencia antibiótica que confería cada plásmido. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron colonias aisladas de bacterias que habían incorporado el plásmido de interés y se crecieron en 10 ml de medio de cultivo LB líquido con el antibiótico correspondiente en agitación a 37°C durante toda la noche. Parte de las bacterias competentes que habían incorporado el inserto se conservaron a -80°C con glicerol al 15% para usos posteriores; el resto se usaron para extraer el DNA del plásmido mediante lisis bacteriana y purificación de DNA plasmídico con el Kit NZY MiniPrep.

Una vez purificado y cuantificado el DNA de los plásmidos se linealizó mediante corte en la parte correspondiente al extremo 3' del cDNA utilizando las enzimas de restricción adecuadas. A continuación, se utilizó el mMMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit de Thermo para la transcripción *in vitro* con la T7 RNA polimerasa. Una vez finalizada la transcripción, la reacción se digirió con una DNAsa para eliminar posibles fragmentos de DNA que pudieran permanecer en las muestras. Posteriormente, se realizó la poliadenilación del extremo 3' del RNA transcrito de los cDNAs que no incluían poliA, mediante el Poly(A) Tailing kit de Thermo, con el objetivo de estabilizar el RNA y mejorar la expresión de la proteína en los experimentos de nanoinyección. Por último, se purificaron dichos cRNAs con el RNA Clean-Up and Concentration Kit de Norgen o el GeneJetRNA Cleanup and Concentration Micro Kit de Thermo.

20. 3. TRANSPORTE DE FOSFATO EN OVOCITOS

20.3.1. Reactivos

- Solución de transporte: se han utilizado diferentes soluciones de transporte todas ellas con 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P y 50 μM de PO_4 .
 - Solución de transporte con Na^+ (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 10 mM Hepes-Tris pH 7.4).
 - Solución de transporte colina (100 mM colina, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 10 mM Hepes-Tris pH 7.4).
 - Solución de transporte sin cloro (100 mM gluconato de sodio, 2 mM gluconato potasio, 1 mM gluconato de calcio, 1 mM gluconato de magnesio y 10 mM Hepes-Tris pH 7.4).
- Solución de Stop y lavado (100 mM cloruro de colina, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 10 mM Hepes-Tris pH 7.4).

20.3.2. Procedimiento

Los ovocitos inyectados fueron dispuestos en grupos de 10 ovocitos para el transporte. En primer lugar, fueron lavados en la solución de lavado durante 1 minuto, después se colocaron en un tubo de ensayo y se les añadió 150 μl de medio de transporte en el cual permanecieron durante al menos 1 hora.

El transporte se detuvo retirando el medio de transporte y posteriormente realizando 5 lavados con la solución stop fría. Cada ovocito fue pipeteado en un vial de centelleo al cual se le añadieron 200 μl de SDS al 10%. Los viales fueron incubados durante al menos 30 minutos en agitación para producir la total disolución de los ovocitos por el SDS. Además, para cada grupo experimental se realizó un blanco que corresponde a una gota de la solución stop que queda tras los lavados.

La medición se realizó en el contador de centelleo Wallac 1409 de Perkin Elmer y más recientemente en el Analizador de Centelleo Líquido TriCarb de Perkin Elmer. Se realizaron triplicados de los estándares para cada medio de transporte y los resultados se expresaron en pmol Pi/ovocito calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{pmol Pi/ovocito} = \frac{\text{cpm}_s \times \text{Vol}_{st} \times [\text{PO}_4] \times 1000}{\text{cpm}_{st}}$$

Donde,

cpm_s : cuentas de la muestra

Vol_{st} : volumen pipeteado del estándar

cpm_{st} : cuentas del estándar

$[\text{PO}_4]$: concentración de fosfato

Para calcular la velocidad de transporte, en la ecuación se introdujo el tiempo de transporte, en horas.

20. 4. INYECCIÓN DE ^{32}P EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

20.4.1. Reactivos

- Ácido ortofosfórico como radionucleido de ^{32}P de Perkin Elmer.
- Solución de transporte con Na^+ (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 10 mM Hepes-Tris pH 7.4).
- Solución de Stop y lavado (100 mM cloruro de colina, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 10 mM Hepes-Tris pH 7.4).

20.4.2. Procedimiento

Los ovocitos fueron inyectados en grupos de 10 con agua (control negativo) o 1 ng de cRNA de Slc4a1. Tras varios días de incubación para la expresión de proteínas, los ovocitos se inyectaron directamente con el ortofosfato de ^{32}P de Perkin Elmer, para estudiar la salida de Pi. Tras el tiempo de incubación correspondiente en medio de transporte sin sustrato, se tomaron muestras del medio y los ovocitos fueron lavados en solución lavado/stop como se ha descrito en el apartado anterior. A continuación, los ovocitos fueron lisados en SDS, y se cuantificó la radiación Cherenkov en el Analizador de Centelleo Líquido TriCarb de Perkin Elmer.

20. 4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA BIOTINILADA DE OVOCITOS

20.4.1. Reactivos

- Reactivos provistos en el Pierce Cell Surface Protein Biotinylation and Isolation Kit (A44390):
 - Sulfo-NHS-SS-Biotina.

- NeutrAvidin agarosa.
- Wash Buffer y Elution Buffer.
- DTT.
- PBS y TBS.
- Solución de biotilación (10 mM trietanolamida pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 3 mg/ml sulfo-NHS-SS-Biotina).
- Inhibidor de proteasas: Protease Inhibitor Cocktail Tablet de Santa Cruz (sc-29130).
- Solución de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% triton X-100).

20.4.2. Procedimiento

Se seleccionaron 10 ovocitos en un tubo de 2 ml y fueron lavados 2 veces con 500 µl de PBS. La Sulfo-NHS-SS-Biotina fue resuspendida en la solución de biotilación a una concentración final de 1,5 mg/ml y se usaron 750 µl por cada 10 ovocitos. La incubación se realizó durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y después, se procedió a lavar dos veces con TBS frío.

Una vez realizada la biotilación de las proteínas de superficie del ovocito, se procedió a lisis a los ovocitos con 500 µl de solución de lisis con inhibidor de proteasas. Para ello, se homogeneizó el lisado con una aguja de 25G y se incubó durante 30 minutos en hielo, agitando cada 10 minutos. El lisado se centrifugó a 15000 g, 15 minutos a 4°C para eliminar la yema del ovocito y el material insoluble. En la superficie del sobrenadante aparece una capa de lípidos que se retiró con un hisopo.

Las columnas del kit fueron preparadas con la NeutrAvidin agarosa y se adicionó el lisado para su incubación durante 1 hora a 4°C en un rotor orbital. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 1000 g durante 1 minuto para eliminar la proteína no unida. Las columnas fueron lavadas 4 veces con el Wash buffer y se eluyó la proteína unida a la NeutrAvidin agarosa con 100 µl de Elution buffer con DTT a 10 mM, incubando durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se centrifugaron las columnas a 1000 g durante 2 minutos.

El eluido contiene la proteína biotinilada de los ovocitos a la cual deberemos añadirle el tampón de carga para Western-Blot. En este caso usaremos DTT como agente reductor a una concentración final de 50 mM y continuaremos realizando la técnica Western-Blot de la misma forma ya detallada en el apartado correspondiente.

21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de datos se realizó con el programa GraphPad Prism 9. La significación de las diferencias se estableció mediante t-test (Student) para dos variables y análisis de varianzas (ANOVA) para comparar 3 o más variables, además del test múltiple de Tukey para comparar pares de medias. El grado de significación fue de $\alpha=0,05$ (95% intervalo de confianza).

IV. RESULTADOS

PARTE 1. ADAPTACIONES AGUDAS A CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL FOSFATO EN LA DIETA

Los cambios en la concentración de Pi en la dieta son regulados de forma satisfactoria a través de diversos mecanismos integrados en la homeostasis del fosfato, como son la absorción intestinal, la excreción renal y los mecanismos de control hormonales o no hormonales. En ambos tejidos se han descrito procesos de adaptación aguda y crónica, pero siguen sin esclarecerse los mecanismos hormonales y de transporte que regulan dichos procesos.

En esta sección nos hemos centrado en la regulación de adaptaciones agudas en ratas a cambios en la concentración de Pi en el pienso. Para ello, se llevó a cabo un sistema de alimentación restringida durante 4 horas al día, en el cual ratas previamente adaptadas al consumo de una determinada dieta con alta (1,2% Pi) o baja (0,1% Pi) concentración de fosfato se sometían a un cambio a la dieta opuesta el día de sacrificio. Este estudio se encuentra dividido en dos partes, un experimento inicial de adaptaciones agudas en ratas macho albinas de la estirpe Wistar, y una segunda parte en la que se usaron ratas paratiroidectomizadas (PTX) de la misma estirpe.

1. 1. EXPERIMENTO DE ADAPTACIONES AGUDAS EN RATAS

En este estudio de adaptaciones agudas se usaron ratas alimentadas con diferentes concentraciones de Pi en el pienso y con diferentes modelos de alimentación (*ad libitum* y alimentación restringida a 4 horas al día) como se detalla en materiales y métodos (Figura M1). Además de las adaptaciones agudas a cambios en la concentración de Pi en la dieta, parte de las ratas con alimentación restringida y adaptadas crónicamente a las tres dietas fueron sacrificadas en ayunas el último día, mientras que la otra mitad fueron sacrificadas después de ser alimentadas. Esta división se realizó para conocer su situación tras una noche de ayuno y justo antes de ser alimentadas.

1.1.1. Cuantificación del consumo de pienso, ingestión de Pi y crecimiento

Para tener una información inicial precisa sobre el desarrollo del experimento, se cuantificó el consumo de pienso y Pi, así como el crecimiento de los animales. Se

observaron cambios en función del sistema de alimentación, ya que el consumo de pienso fue mayor en las ratas alimentadas *ad libitum* respecto a las que tuvieron alimentación restringida 4 horas al día (Figura R1 A). Lo cual se refleja en el crecimiento de los animales, ya que la ganancia neta de peso fue mayor en aquellos animales alimentados *ad libitum*. En las ratas con alimentación restringida la ganancia neta fue inferior o incluso negativa en el grupo alimentado con 0,1% Pi en el pienso (Figura R1 C). El menor crecimiento en comparación a los animales con libre acceso al pienso durante todo el día se debe al volumen limitado del estómago, ya que en los animales con dieta restringida sólo es llenado una vez y el consumo diario es menor.

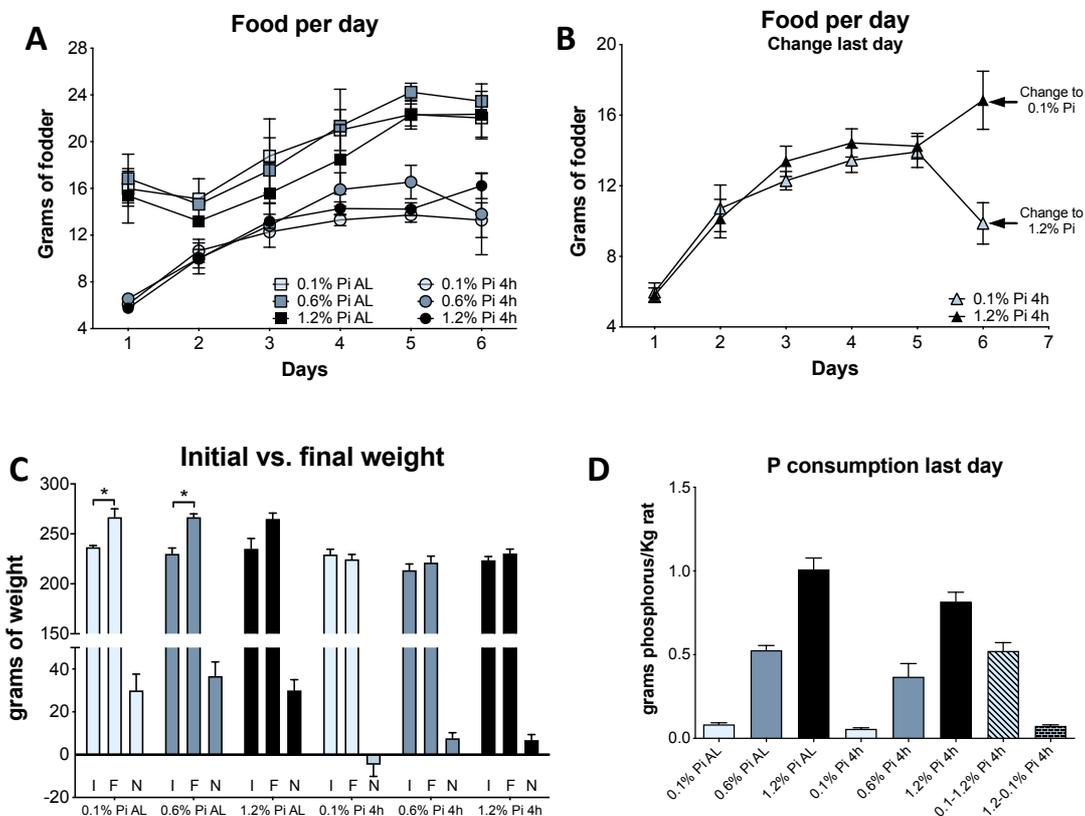


Figura R1: Cuantificación del consumo de pienso, ingestión de Pi y crecimiento **A.** Consumo de pienso al día por rata con alimentación *ad libitum* (AL) o restringida a 4 horas al día (4h). **B.** Detalle del consumo de pienso diario de los dos grupos de ratas que invirtieron la concentración Pi en el pienso el último día. **C.** Peso inicial (I), peso final (F) y la ganancia neta de peso (N). **D.** Concentración de Pi consumida el último día por kg de rata. * $p < 0.05$.

En los dos grupos de ratas con adaptación aguda, existe una diferencia significativa en cuanto al consumo de pienso durante el último día. Ambos grupos partían de un consumo promedio por rata de 14 g/día, pero aquellas que pasaron a consumir el pienso 0,1% de Pi aumentaron su consumo hasta un promedio de 16 g/día, mientras que las que cambiaron al pienso de 1,2% de Pi, lo descendieron a unos 9,86 g/día (Figura R1 B).

La relación entre la concentración de Pi en el pienso y la ingesta de Pi durante ese último día se mantuvo, de manera que fue mayor la ingesta de Pi en aquellas ratas que consumían el pienso de 1,2% de Pi tanto *ad libitum* como en modo restringido durante cuatro horas, únicamente fue ligeramente inferior en las ratas que se alimentaron con ese pienso (1,2% de Pi) solo el último día (Figura R1 C).

1.1.2. Efecto sobre la concentración de Pi y pH en orina

La orina de las 24 horas previas al sacrificio fue recogida en cada una de las ratas para cuantificar los valores de fosfato, creatinina y pH. Como cabía esperar, la excreción de Pi fue mayor en las ratas alimentadas con pienso con 0,6% y 1,2% de Pi, mientras que en las ratas alimentadas con 0,1% Pi en el pienso el ratio fosfato/creatinina fue menor de uno (Figura R2 A). Además, todas las ratas alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi mostraron una orina ligeramente alcalina, independientemente del modelo de alimentación (Figura R2 B). En ningún caso se vieron diferencias en la orina entre las ratas sacrificadas en ayunas o tras las 4 horas de alimentación restringida.

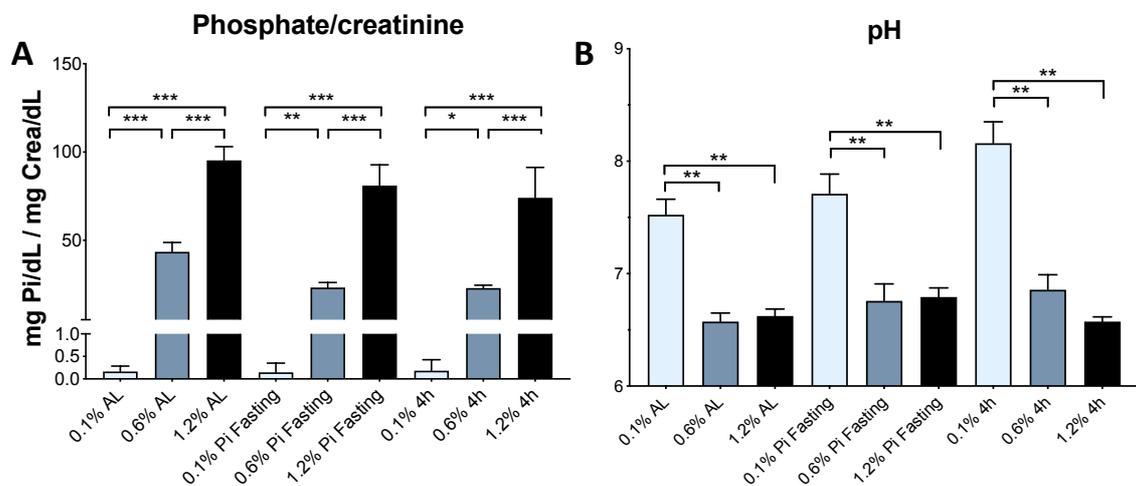


Figura R2: Cambios en los valores de Pi y pH en la orina asociados a diferentes concentraciones de Pi en la dieta. **A.** Ratio fosfato/creatinina. **B.** pH en orina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

1.1.3. Análisis de gases en sangre entera

En el momento del sacrificio se extrajo sangre entera arterial para realizar un análisis de gases del que se obtuvieron diferentes parámetros relacionados con el estado ácido-base de la sangre, la presión parcial de oxígeno y los valores de electrolitos como sodio, potasio y cloro. No se observaron cambios significativos en los valores de

los diferentes electrolitos analizados, ni en los parámetros referentes a la presión parcial de oxígeno, saturación de oxígeno o concentración de hemoglobina en sangre.

En cuanto al estado ácido base en sangre, únicamente se observaron unos valores tendentes a la acidosis en el grupo de animales que pasó a consumir el pienso de 0,1% de Pi el último día (Figura R3). El pH de la sangre se redujo a 7.34, el bicarbonato a 25,2 mM y el exceso de base descendió a -1,74 mM, lo que supone una ligera deficiencia de bases en la sangre. Además, cabe resaltar los valores ligeramente superiores de bicarbonato y de exceso de base en sangre en las ratas alimentadas con 0,1% Pi *ad libitum*, respecto a aquellas ratas que consumían una dieta con concentraciones superiores de Pi, siendo estadísticamente significativa dicha diferencia respecto a las que llevaban una alimentación restringida a 4 horas al día (Figura R3 B y C).

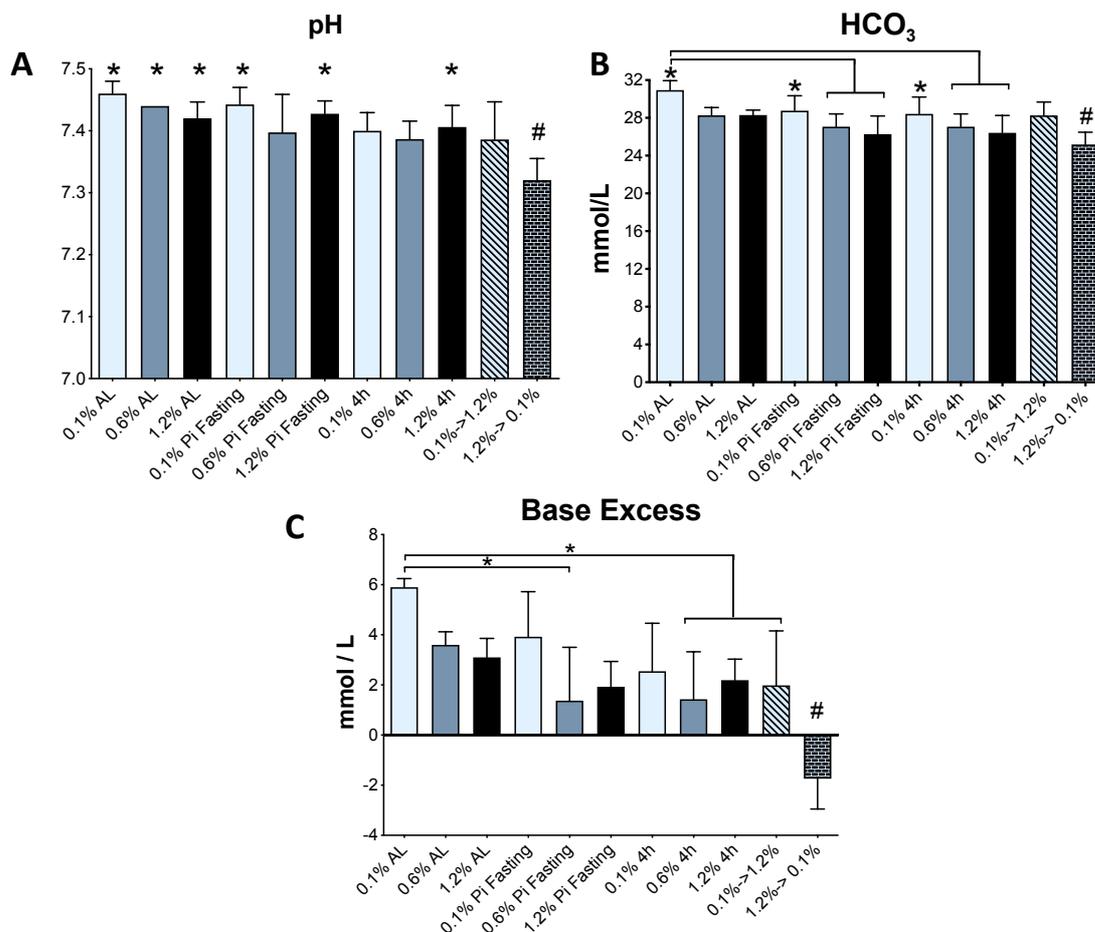


Figura R3: Efecto de la concentración de Pi en la dieta en el estado ácido base de la sangre. **A.** pH en sangre. # representa diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos con asterisco **B.** Concentración de bicarbonato. # representa diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos con asterisco **C.** Exceso de base. # representa diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de grupos. Además, se muestran diferencias significativas respecto a las ratas alimentadas con 0,1% de Pi *ad libitum* mediante las barras. *p<0.05.

1.1.4. Cuantificación de Pi en plasma y transporte de Pi en BBMV

Tras la obtención de los diferentes tejidos y muestras, se procedió a cuantificar en plasma la concentración de Pi y creatinina, para corroborar que la concentración de Pi ingerida en la dieta estaba en relación con la concentración de Pi en plasma, como se puede observar en la Figura R4 A. Esta diferencia desapareció únicamente en las ratas sacrificadas en ayunas, donde tras 20 horas desde la última ingestión de alimento se había normalizado la concentración de Pi en plasma.

Para conocer cómo afectan los cambios en las concentraciones de Pi en la dieta a la reabsorción renal y la absorción intestinal, principales mecanismos de regulación de la homeostasis del fosfato, se prepararon BBMV de dichos tejidos para determinar las variaciones en el transporte de Pi.

El transporte de Pi en corteza renal siempre guardó relación con la cantidad de Pi ingerida en la dieta y, por lo tanto, con la concentración de Pi en sangre (Figura R4 A). Lo mismo sucede en las ratas sacrificadas en ayunas, que pese a tener valores equivalentes de fosfato en plasma, mantienen un transporte en relación a la concentración de Pi ingerida a la que han sido adaptadas durante los 5 días de alimentación. Por lo tanto, a menor concentración de Pi en la dieta, mayor transporte y viceversa; incluidas las ratas que sufrieron el cambio de dieta el último día (Figura R4 C).

En yeyuno, no se observó dicha adaptación en el transporte cuando las ratas experimentaban un cambio agudo en la concentración de Pi en la dieta el último día, pero si se observó en las ratas con adaptación crónica a las diferentes concentraciones de Pi en la dieta (Figura R4 D). De manera que, en las ratas que consumieron de forma crónica el pienso que contenía 0,1% de Pi, ya sea *ad libitum* o con alimentación restringida a 4 horas, se observó aumento del transporte de Pi. Aunque no existe adaptación en yeyuno a cambios agudos en la dieta, tanto el transporte de las ratas que ingirieron el pienso de 1,2% de Pi y el de 0,1% de Pi en adaptación aguda mostraron valores de transporte superiores a los obtenidos en ratas alimentadas con 1,2% de Pi durante los 6 días de estudio e inferiores a las ratas que ingerían el pienso de 0,1% de Pi.

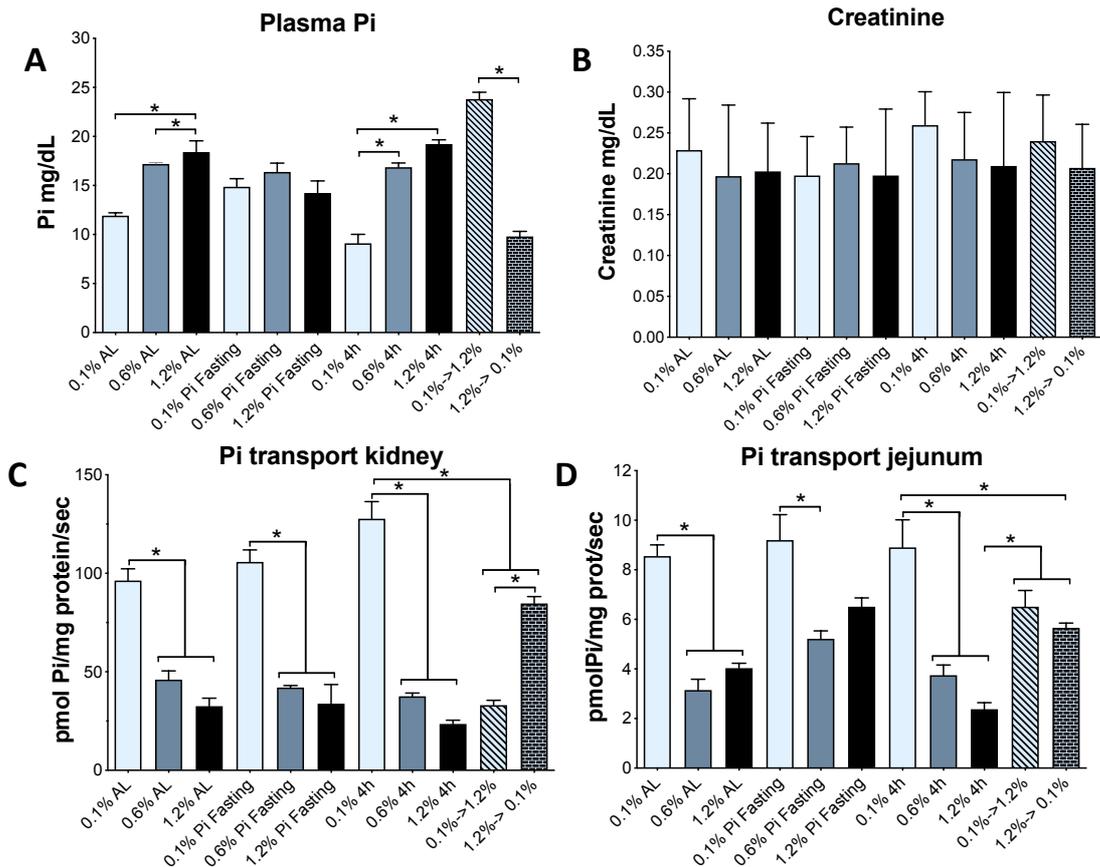
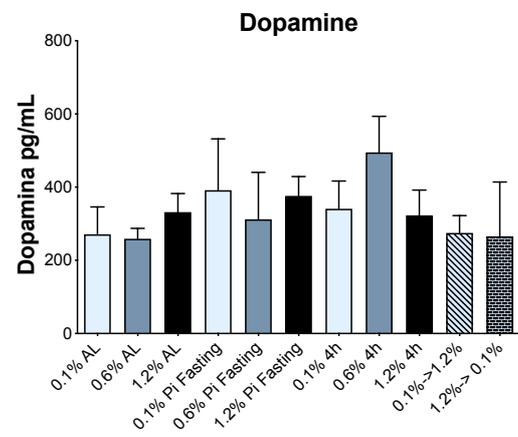
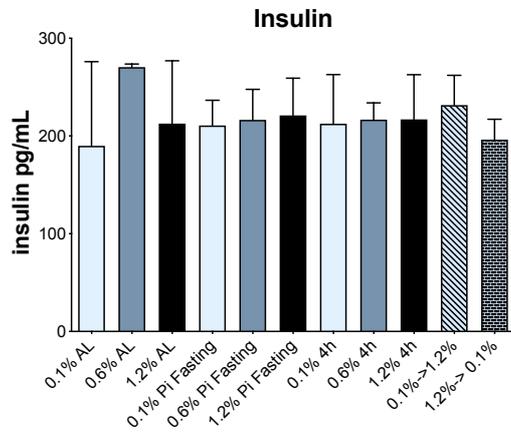
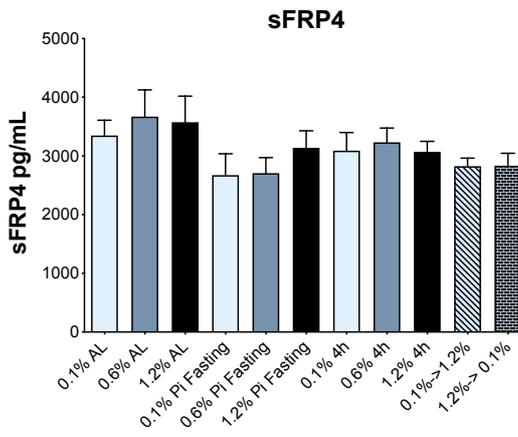
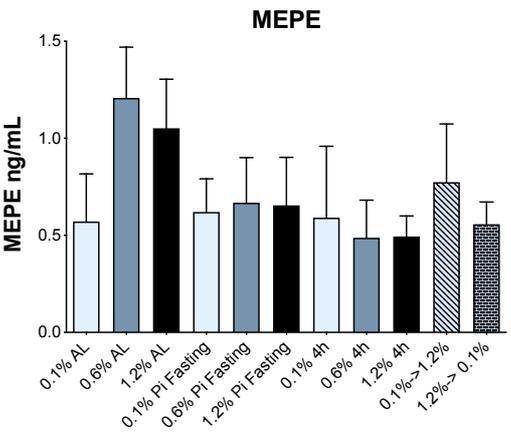
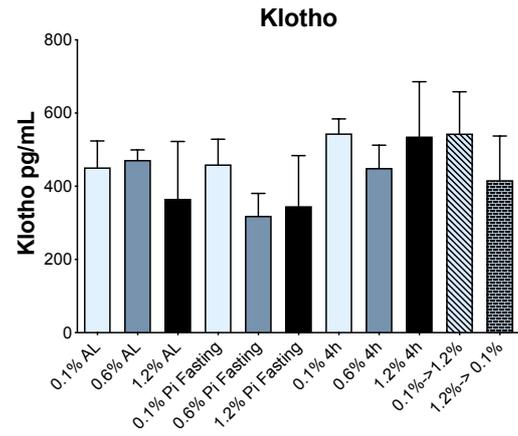
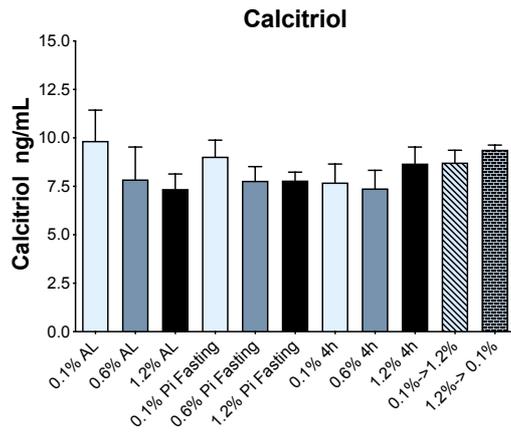
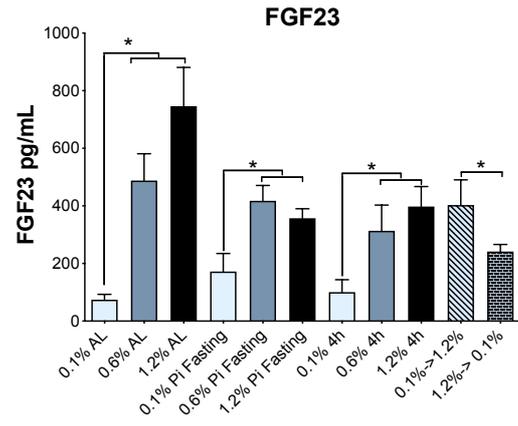
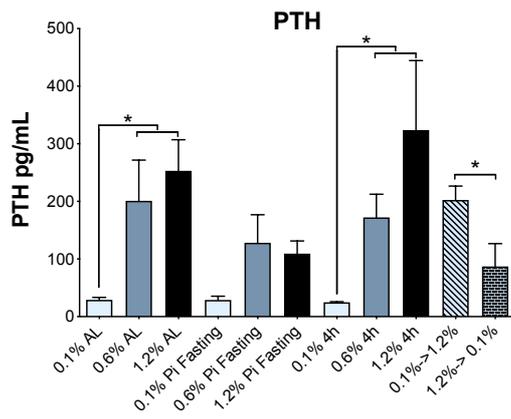


Figura R4: Efecto de los cambios en la concentración de Pi en la dieta en la concentración plasmática de Pi y en el transporte de Pi. **A.** Concentración de Pi en plasma. **B.** Concentración de creatinina en plasma. Transporte de Pi en presencia de NaCl en BBMV de corteza renal (**C**) y yeyuno (**D**). * $p < 0.05$.

1.1.5. Determinación de los factores de regulación en la homeostasis del Pi

Para conocer cómo estas circunstancias influyen en los mecanismos de regulación de la homeostasis del fósforo, se cuantificaron diferentes factores implicados en la homeostasis del Pi como PTH y diversas fosfatonas mediante pruebas de ELISA en plasma (Figura R5). Los valores de PTH y FGF-23 fueron los únicos que variaron en función de la concentración de Pi en la dieta, incluso en las adaptaciones agudas, aumentando su concentración en respuesta a altas concentraciones de Pi en la dieta. Estas variaciones se mantuvieron en las ratas sacrificadas en ayunas, aunque con una menor intensidad en el caso de la PTH. Las diferencias en la concentración de otras fosfatonas, como MEPE o sFRP4, no fueron significativas. Tampoco hubo diferencias en el resto de factores analizados: calcitriol, klotho, insulina, dopamina, T4 y corticoesteroides.



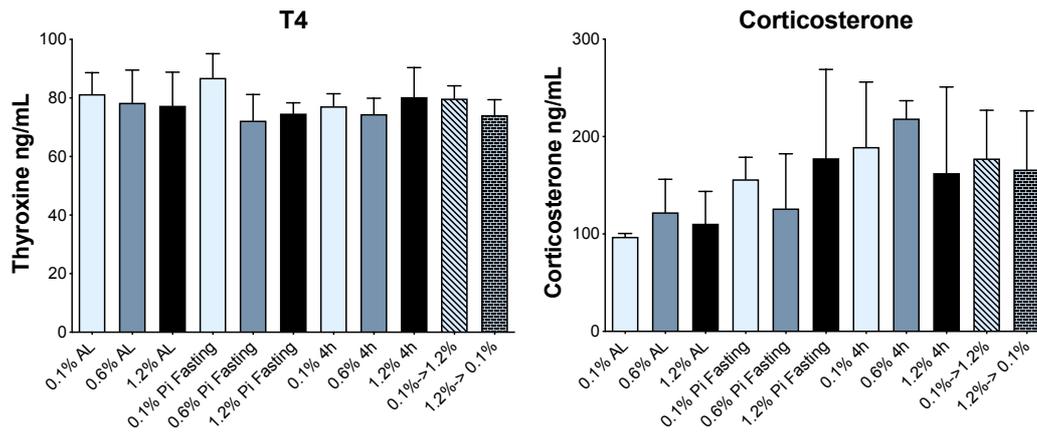


Figura R5: Concentración en plasma de diferentes hormonas y factores fosfatúricos capaces de regular la homeostasis del Pi. Únicamente se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la concentración de PTH y FGF-23. * $p < 0.05$.

1. 2. ADAPTACIONES AGUDAS EN RATAS PARATIROIDECTOMIZADAS (PTX)

Tras comprobar que las únicas hormonas que variaron en el experimento anterior en las adaptaciones agudas fueron PTH y FGF-23, y dado que no se han descrito receptores de FGF-23 en yeyuno, se procedió a realizar un experimento con ratas PTX con el fin de determinar el posible papel de PTH en la adaptación en intestino a las diferentes concentraciones de Pi en la dieta. Para ello, se usaron ratas PTX y ratas *Sham*, que actuaron como controles ya que fueron operadas como las ratas PTX, pero sin la extracción de la glándula paratiroidea. En este estudio, las ratas fueron alimentadas con las tres dietas de Pi, pero esta vez utilizando únicamente el sistema de alimentación restringida, para reducir el número de animales utilizados (Figura M2).

1.2.1. Cuantificación del consumo de pienso, ingestión de Pi y crecimiento

Para comenzar se siguió el mismo procedimiento que en la sección anterior cuantificando el consumo de pienso, el peso y la cantidad de Pi ingerido. El consumo de pienso fue mayor en las ratas *Sham* respecto a las ratas PTX, con la excepción de las ratas PTX alimentadas con la dieta de 0,1% Pi (Figura R6 A). Además, en las ratas PTX que sufrieron la adaptación aguda el último día, el consumo de pienso se disparó en aquellas que pasaron de consumir el pienso de 1,2% Pi al pienso de 0,1% Pi, alcanzando un promedio de 13,65 g/día cuando estaban consumiendo en torno a los 4 g/día. Lo contrario sucede con aquellas que cambiaron al pienso de 1,2% Pi, que pasaron de consumir unos 19 g/día de pienso 0,1% de Pi a solo 8,4 g/día de pienso 1,2% de Pi (Figura R6 B). Esta misma tendencia de consumo se observó en las adaptaciones agudas en el experimento inicial y en las ratas *Sham* de este estudio, de manera que la ingesta de pienso aumenta cuando pasan a consumir el pienso de 0,1% de Pi el último día de estudio y disminuye cuando cambian al pienso de 1,2% de Pi.

Asimismo, la cantidad de Pi ingerida por rata guarda relación con la concentración de Pi en el pienso, a excepción de las ratas PTX alimentadas con el pienso de 0,6% y 1,2% de Pi, en las cuales la cantidad ingerida de Pi fue muy similar entre ellas debido a las variaciones en el consumo de pienso (Figura R6 D).

Las diferencias en el consumo de pienso se vieron reflejadas en el peso final de los animales, ya que las ratas PTX presentaron un peso final inferior al obtenido en las ratas *Sham*. De nuevo, la excepción se presentó en las ratas PTX alimentadas con el pienso de 0,1% Pi, ya que tuvieron un peso final muy similar al de las ratas *Sham* (Figura R6 C).

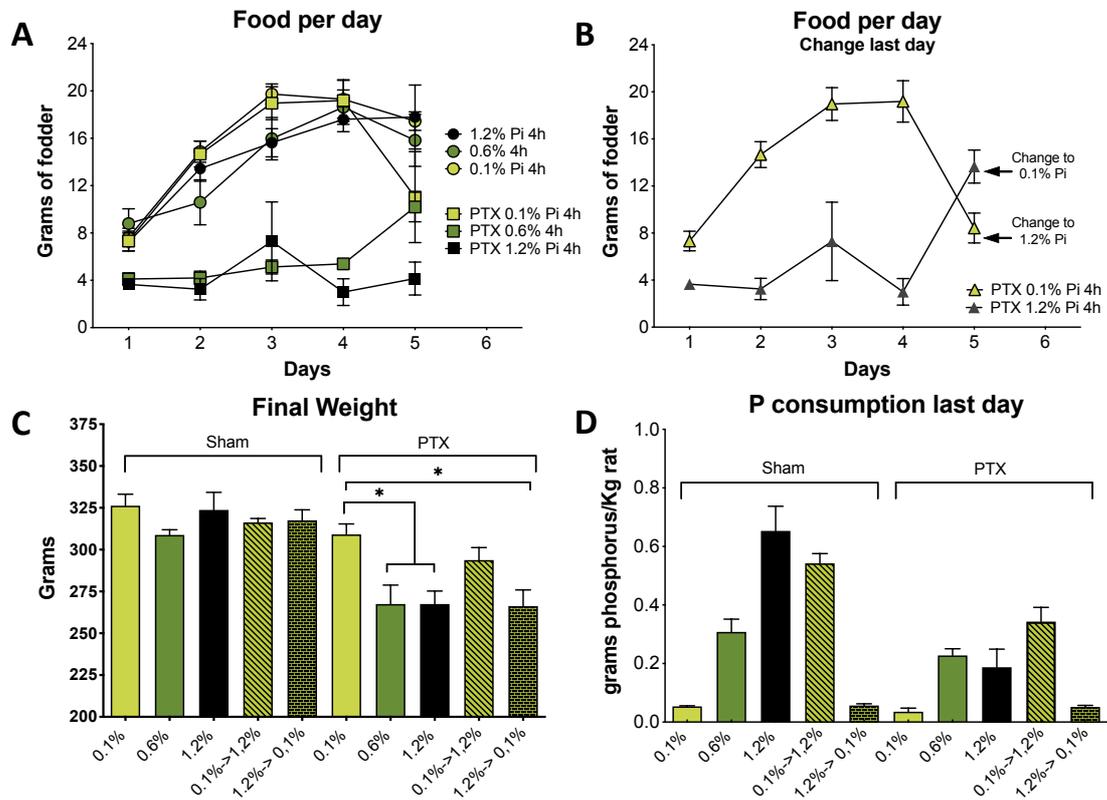


Figura R6: Cuantificación del consumo de pienso, ingestión de Pi y crecimiento. **A.** Consumo de pienso diario por rata con alimentación restringida (4h). **B.** Detalle del consumo de pienso diario de los dos grupos de ratas PTX que invirtieron la concentración de pienso el último día. **C.** Peso final ratas *Sham* respecto a ratas PTX. **D.** Concentración de Pi consumida el último día por kg de rata. *p<0.05

1.2.2. Efecto sobre el pH y la concentración de Pi y calcio en orina

La orina de las 24 horas previas al sacrificio fue recogida en todos los animales para cuantificar los valores de fosfato, creatinina y pH (Figura R7). Adicionalmente, se cuantificó la concentración de calcio en orina debido a la relevancia de la PTH en la homeostasis de dicho componente y a su íntima relación con la excreción renal de Pi.

Las ratas *Sham* mostraron valores muy similares de pH y de Pi excretado en orina a los observados en el experimento previo en ratas no PTX. De nuevo, se observó la hiperfosfaturia en orina en las ratas alimentadas con concentraciones altas de Pi. Sin embargo, las ratas PTX presentaron una excreción significativamente inferior de Pi en

orina pese a estar ingiriendo concentraciones de Pi muy similares a las ratas *Sham* (Figura R7 A). Respecto a la concentración de calcio excretado, los valores fueron más elevados en las ratas alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso, tanto en las ratas *Sham* como en las ratas PTX (Figura R7 B).

En cuanto a los valores de pH en orina, se observó la ligera alcalinización de la orina cuando las ratas son alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi de forma crónica tanto en ratas *Sham* como PTX, pero el resto de valores obtenidos en las ratas PTX tienden a ser ligeramente superiores a los obtenidos en las ratas *Sham* (Figura R7 C).

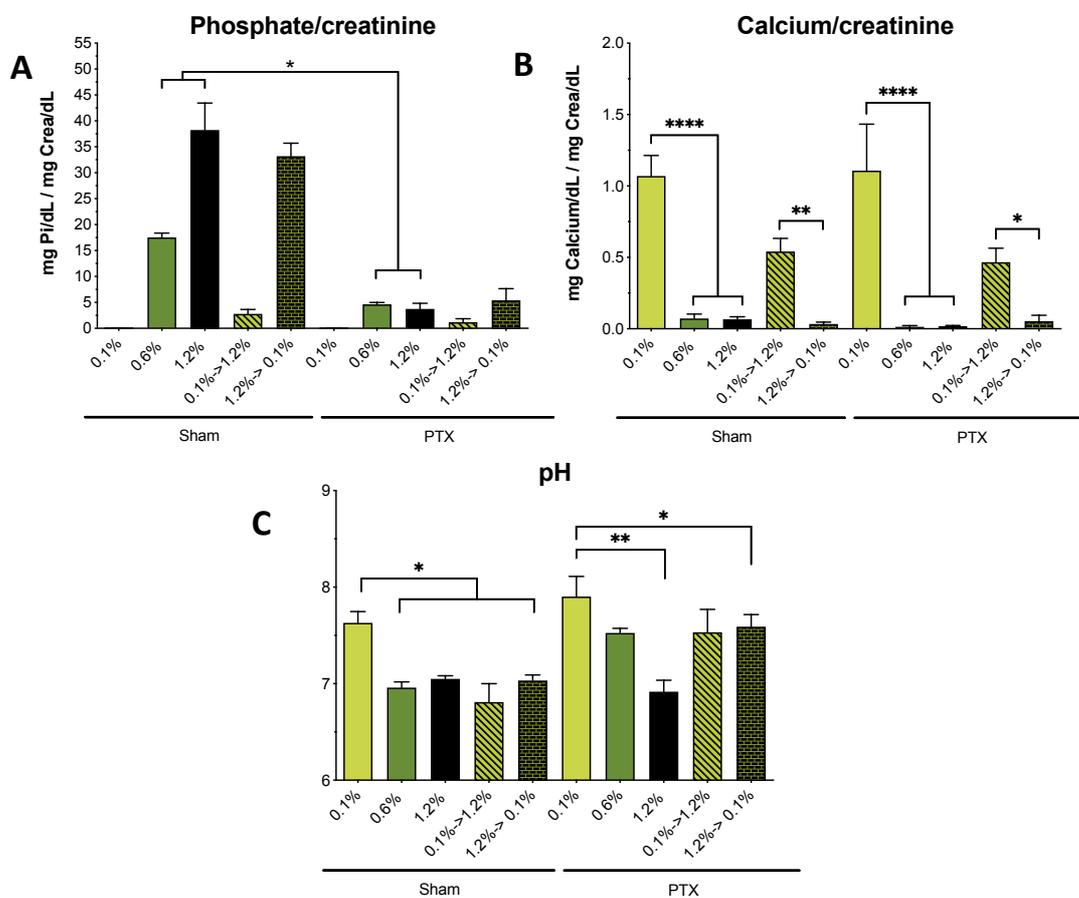


Figura R7: Cambios en los valores de Pi, calcio y pH en la orina asociados a diferentes concentraciones de Pi en la dieta. **A.** Ratio fosfato/creatinina. **B.** Ratio calcio/creatinina. **C.** pH en orina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

1.2.3. Análisis de gases en sangre entera

De la misma manera que en el estudio previo, se realizó un análisis de gases en sangre entera arterial obtenida en el momento del sacrificio.

No se encontraron cambios en la concentración de los diferentes electrolitos analizados, ni en los valores referentes al estado oxígeno/hemoglobina. En la Figura R8 se pueden observar los parámetros más importantes en referencia al estado ácido base de la sangre como son el pH, la concentración de HCO_3^- y el exceso de base. Las ratas *Sham* presentaron un patrón muy similar al observado en las ratas del experimento previo respecto a estos parámetros. Sin embargo, en las ratas PTX no se encontraron diferencias significativas, a excepción de la reducción del exceso de base en el grupo donde se realizó la adaptación aguda a 0,1% de Pi en el pienso del último día (misma tendencia observada en las ratas *Sham*) (Figura R8 C).

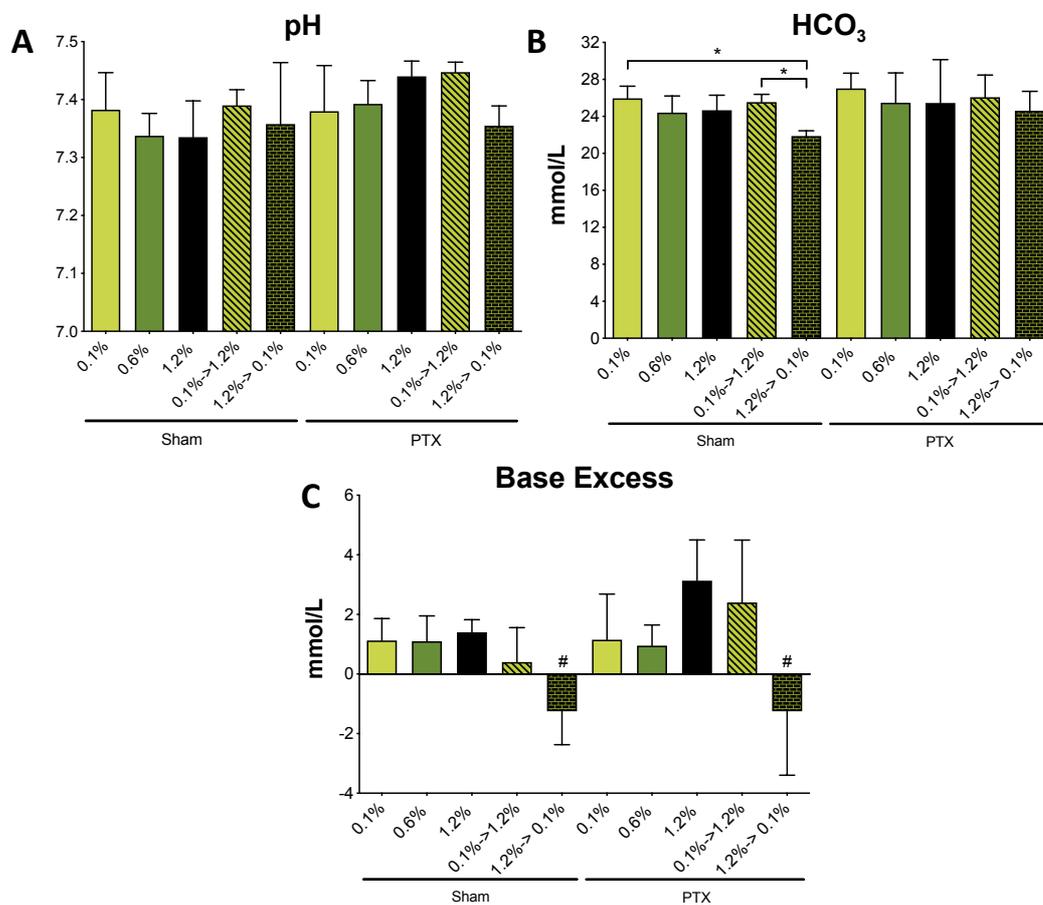


Figura R8: Efecto de la concentración de Pi en la dieta en el estado ácido base de la sangre en ratas *Sham* versus ratas PTX. **A.** pH en sangre. **B.** Concentración de bicarbonato. **C.** Exceso de base. # representa diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de grupos. * $p < 0.05$.

1.2.4. Cuantificación de Pi y calcio en plasma y transporte de Pi en BBMV

Para confirmar cómo la diferencia en la ingesta de Pi se traduce en cambios en la concentración de Pi en sangre, se cuantificaron los niveles de Pi y creatinina en plasma. Como se observa en la Figura R9 A, la concentración de Pi en plasma guarda relación

directa con el contenido de Pi en la dieta. Sin embargo, los valores de Pi en plasma en todas las ratas PTX a excepción de las alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso, fueron superiores a sus respectivos grupos de alimentación en las ratas *Sham*. Adicionalmente, se cuantificó la concentración de calcio en plasma, ya que las ratas alimentadas con 0,1% de Pi presentaban hipercalcemia (Figura R7 B). La concentración de calcio en plasma presentó la tendencia contraria a la observada en los valores de Pi, ya que fue menor en los animales PTX, excepto en las ratas que consumían el pienso con 0,1% de Pi (Figura R9 A).

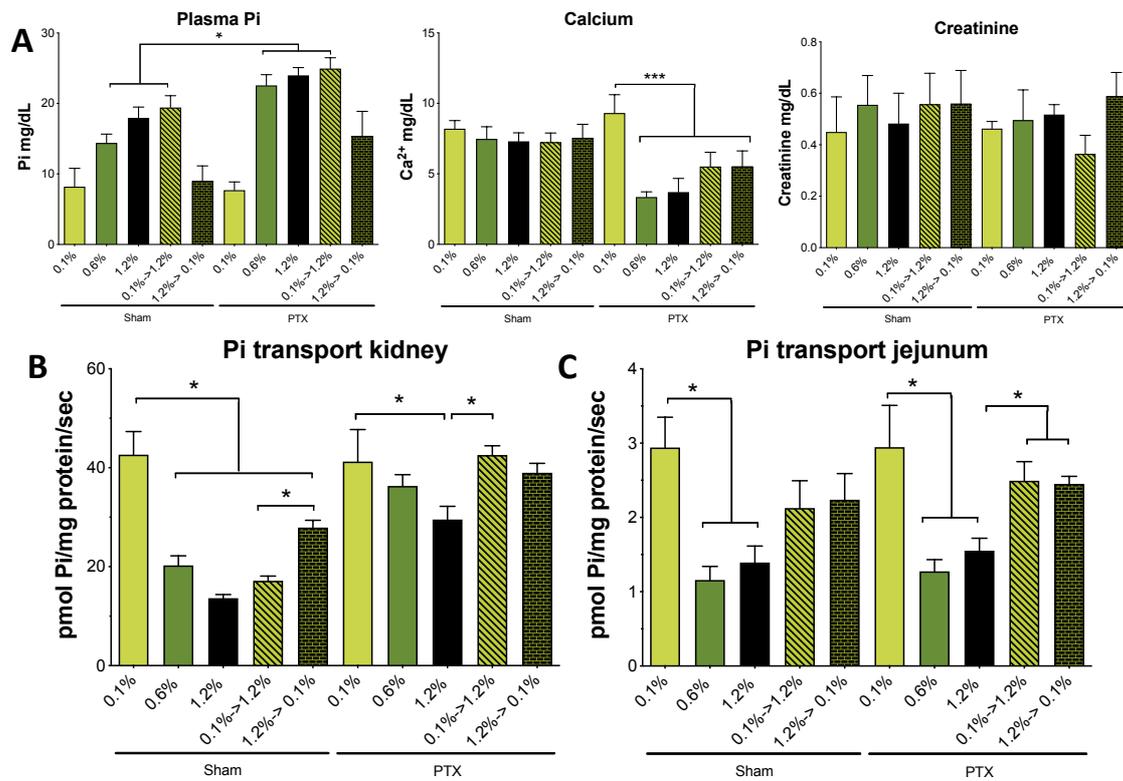


Figura R9: Efecto de los cambios en la concentración de Pi en la dieta en la concentración plasmática de Pi, calcio y en el transporte sodio dependiente de Pi. **A.** Concentración de Pi, calcio y creatinina en plasma. Transporte de Pi en presencia de NaCl en BBMV de corteza renal (**B**) y yeyuno (**C**). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para estudiar la relación entre la concentración de Pi en plasma y la absorción intestinal y excreción renal del mismo, se cuantificó el transporte sodio-dependiente de Pi en BBMV de ambos tejidos. En BBMV de corteza renal, los valores de transporte obtenidos en las ratas *Sham* mostraron las mismas diferencias presentes en la primera parte del experimento en relación con la concentración de Pi en la dieta. No obstante, en las ratas PTX el transporte de Pi (a excepción de las ratas PTX que consumían 0,1% de Pi) fue superior a sus respectivos grupos de alimentación en las ratas *Sham*. Además,

no se observaron diferencias en el transporte entre los dos grupos que sufrieron una adaptación aguda a distintas concentraciones de Pi en la dieta, aunque la dieta consumida por cada uno de ellos fue la contraria en el momento previo al sacrificio (Figura R9 B).

Por otro lado, el patrón de transporte en yeyuno fue similar entre ratas *Sham* y ratas PTX (Figura R9 C), mostrando la misma tendencia ya observada en la primera parte de este experimento (Figura R4 D).

1.2.5. Expresión de NaPi-IIb en BBMV de yeyuno

A continuación, dado que NaPi-IIb es el principal transportador conocido encargado de la absorción de Pi a lo largo del intestino delgado, se procedió a cuantificar la expresión de NaPi-IIb en la membrana en borde en cepillo de yeyuno para ver si existía correlación con los resultados de transporte de Pi obtenidos en ese mismo tejido.

La expresión de NaPi-IIb siguió la misma tendencia observada en el transporte de Pi en yeyuno, encontrando una mayor expresión en ratas adaptadas a 0,1% de Pi en la dieta. Sin embargo, el grupo de adaptación aguda a 0,1% de Pi mostró un aumento en la expresión de NaPi-IIb mayor que el grupo de ratas con adaptación aguda a 1,2% Pi, pese a que el transporte de fosfato entre ambas era muy similar, tanto en ratas *Sham* como PTX (Figura R10).

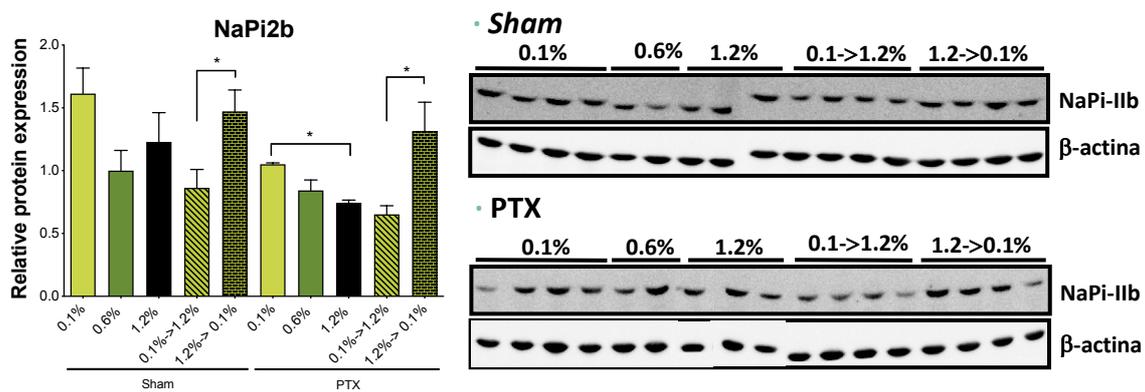


Figura R10: Expresión de NaPi-IIb en BBMV de yeyuno realizada mediante Western-Blot. *p<0.05.

1.2.6. Determinación de los factores de regulación en la homeostasis del Pi

Para finalizar, se procedió a la cuantificación en plasma de diferentes factores fosfatúricos, con el objetivo de identificar cómo puede afectar sobre ellos la ausencia de

PTH. Además, para confirmar la correcta eliminación de la glándula paratiroidea en las ratas PTX se realizó la cuantificación de PTH en ratas PTX y *Sham*. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia total de PTH en las ratas PTX y los valores habituales en las ratas *Sham*.

Los valores de FGF-23 en plasma en ratas PTX mantuvieron la regulación presente en las ratas *Sham*, aumentando su concentración en respuesta a un aumento en la concentración de Pi en la dieta. Sin embargo, si se comparan con los valores absolutos en ratas *Sham*, hay un descenso significativo en la secreción de FGF-23 en ausencia de PTH (Figura R11 A). Otros factores implicados en la regulación de la homeostasis del fósforo como MEPE, sFRP4, calcitriol, dopamina y T4 se mantuvieron sin cambios en las ratas PTX y con valores similares a los obtenidos en los animales control. Únicamente, se observó un ligero descenso en la concentración de insulina en ratas PTX alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi (Figura R11 B).

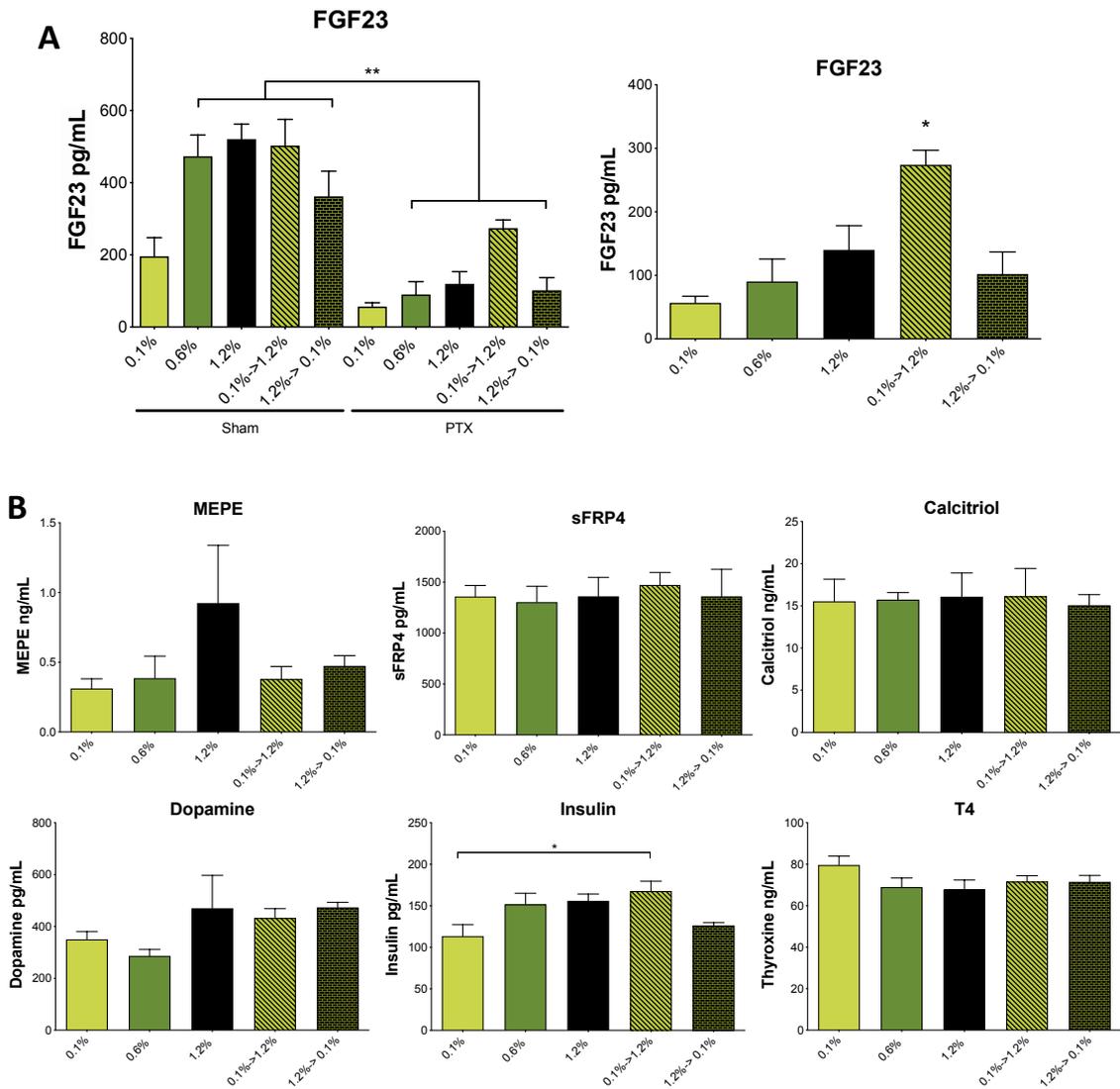


Figura R11: Concentración en plasma de diferentes hormonas y factores fosfatúricos capaces de regular la homeostasis del Pi. **A.** Concentración de FGF-23 en plasma de ratas *Sham* versus ratas *PTX* y a la derecha los valores obtenidos en ratas *PTX* en detalle. **B.** Concentración de MEPE, sFRP4, calcitriol, dopamina, insulina y T4 en plasma de ratas *PTX*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

PARTE 2. PRIVACIÓN DE FOSFATO

2. 1. EFECTO DE LA PRIVACIÓN DE FOSFATO *IN VITRO*

Antes de realizar el estudio *in vivo* de privación de Pi se decidió utilizar la línea celular OK (subclon OK-P) debido a que presenta características muy similares a las células presentes en el epitelio del túbulo contorneado proximal, con el fin de identificar posibles mecanismos moleculares implicados en los cambios renales que se producen en respuesta a la privación por Pi.

En primer lugar, se determinó mediante Western-Blot la expresión de diferentes proteínas que han sido postuladas como posibles causantes de la bicarbonaturia observada en respuesta a la privación de Pi. En células adaptadas durante 24 horas a diferentes concentraciones de Pi se observó el esperado aumento en la expresión de NaPi-4 (NaPi-IIa endógeno de las células OK) tanto en el homogenado total como en la superficie celular de aquellas células que habían sido adaptadas a 0,1 mM de Pi (Figura R12). En cuanto a la expresión de la V-ATPasa y de NHE3 no se observó variación en el homogenado total, mientras que en la proteína extraída de la superficie celular mediante biotilación, sí se observó un ligero aumento de NHE3 con la adaptación a 0,1 mM de Pi (Figura R12 B).

Tras los resultados obtenidos donde NHE3 no solo no disminuye su expresión a 0,1 mM de Pi, sino que la aumenta; se planteó la posibilidad de que pese a tener una expresión proteica aumentada, su actividad se viera comprometida. Por ello, se cuantificó la expresión de NHE3 fosforilado en serina 552, forma inactiva de la proteína. Como se muestra en la Figura R12 A y B, esta forma inactiva de la proteína aumentó su expresión con la adaptación de las células OK a 0,1 mM de Pi tanto en el homogenado total como en la superficie de membrana. Sin embargo, no se puede conocer el porcentaje de NHE3 total correspondiente a la forma fosforilada.

Otra de las alteraciones descritas en pacientes con hipofosfatemia es una menor producción de amoníaco por parte de las células del epitelio renal (142). Por ese motivo, se realizó una cuantificación de amoníaco en células adaptadas a las diferentes concentraciones de Pi durante 24 horas. En las células adaptadas a 0,1 mM de Pi

disminuyó la concentración de amoníaco intracelular respecto aquellas células adaptadas a concentraciones superiores de Pi (Figura R13).

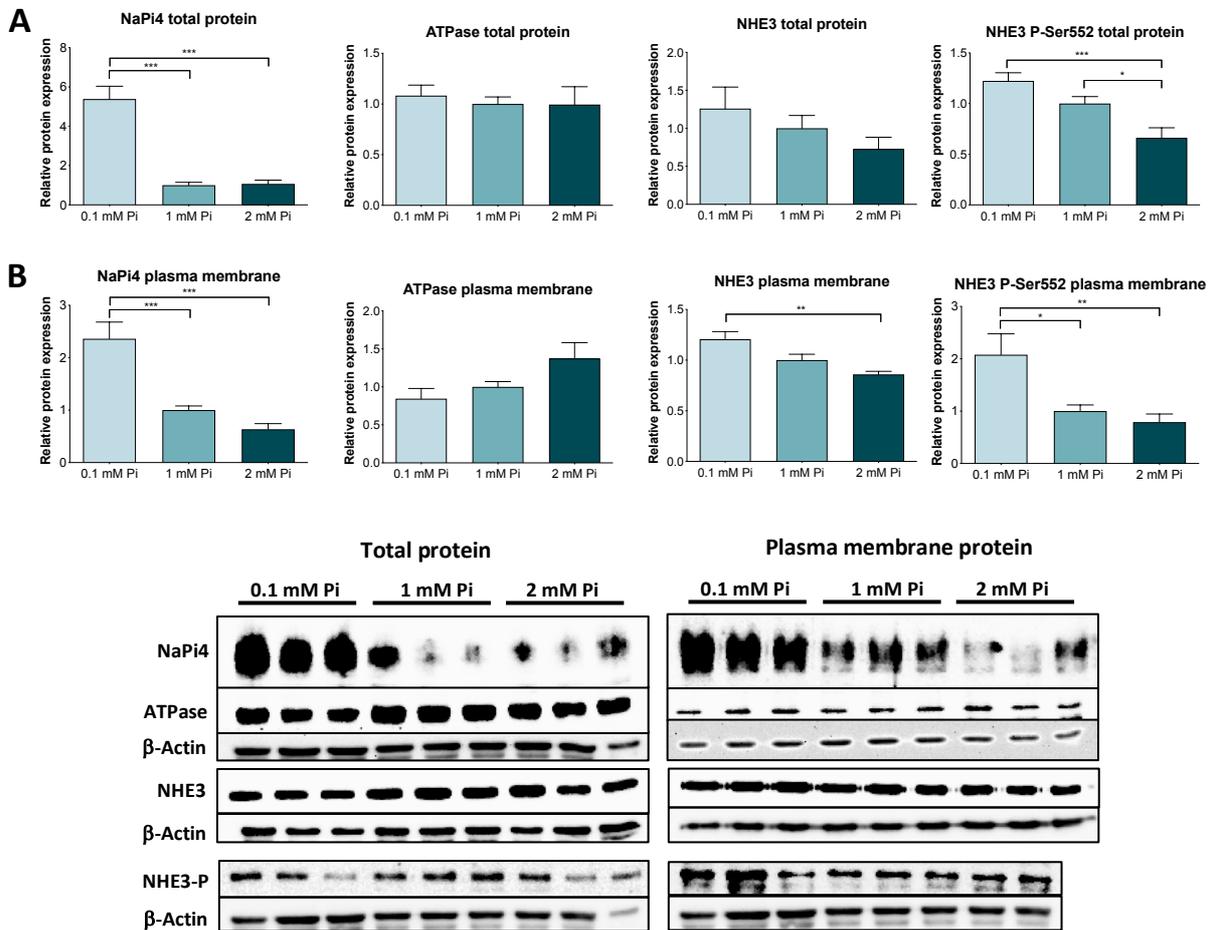


Figura R12: Expresión proteica de diferentes transportadores en células OK-P. Western-Blot de NaPi-4, V-ATPasa, NHE3 y NHE3 fosforilado en la posición serina 552 (NHE3 P-Ser552) en el homogenado total (A) y en proteína de superficie extraída mediante biotilación (B) en células OK-P adaptadas durante 24 horas a las diferentes concentraciones de Pi. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

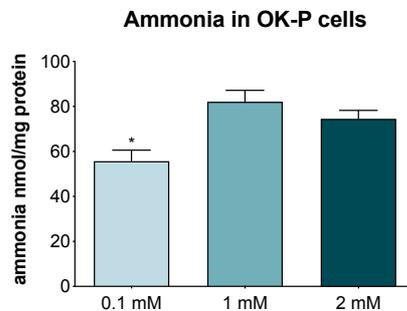


Figura R13: Efecto de la privación de Pi sobre la producción de amoníaco en células OK-P. Las células fueron adaptadas a las diferentes concentraciones de Pi durante 24 horas, tras las cuales se cuantificó la concentración de amoníaco en relación a la concentración de proteína presente en cada pocillo. * $p < 0.05$.

2.1.1 Efecto de la privación de Pi sobre el pH intracelular

Siguiendo con la evaluación de la actividad de NHE3 se llevo a cabo un protocolo de recuperación de pH (Figura M3) en las células OK-P adaptadas a las diferentes concentraciones de Pi, en el cual se adicionó NH₄Cl al medio para producir la alcalinización de las células. Esto se debe a que el intercambiador NHE3 tiene un papel fundamental en la fase final de la recuperación de pH a valores previos a la alcalinización.

Esta vez las células OK-P fueron adaptadas durante 24 horas a 0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM de Pi. Para establecer dichas concentraciones se tuvo en cuenta, por un lado, que no se encontraron diferencias entre 1 y 2 mM de Pi y por otro lado que la concentración de 2 mM superaría las concentraciones de Pi que suelen alcanzarse en el organismo. Por ello, se decidió sustituir la concentración de 2 mM Pi por una concentración intermedia de 0,5 mM de Pi.

La medida inicial de pH intracelular fue ligeramente inferior tanto a 0,1 mM de Pi como a 0,5 mM Pi respecto a 1 mM Pi (Figura R14 A). Sin embargo, las medidas de pH observadas en todas las circunstancias entrarían dentro del rango fisiológico de las células.

En la alcalinización del pH intracelular en respuesta a la presencia de NH₄Cl se observó un comportamiento muy similar entre los tres grupos de células, así como en la acidificación posterior, tras eliminar el NH₄Cl del medio. Sin embargo, en la última fase en la cual la célula trata de ajustar su pH a los valores iniciales eliminando los H⁺ acumulados, se mostró una clara diferencia entre los diferentes grupos (Figura R14 B). Mientras las células adaptadas a 1 mM de Pi tuvieron una recuperación rápida, llegando a alcanzar los valores de pH iniciales. Tanto las células adaptadas a 0,1 mM como a 0,5 mM no llegaron a alcanzar los valores de pH iniciales teniendo una recuperación más lenta, de manera que incluso 5 minutos después de la adición del medio con NaCl, el pH comenzó a descender.

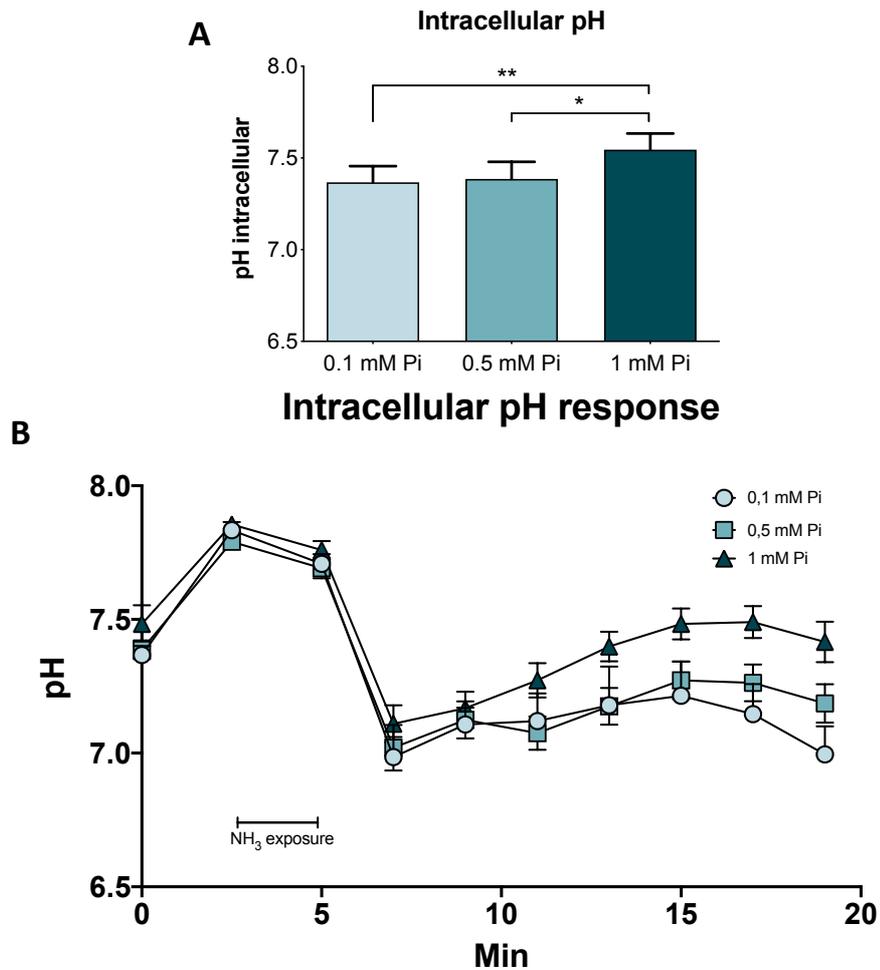


Figura R14: Medición del pH intracelular en células OK-P. **A.** Medida de pH intracelular mediante el fluorocromo pHrodo Green AM. **B.** Seguimiento del pH intracelular a lo largo del protocolo de recuperación de pH. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2. 2. EFECTO DE LA PRIVACIÓN DE FOSFATO *IN VIVO*

Con el fin de completar y corroborar la información aportada a través de los experimentos realizados en células OK, se procedió a realizar un experimento con ratas alimentadas con tres concentraciones de Pi en el pienso, durante 1 y 8 semanas y estudiar posibles cambios en orina y sangre, así como cambios en la expresión de las proteínas previamente analizadas en la línea celular OK.

2.2.1. Cambios en orina en respuesta a bajas concentraciones de Pi en la dieta

En primer lugar, se realizó el seguimiento del pH en orina en el grupo de ratas que consumen los tres tipos de pienso durante 8 semanas (Figura R15), ya que es uno de los

cambios característicos que han sido descritos en casos de privación de Pi que cursan con hipofosfatemia.

En los primeros días de adaptación a las diferentes dietas, el pH en orina fue muy similar en los tres grupos y no se observaron diferencias debido a las altas fluctuaciones. Sin embargo, a partir del día 10 el pH de las ratas adaptadas a 0,1% de Pi en la dieta ascendió a valores medios superiores a 7 y fue donde permaneció hasta el sacrificio de los animales el día 60. Por otro lado, las ratas adaptadas a 0,6% y 1,2% de Pi en el pienso mostraron valores muy similares entre sí y permanecieron en un rango de pH entre 6 y 6,7, disminuyendo a valores medios de 6,3 durante el último mes de estudio, remarcando la diferencia respecto a las ratas alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi.

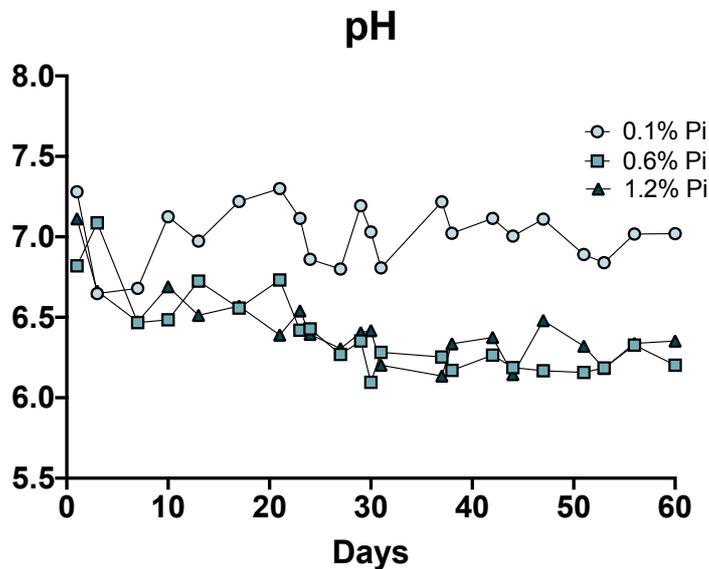


Figura R15: Seguimiento del pH en orina en ratas adaptadas a diferentes concentraciones de Pi en el pienso.

Adicionalmente, se realizaron cuantificaciones de diversos parámetros en orina, con el fin de conocer si se reproducen en las ratas las condiciones descritas en diversos estudios sobre la privación de Pi.

La concentración de Pi excretada en orina fue menor en las ratas que consumían el pienso con baja concentración de Pi (0,1%), siendo de hasta 100 veces menor que aquellas que consumían el pienso de 1,2% de Pi y 50 veces menor que las alimentadas con 0,6% de Pi en el pienso (Figura R16 A). Además, se observó una marcada calciuria en respuesta a la privación de Pi (0,1% de Pi) desde el día 1 hasta la finalización del

estudio a los 60 días, que no se observó en ratas alimentadas con concentraciones superiores de Pi en la dieta (Figura R16 B). Otro de los parámetros que caracterizan la privación de Pi es la bicarbonaturia. Como se puede observar en la Figura R16 C, aparece una mayor excreción de bicarbonato en la orina de las ratas alimentadas con 0,1% de Pi en la dieta, pero no llega a ser estadísticamente significativa en algunos de los casos, debido a que encontramos una alta variabilidad en función de los individuos y de los diferentes días de medición. Además, en algunas de las ratas alimentadas con 0,6% y 1,2% de Pi los valores de bicarbonato en orina se encuentran por debajo del límite de detección del kit. No obstante, cuando las ratas fueron alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso se observaron valores de hasta 0,2 en el ratio bicarbonato/creatinina, que no fueron observados en ninguno de los animales que ingerían concentraciones mayores de Pi en la dieta. Finalmente, las concentraciones de amoniaco en orina, pese a las fluctuaciones a lo largo de los días, no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos (Figura R16 D).

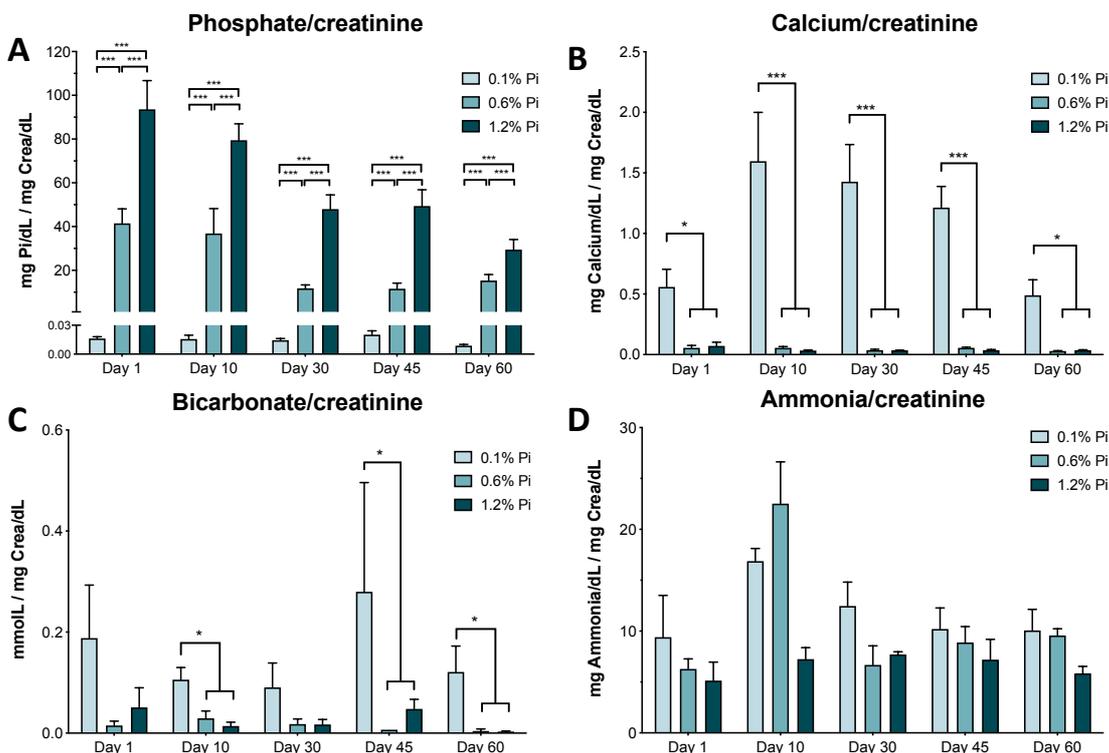


Figura R16: Efecto de la privación de Pi sobre diferentes parámetros en orina. **A.** Ratio fosfato/creatinina. **B.** Ratio calcio/creatinina. **C.** Ratio bicarbonato/creatinina. **D.** Ratio amoniaco/creatinina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.2.2. Análisis sanguíneo en respuesta a bajas concentraciones de Pi en la dieta

En primer lugar, con la sangre entera arterial extraída en el momento del sacrificio en los dos periodos experimentales, 1 semana y 8 semanas; se realizó un análisis de gases en el que se obtuvieron parámetros relacionados con el estado ácido-base como el pH y la concentración de bicarbonato; la presión parcial de oxígeno y la concentración de electrolitos como el sodio, potasio y cloro. No se encontraron diferencias entre los diferentes parámetros analizados, ni siquiera en el pH sanguíneo (Figura R17 A).

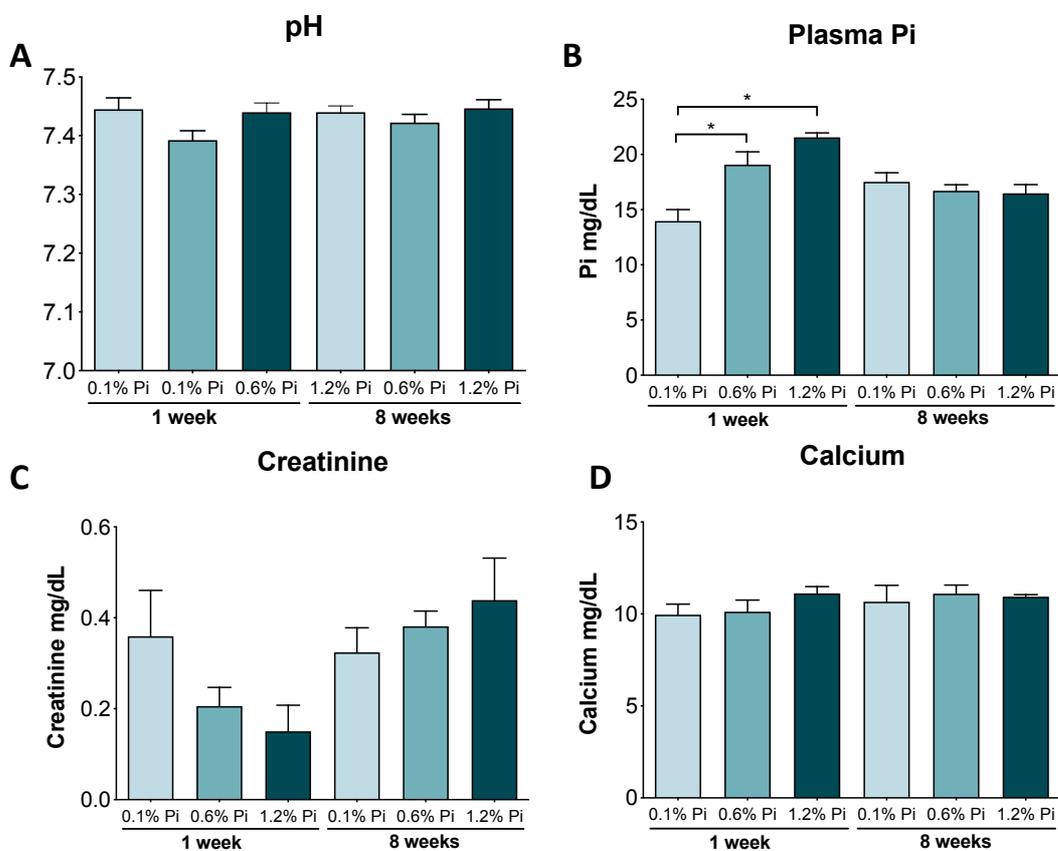


Figura R17: Efecto de la privación de Pi sobre el pH y la concentración de Pi, calcio y creatinina en sangre. **A.** Medición de pH en sangre entera mediante el analizador de gases Vetstat. Concentración de Pi (**B**), creatinina (**C**) y calcio (**D**) en plasma. * $p < 0.05$.

Tras la obtención del plasma sanguíneo, se determinaron otros parámetros de interés entre los que se encuentran la concentración de Pi, calcio y creatinina. Las concentraciones de Pi en plasma obtenidas en la primera semana dependieron de la concentración de Pi en el pienso (Figura R17 B). Sin embargo, tras dos meses de ingesta de esas mismas dietas, los valores de Pi en plasma se igualaron entre los tres grupos, desapareciendo las diferencias entre ellos (Figura R17 B). Los valores de creatinina pese

a tener fluctuaciones, no presentaron diferencias significativas entre grupos (Figura R6 C). Por otro lado, la concentración de calcio en plasma no experimentó modificaciones entre los diferentes grupos a 1 y 8 semanas (Figura R17 D), pese a que las ratas adaptadas a 0,1% de Pi presentaban una marcada calciuria en orina (Figura R16 B).

Además, en plasma se determinaron diferentes hormonas y factores implicados en la homeostasis del Pi (Figura R18). La producción de PTH se vio incrementada tras una semana en las ratas que consumían el pienso de 0,6% y 1,2% de Pi, mientras que en las ratas que consumían la dieta de 0,1% Pi fue menor, en torno a los 20 pg/ml. No obstante, tras 8 semanas la concentración de PTH en plasma se estabilizó en los tres grupos en valores basales de unos 20 pg/ml.

Algo similar sucedió con el FGF-23, que a 1 semana aumentó en las ratas que consumían el pienso de 0,6% de Pi hasta alcanzar los 400 pg/ml y para 1,2% de Pi hasta los 696 pg/ml. Tras 8 semanas, los valores de FGF-23 en esos mismos grupos se mantuvieron elevados respecto a la concentración obtenida en las ratas alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi, pero se igualaron en torno a 565 pg/ml. Además, la concentración de la fosfatonina MEPE se observó ligeramente aumentada en las ratas alimentadas con 0,6% y 1,2% de Pi en el pienso durante 1 semana, aunque dicho aumento solo se mantuvo en el grupo de 1,2% de Pi pasadas 8 semanas. Para finalizar, se cuantificó la concentración de 25-hidroxivitamina D₃, Klotho, sFRP4 y T3 sin obtener diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de estudio (Figura R18).

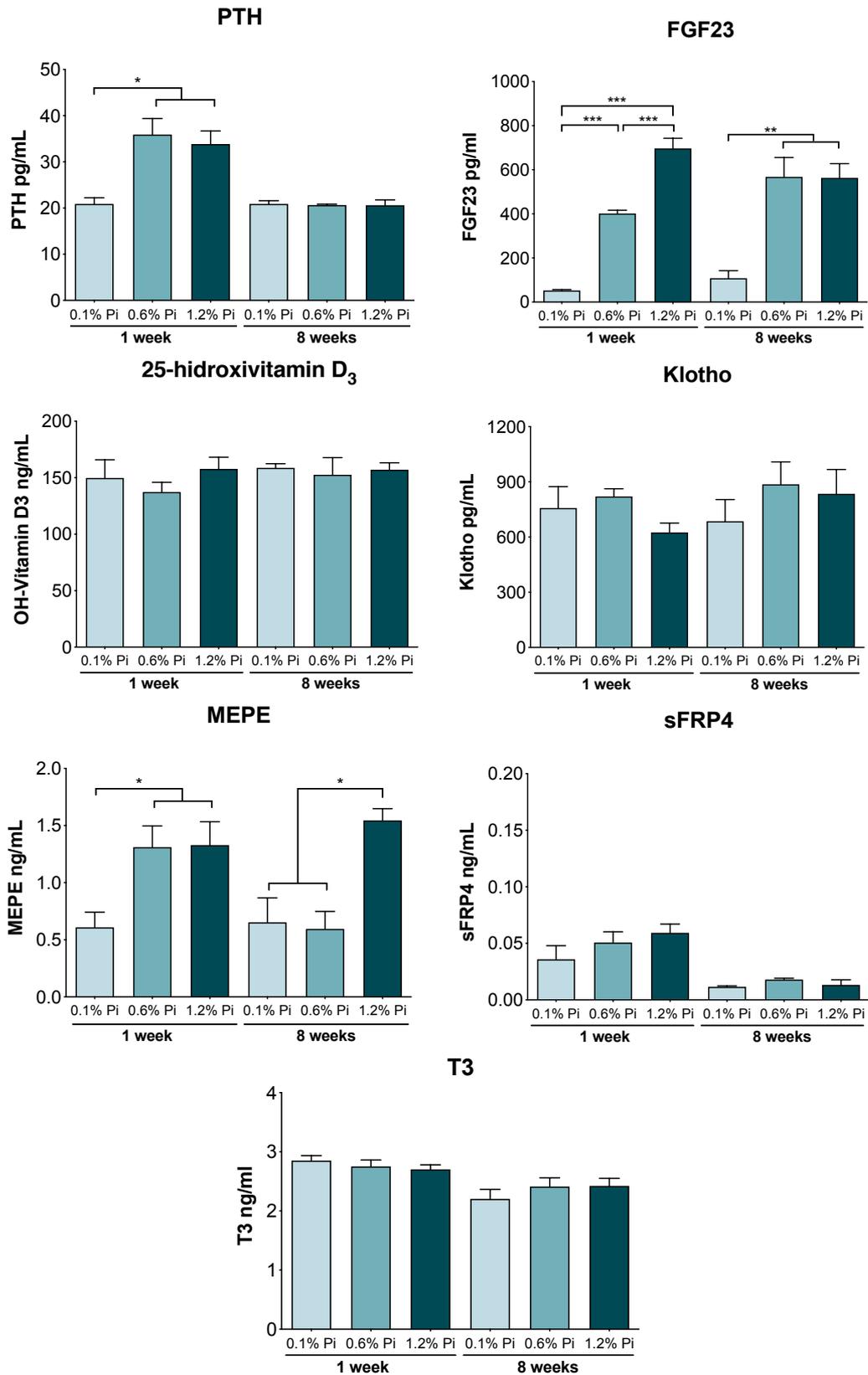


Figura R18: Concentración en plasma de diferentes hormonas fosfatúricas. Cuantificación mediante test ELISA de PTH, FGF-23, 25-hidroxivitamin D₃ (forma inactiva de la vitamina D₃, que se mantiene durante más tiempo estable en sangre), klotho, MEPE, sFRP4 y T3 en plasma. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.2.3. Expresión proteica de diferentes transportadores en BBMV de corteza renal

Los transportadores cuya expresión fue analizada *in vitro* mediante la línea celular OK, fueron evaluados *in vivo* en BBMV de corteza renal de las ratas que consumían los diferentes piensos durante 1 y 8 semanas, con el fin de comprobar si los cambios observados *in vitro* se reproducían *in vivo*.

En las ratas adaptadas a las diferentes dietas durante 1 semana los resultados fueron muy similares a los obtenidos en células OK-P, ya que cuando existe privación de Pi se observó el aumento en la expresión de NaPi-IIa y de NHE3, así como de su forma fosforilada en serina 552, forma inactiva de la proteína (Figura R19 A).

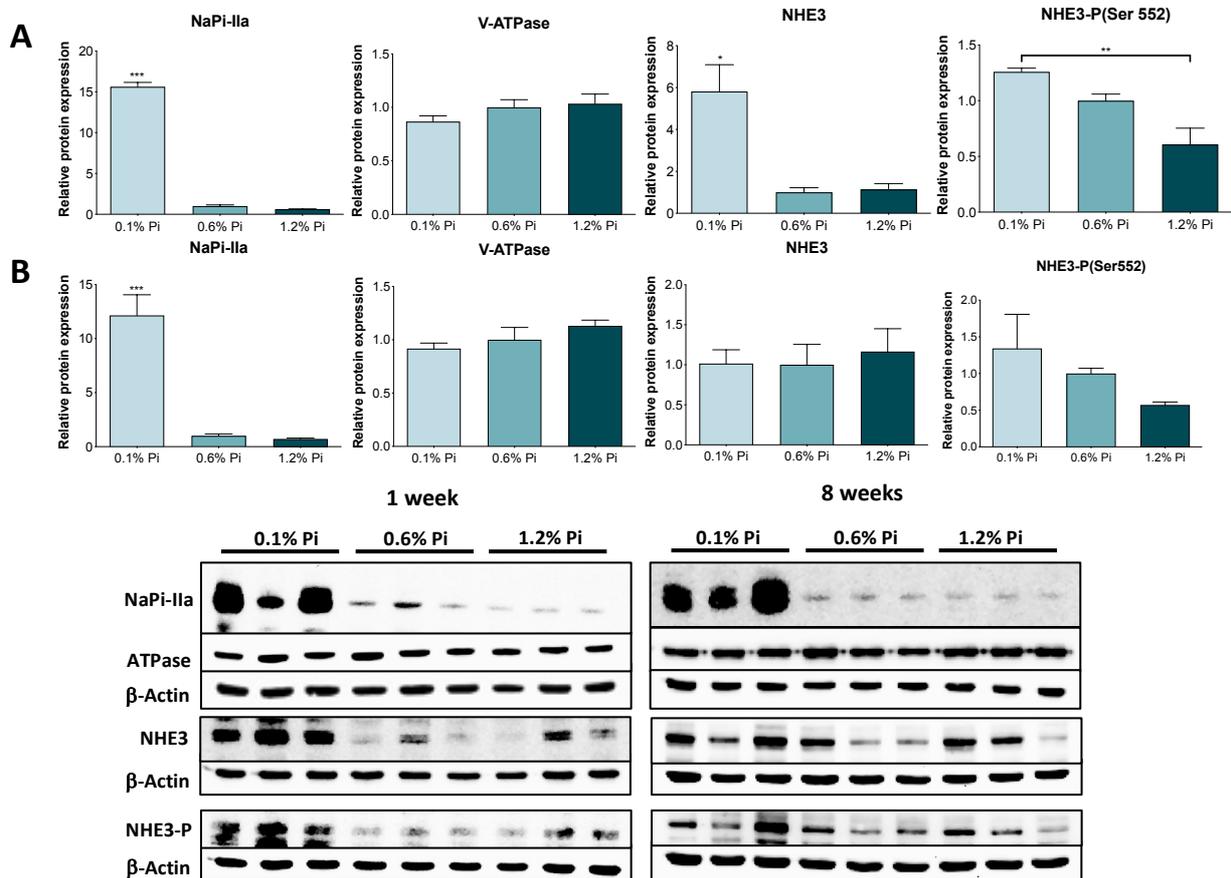


Figura R19: Expresión proteica de diferentes transportadores en BBMV de corteza renal. Western-Blot de NaPi-IIa, V-ATPasa, NHE3 y NHE3 fosforilado en la posición serina 552 (NHE3 P-Ser552) en BBMV de corteza renal de ratas adaptadas a 0,1%, 0,6% y 1,2% de Pi en el pienso durante 1 semana (A) versus 8 semanas (B). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Cuando las ratas son alimentadas con las mismas dietas, pero durante 8 semanas, las diferencias observadas en la expresión de NHE3 desaparecieron y únicamente se obtuvo el aumento de la expresión de NaPi-IIa (Figura R19 B). Además, se observó un aumento moderado en la expresión de NHE3 fosforilado en serina 552 en respuesta a una ingesta reducida de Pi (0,1% de Pi), pero dicha tendencia no llega a ser significativa. La expresión de la V-ATPasa tampoco se vio modificada en los diferentes grupos ni a 1 semana ni a 8 semanas (Figura R19 A y B).

2.2.4. Efecto de la privación de Pi sobre la estructura y densidad ósea

Con los valores obtenidos en la excreción renal de calcio y bicarbonato en orina de las ratas alimentadas con 0,1% de Pi y dado que la concentración de ambos parámetros no se ve alterada en sangre ni a 1 ni a 8 semanas, se planteó la posibilidad de que dichos componentes estuvieran siendo movilizados del hueso, provocando posibles alteraciones óseas. Por todo ello se procedió a realizar una microtomografía computerizada (microCT) 3D de rayos X de las tibias de las ratas alimentadas con 0,1%, 0,6% y 1,2% de Pi en el pienso durante 1 y 8 semanas, así como la cuantificación en orina de deoxipiridinolina (DPD), conocido marcador de la resorción ósea.

En primer lugar, se observó un aumento en los valores de DPD en orina en aquellas ratas alimentadas con 1,2% de Pi respecto a las ratas alimentadas con 0,1% de Pi durante 1 semana, ya que dicho aumento desaparece tras 8 semanas (Figura R20).

En cuanto a la microCT, el análisis del hueso trabecular en ratas alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso durante 1 semana, mostró un aumento en el porcentaje de hueso por región de interés (BV/TV), así como un aumento del número de trabéculas y de conexiones trabeculares, sin que se modificasen ni el grosor de las trabéculas ni la separación entre ellas (Figura R21 A y R22).

Sin embargo, no se encontraron variaciones en los parámetros analizados en el hueso cortical que incluían el grosor cortical, la porosidad y el diámetro de los poros corticales (Figura R21 B). En definitiva, se observó un ligero aumento en la formación de hueso trabecular y ninguna variación apreciable en el hueso cortical (Figura R22).

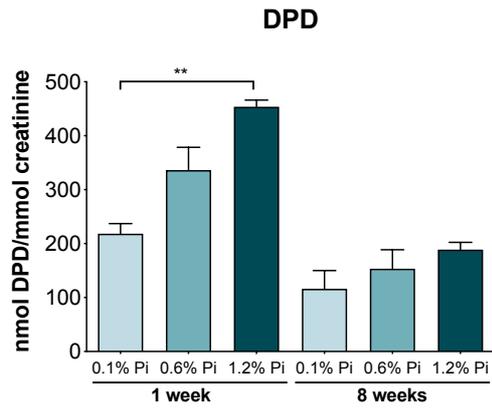


Figura R20: Cuantificación de deoxipiridinolina (DPD) en orina. Se cuantificó la concentración de DPD en orina y se corrigió respecto a los valores obtenidos de creatinina en orina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

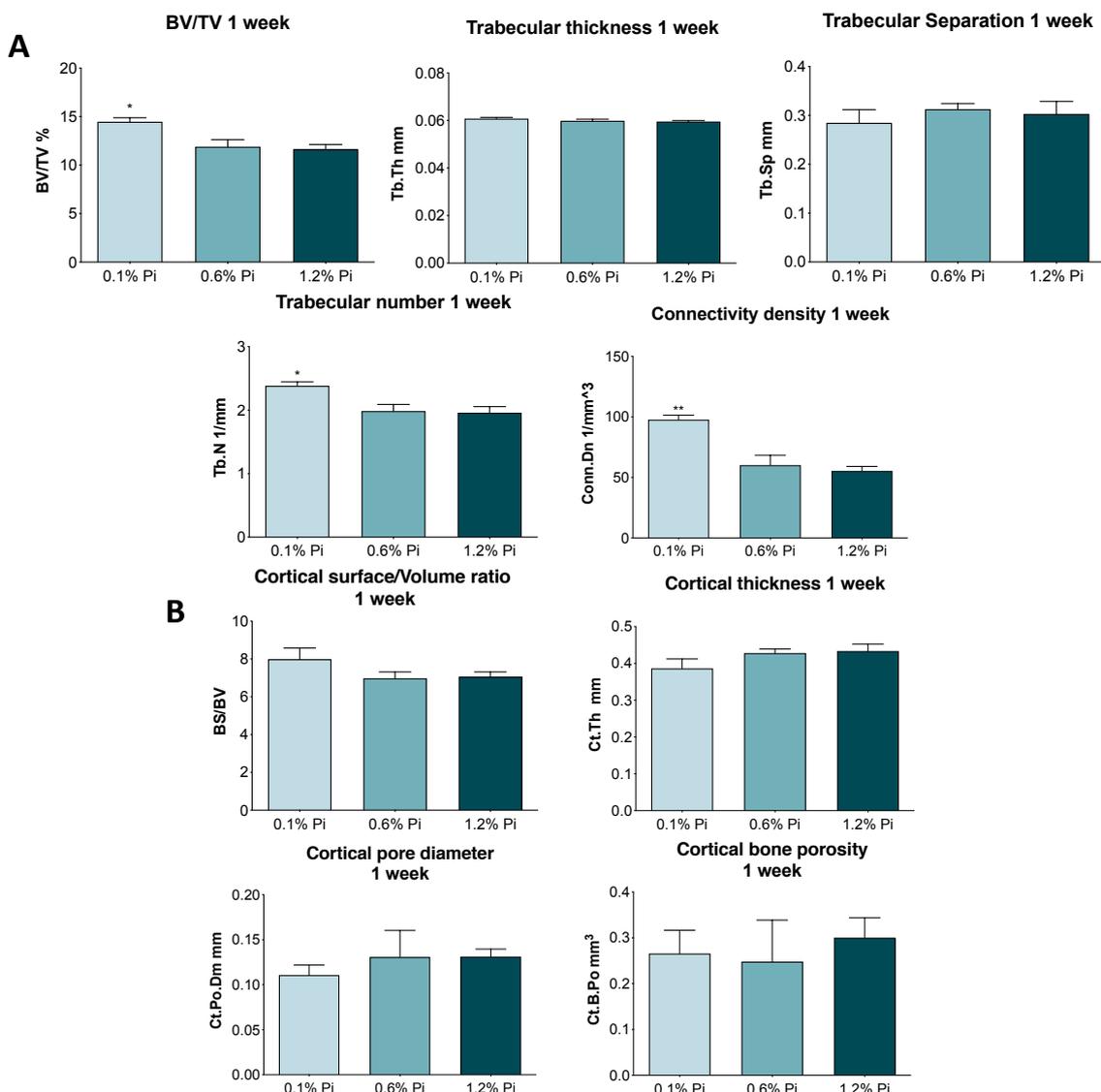


Figura R21: Cambios en la estructura del hueso trabecular y cortical. Análisis de diferentes parámetros estructurales del hueso trabecular (**A**) y cortical (**B**) mediante microCT en tibias de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de Pi durante 1 semana. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

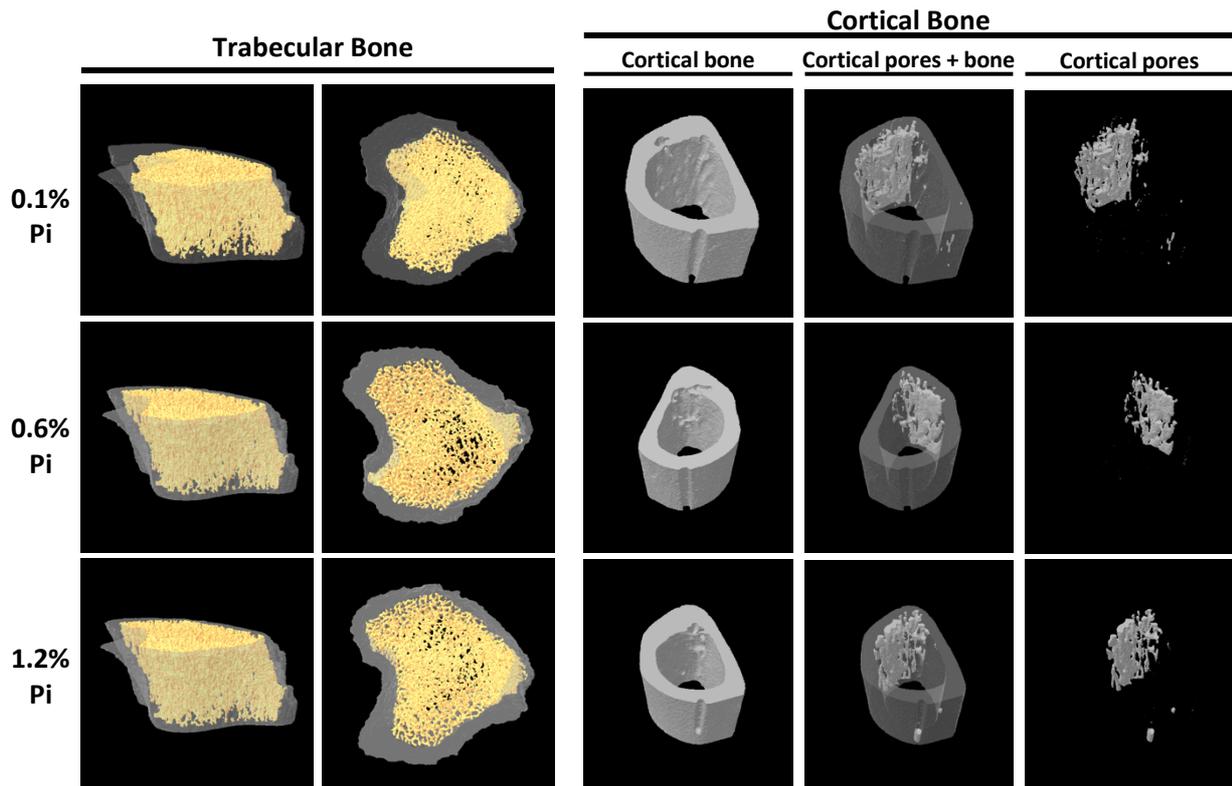


Figura R22: Modelos tridimensionales de la estructura ósea de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de Pi durante 1 semana. A la izquierda, el hueso trabecular representado en color amarillo, donde puede apreciarse el patrón trabecular (vista lateral y corte transversal). A la derecha, estructura del hueso cortical incluyendo los poros corticales.

Por otro lado, del análisis del hueso en su conjunto se extrajeron dos valores, la densidad mineral ósea (BMD) y la densidad mineral del tejido (TMD). Mientras que, la densidad mineral ósea aumentó en las ratas alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso, la densidad mineral del tejido no se vio modificada (Figura R23), lo cual se explica debido a que únicamente se observó aumento del hueso trabecular, el cual puede estar siendo obviado en la cuantificación de la densidad mineral del tejido que solo tiene en cuenta el tejido calcificado con una mayor densidad.

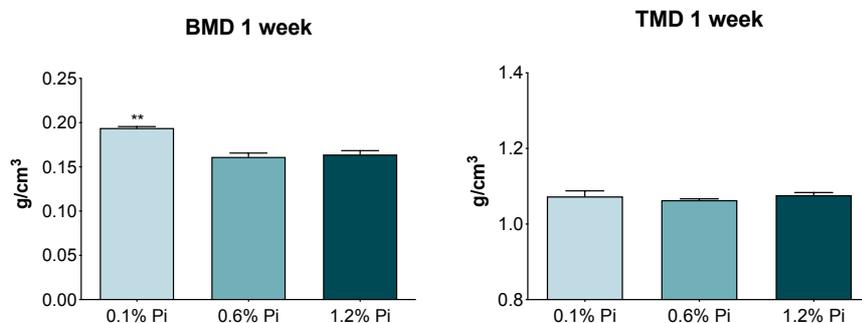


Figura R23: Efecto de la privación de Pi durante 1 semana sobre la densitometría ósea. Se muestran los parámetros de densidad mineral ósea (BMD) y densidad mineral del tejido (TMD) obtenidos mediante microCT en tibias. *p<0.05; **p<0.01.

A 8 semanas, se mantuvo el aumento del porcentaje de hueso trabecular y del número de trabéculas en privación de Pi (0,1% de Pi), pero además, aumentó el número de conexiones trabeculares y disminuyó la separación entre trabéculas (Figura R24 A). En cuanto al hueso cortical, se produjo un aumento en la relación entre la superficie cortical y el volumen del hueso cortical, así como una disminución del grosor del hueso cortical, que se traduce también en un ligero aumento de la porosidad cortical que no llega a ser estadísticamente significativa (Figura R24 B).

En conclusión, se observó un aumento del hueso trabecular y una disminución del hueso cortical que se aprecia en los modelos tridimensionales (Figura R25).

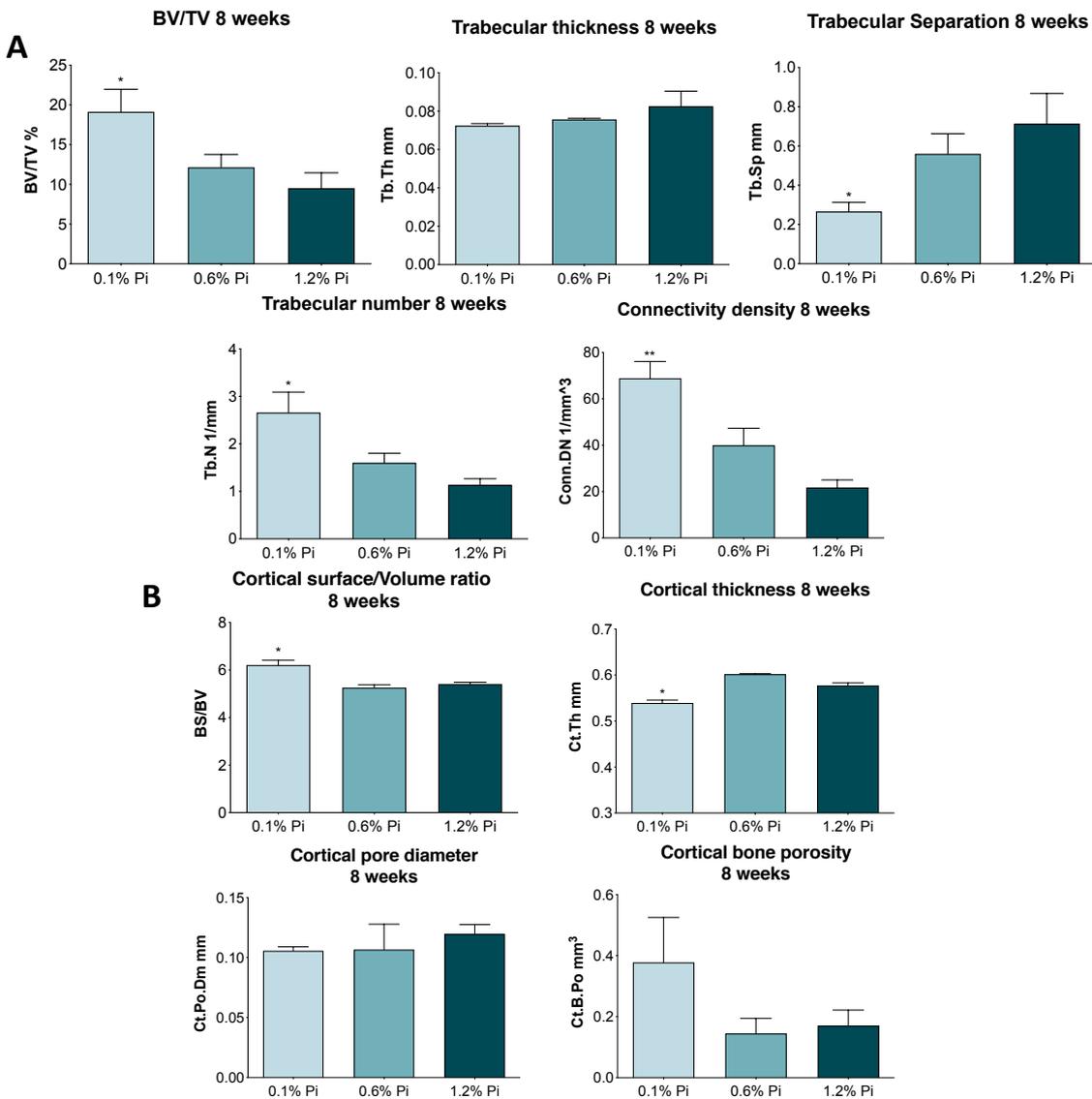


Figura R24: Cambios en la estructura del hueso trabecular y cortical. Análisis de diferentes parámetros estructurales del hueso trabecular (**A**) y cortical (**B**) mediante microCT en tibias de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de Pi durante 8 semanas. *p<0.05; **p<0.01.

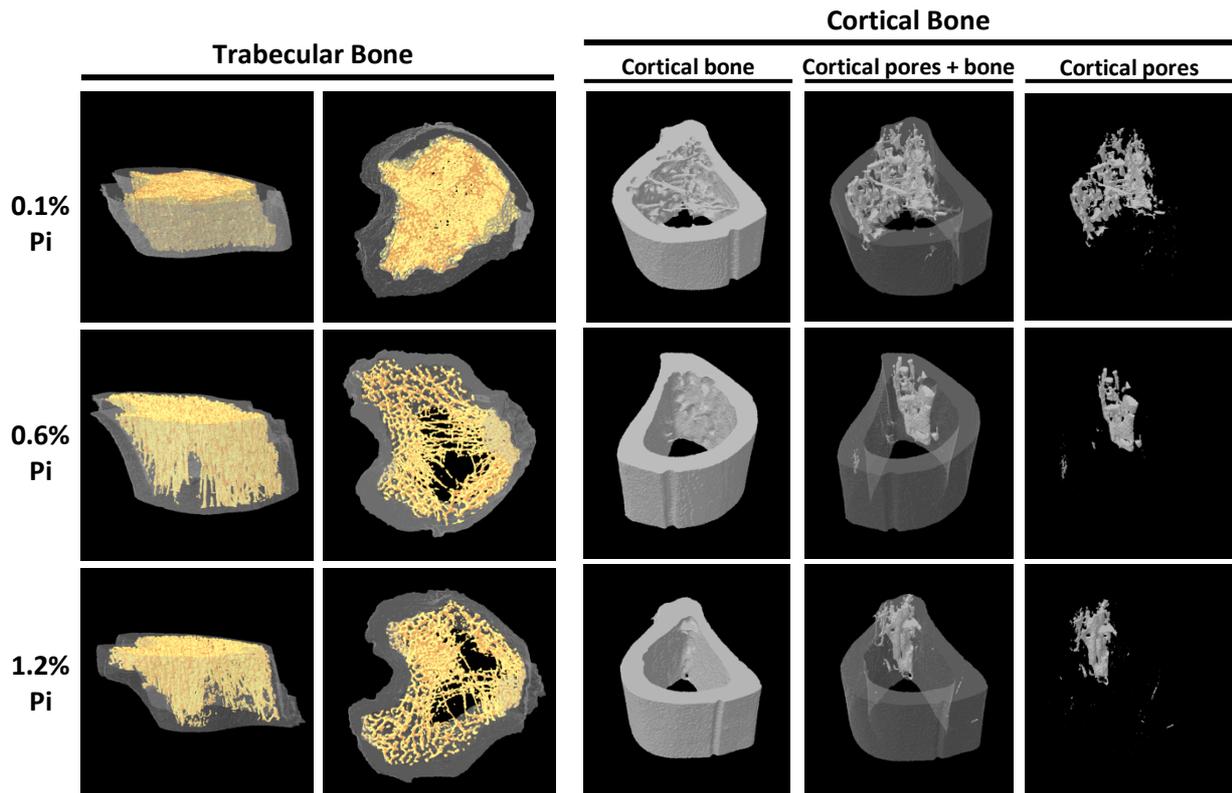


Figura R25: Modelos tridimensionales de la estructura ósea de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de Pi durante 8 semanas. A la izquierda, el hueso trabecular representado en color amarillo, donde puede apreciarse el patrón trabecular (vista lateral y corte transversal). A la derecha, estructura del hueso cortical incluyendo los poros corticales.

La BMD en las ratas alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi tras 8 semanas se mantuvo en valores superiores a las ratas alimentadas con mayores concentraciones de Pi en el pienso (Figura R26), lo cual se explica debido al aumento del hueso trabecular (Figura R24 A). Lo contrario sucede con los valores de TMD que disminuyeron en respuesta a la privación de Pi (Figura R26), en consecuencia, de la disminución del grosor del hueso cortical (Figura R24 B).

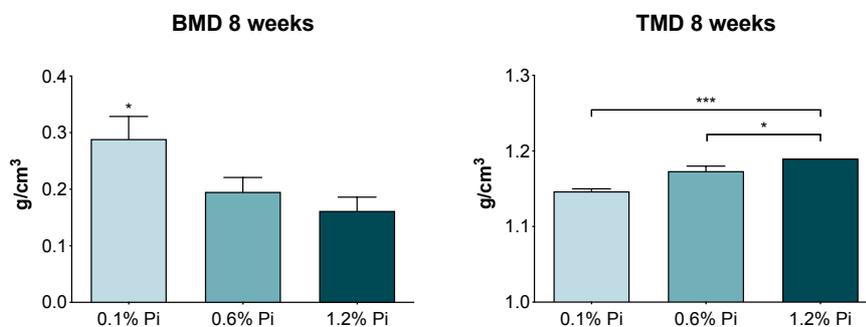


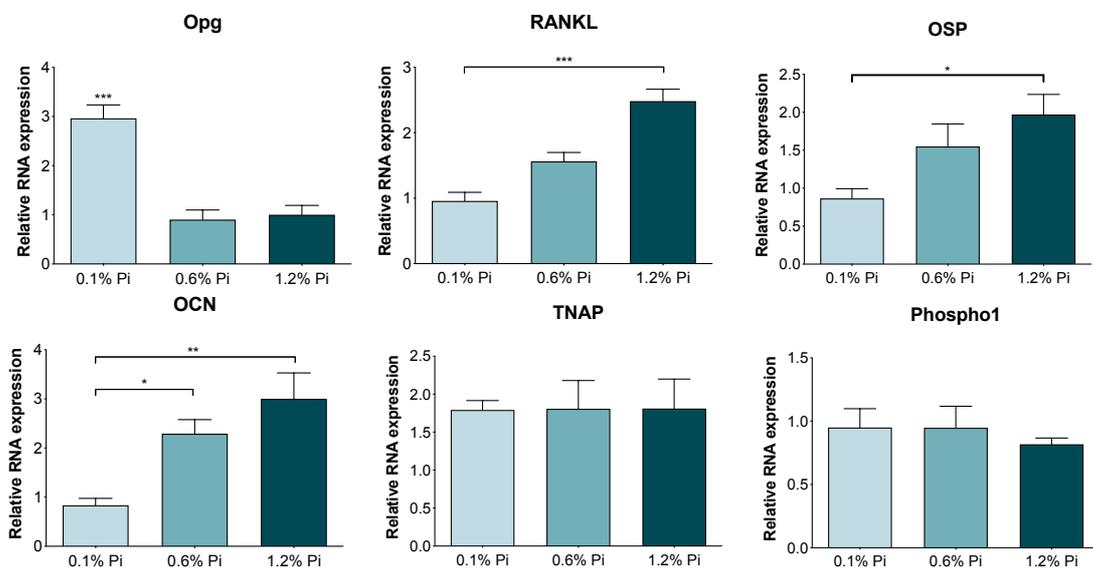
Figura R26: Efecto de la privación de Pi durante 8 semanas sobre la densitometría ósea. Se muestran los parámetros de densidad mineral ósea (BMD) y densidad mineral del tejido (TMD) obtenidos mediante microCT en tibia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.2.5. Análisis de la expresión de diferentes osteogenes

Tras los resultados obtenidos en el análisis estructural del hueso, se procedió a analizar la expresión de diferentes osteogenes cuya expresión pudiera estar modificada en las ratas con privación de Pi (0,1% de Pi) a 8 semanas, momento en el cual los cambios estructurales eran más notables.

Las ratas alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi mostraron un aumento en la expresión de RNA de osteoprotegerina y una disminución de RANKL (Figura R27), ambos factores secretados por osteoblastos e íntimamente relacionados, que presentan funciones contrapuestas. Además, se observaron cambios en la expresión de osteopontina y osteocalcina, en ambos casos se produjo una reducción en la expresión de las ratas alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso durante 8 semanas (Figura R27).

Sin embargo, no se obtuvieron variaciones en la expresión de otros factores entre los que se incluyen, TNAP (fosfatasa alcalina no específica de tejido), Phospho1, Runx2 y ActR2a (receptor de activina de tipo 2a), Acp5 (fosfatasa ácida resistente a tartratos tipo 5) y las catepsinas S y K (Figura R27).



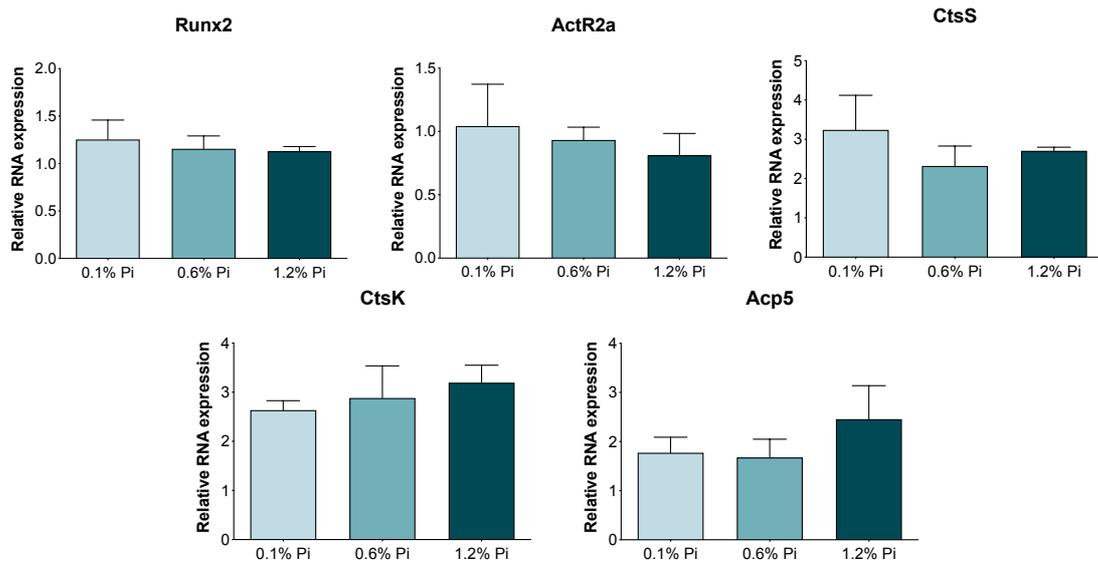


Figura R27: Cambios en la expresión de diferentes osteogénes en ratas con privación de Pi mediante PCR *real time*. Opg, osteoprotegerina; OSP, osteopontina; OCN, osteocalcina; TNAP, fosfatasa alcalina no específica de tejido; ActR2a, receptor de activina de tipo 2a; CtsS, cathepsina S; CtsK, cathepsina K; Acp5, fosfatasa ácida resistente a tartratos tipo 5. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Además, se cuantificó la expresión de diferentes factores relacionados con la ruta Wnt/ β -catenina (vía canónica), implicada en la formación ósea y activación de osteoblastos entre otras funciones.

La expresión de los receptores de tipo frizzled 1 y 2 y de sus co-receptores LRP5 y LRP6 necesarios para la activación de la ruta Wnt no se vio modificada, así como la expresión de β -catenina (Figura R28). Además, se analizó la expresión de esclerostina, Sfrp4, Wif1 (factor de inhibición de Wnt tipo 1), Dkk1, Dkk2 y Dkk3; todos ellos inhibidores de la ruta Wnt. Únicamente, Sfrp4 mostró un aumento en su expresión en las ratas alimentadas con 1,2% de Pi (Figura R28).

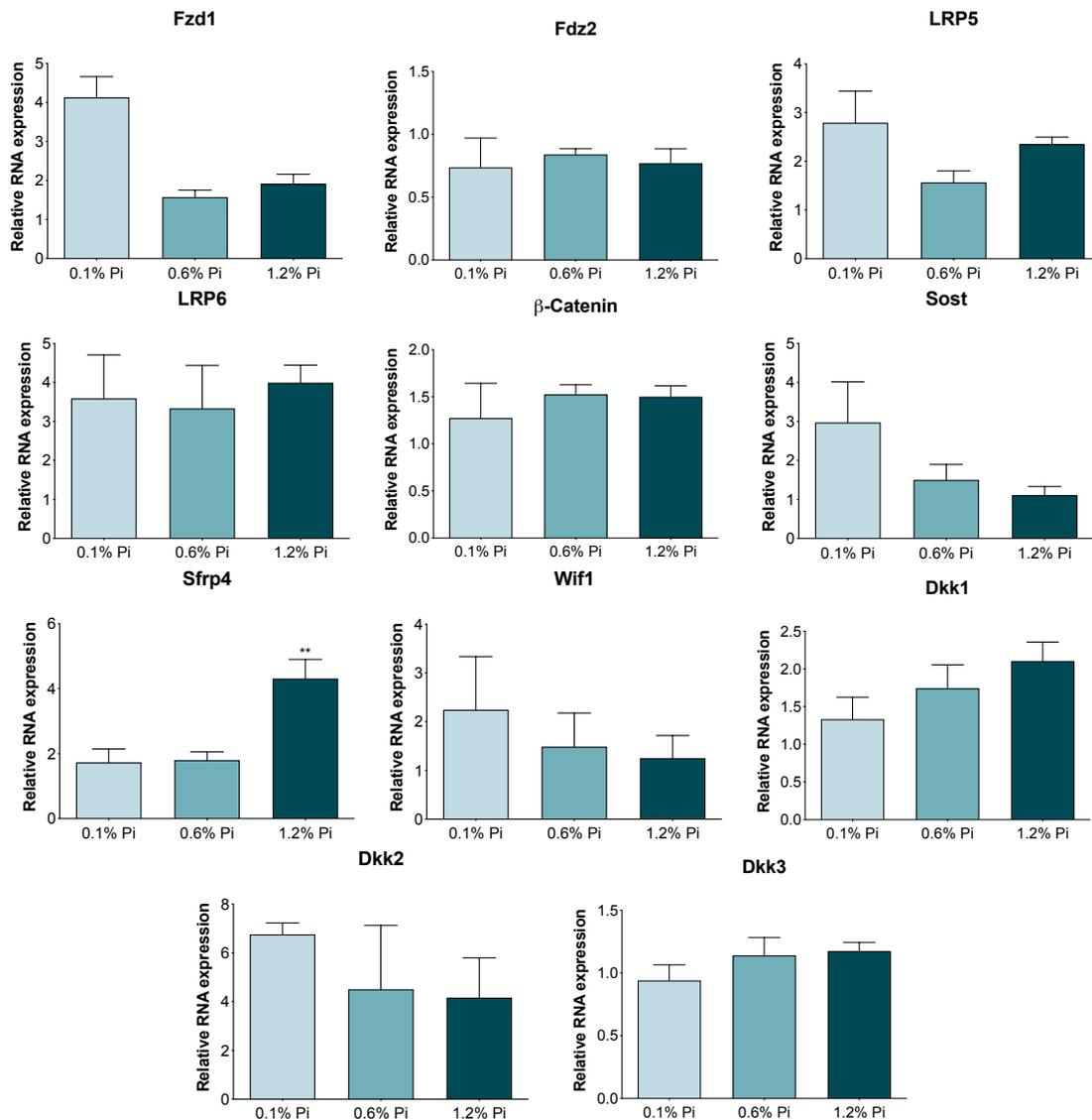


Figura R28: Cambios en la expresión de diferentes osteogénicos relacionados con la ruta Wnt en ratas con privación de Pi mediante PCR *real time*. Fzd1, receptor de tipo frizzled 1; Fzd2, receptor de tipo frizzled 2; Sost, esclerostina; Sfrp4, *secreted frizzled-related protein 4*; Wif1, factor de inhibición de Wnt tipo 1, Dkk1, *dickkopf-related protein 1*; Dkk2, *dickkopf-related protein 2*; Dkk3, *dickkopf-related protein 3*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

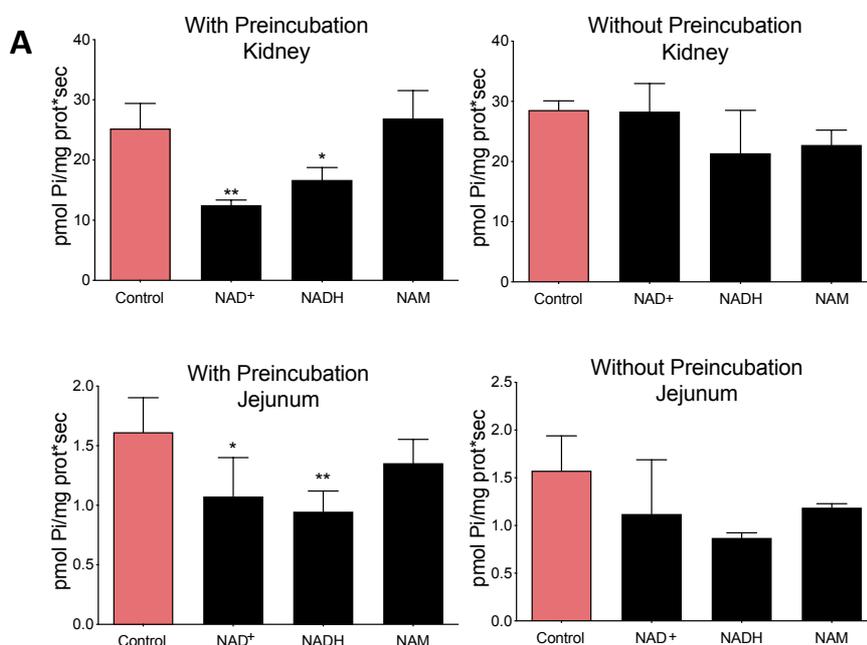
PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR NAD

3. 1. EFECTO DE NAD⁺, NADH Y NAM SOBRE EL TRANSPORTE DE FOSFATO EN BBMV

Con el fin de determinar las características de la inhibición producida por NAD se utilizaron BBMV de corteza renal y yeyuno de ratas adaptadas a una dieta estándar con una concentración de Pi de 0,6%.

En primer lugar, se evaluó la capacidad inhibitoria de tres compuestos: NAD⁺, NADH (la forma reducida de NAD) y NAM, precursor de ambos compuestos, en el transporte de Pi sodio-dependiente en diferentes circunstancias.

Únicamente se observó la inhibición con NAD⁺ y NADH en BBMV de corteza renal y yeyuno de rata cuando dichos compuestos fueron preincubados durante los 30 minutos previos al transporte con ³²P-Pi (Figura R29 A). Además, la inhibición se produjo tanto a temperatura ambiente como a 4°C (Figura R29 B).



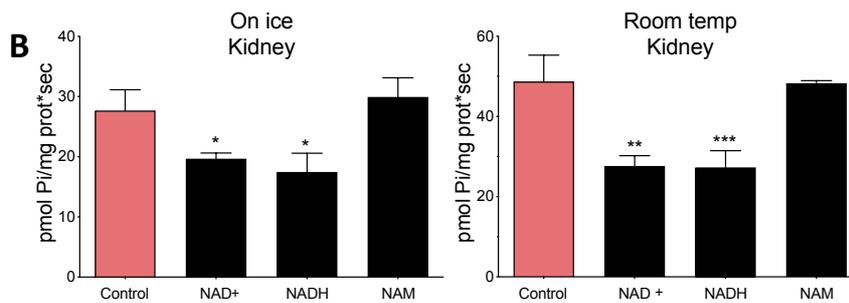


Figura R29: Resultado de la preincubación y la temperatura sobre el efecto de 0,5 mM de NAD⁺, NADH y NAM en BBMV de rata. **A.** Diferencia entre preincubación en hielo de 30 minutos respecto a no preincubar en BBMV de corteza renal (arriba) y yeyuno (abajo). **B.** Efecto de preincubar en hielo o a temperatura ambiente en BBMV de corteza renal. *p<0.05; **p<0.01.

Para determinar si el efecto sobre el transporte de Pi es específico, se realizó un transporte con D-glucopiranosido, en el cual no se observó el efecto inhibitorio de NAD⁺ y NADH (Figura R30). Aunque, sí se observa un descenso de un tercio del transporte de D-glucopiranosido cuando las vesículas son preincubadas con NAM.

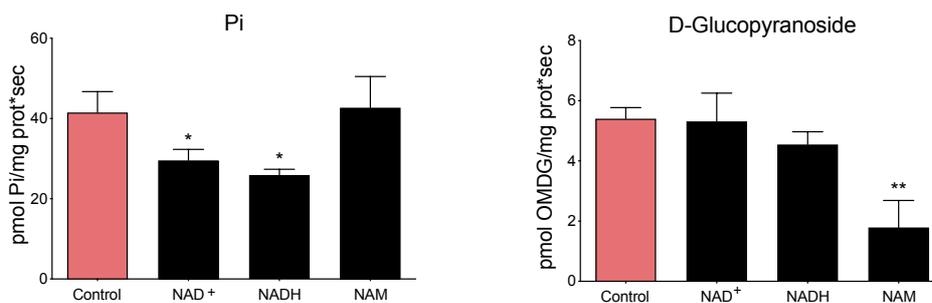


Figura R30: Especificidad del efecto inhibitorio de NAD⁺ y NADH sobre el transporte de Pi en BBMV de corteza renal. *p<0.05; **p<0.01.

3. 2. ANÁLISIS CINÉTICO DE LA INHIBICION SODIO-DEPENDIENTE DE FOSFATO POR PARTE DE NAD⁺ Y NADH EN BBMV

Se llevaron a cabo estudios de dosis-respuesta con NAD⁺ y NADH en BBMV de corteza renal y yeyuno para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) con una concentración fija de sustrato de 50 μM Pi y concentraciones crecientes del inhibidor. Ambas cinéticas se llevaron a cabo en presencia de sodio.

Se obtuvo la clásica curva de inhibición dosis-respuesta, en la cual se produjo una marcada caída del transporte de Pi con un pequeño intervalo de concentraciones de NAD⁺ y NADH. Las IC₅₀ fueron calculadas mediante regresión no lineal a través de una ecuación dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable, obteniendo valores en el

rango micromolar tanto para NAD^+ como para NADH , siendo inferiores en BBMV de yeyuno (Figura R31).

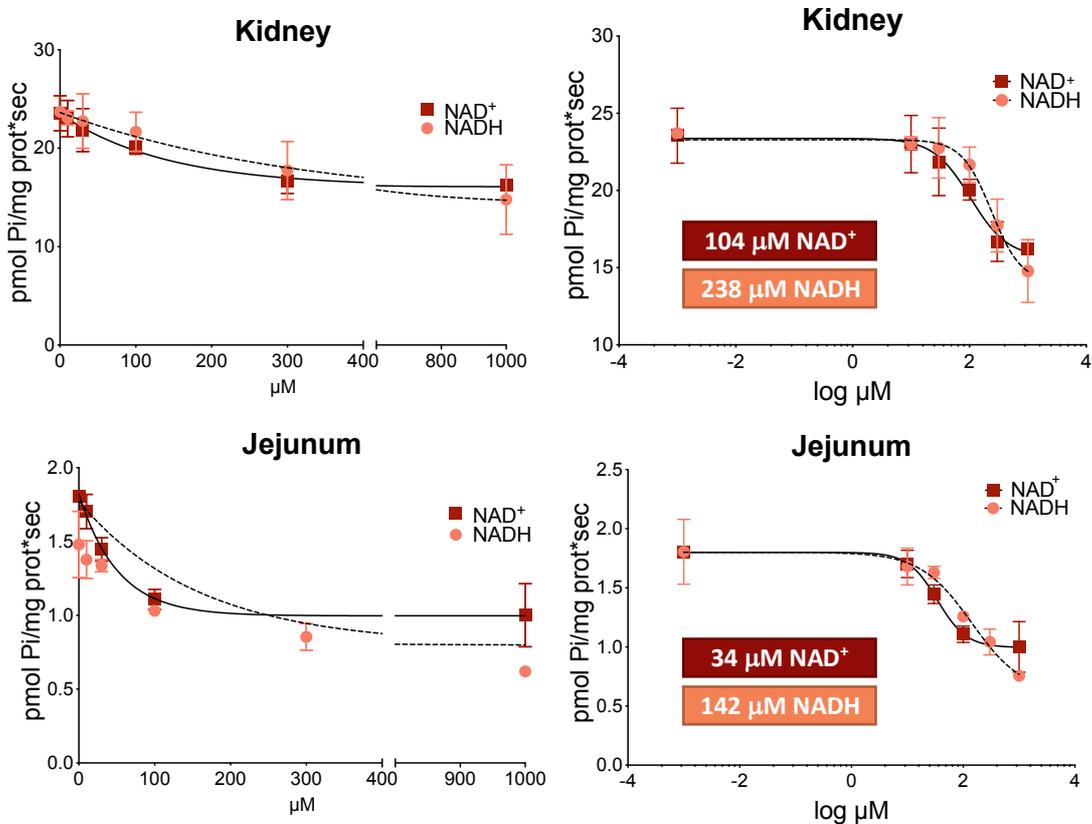


Figura R31: Curva dosis-respuesta para NAD^+ y NADH en BBMV de corteza renal (arriba) y yeyuno (abajo). La determinación de los valores de IC_{50} se realizó mediante regresión no lineal usando una ecuación dosis-respuesta sigmoidea tras la transformación en logaritmo de las concentraciones de NAD^+/NADH en abscisas.

A continuación, se procedió al cálculo de la constante de inhibición (K_i) y la determinación del mecanismo de inhibición a través de diferentes curvas de saturación de Michaelis-Menten con distintas concentraciones de NAD^+ en BBMV de corteza renal de rata, como se ha explicado en Métodos.

Se realizaron 4 curvas de saturación de P_i , cada una con una concentración de inhibidor (0, 30, 100 y 300 μM de NAD^+). El ajuste individualizado mediante regresión no lineal mostró el aumento de la K_m con el incremento de la concentración de NAD^+ en cada curva, mientras que la V_{max} permaneció relativamente constante. Los cambios aparentes en la afinidad por el sustrato (P_i) permiten corroborar el modelo competitivo de inhibición (Figura R32 A). Usando dicho modelo competitivo se obtuvo una K_i de 538 μM NAD^+ en BBMV de corteza renal.

Adicionalmente, se realizó un ajuste por regresión lineal mediante el método Lineweaver-Burk (Figura R32 B), donde también pudo apreciarse el cambio en la afinidad por el sustrato cuando se modificó la concentración de inhibidor. El valor en el cual la recta corta la línea de abscisas representa $1/K_m$ y como puede observarse la K_m aumentó con el incremento de la concentración de NAD^+ . Este ajuste sirve para ilustrar el modelo, en ningún caso para el cálculo preciso de la constante de inhibición.

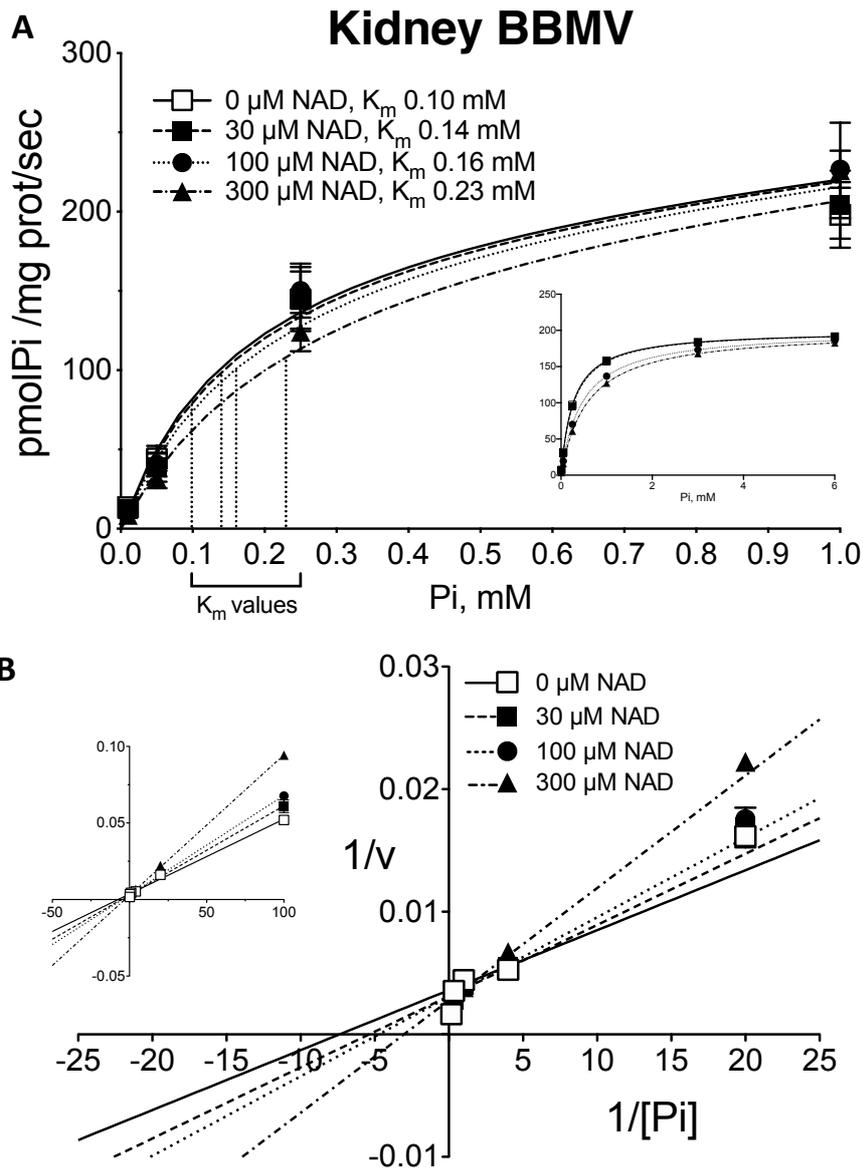


Figura R32: Análisis cinético de la inhibición de NAD^+ sobre el transporte de Pi en BBMVs de corteza renal. **A.** Regresión no lineal de las curvas de saturación tras ajustar mediante la ecuación de Michaelis-Menten con un componente no saturable. En la leyenda se incluyen los valores de K_m para cada una de las curvas. La figura principal muestra el gráfico en detalle hasta 1 mM de Pi. En la miniatura se muestra la curva teórica tras la eliminación del componente no saturable, en el rango completo de concentración de Pi hasta 6 mM **B.** Ajuste por regresión lineal mediante el método Lineweaver-Burk. El gráfico completo se muestra en la miniatura, mientras que en la figura principal se muestra en detalle.

3. 3. EFECTO DE NAD⁺, NADH Y NAM SOBRE COTRANSPORTADORES Na/Pi EXPRESADOS EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Con el fin de averiguar si NAD⁺ y NADH inhiben de forma directa los transportadores de Pi de la familia Slc34 y Slc20, se procedió a expresar dichos transportadores en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante nanoinyección de los correspondientes cRNAs.

Los ovocitos fueron preincubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y con 0,5 mM de NAD⁺, NADH y NAM, para posteriormente realizar el transporte durante 1 hora con medio de transporte con ³²P y manteniendo las mismas concentraciones de los inhibidores. Ninguno de los transportadores expresados (NaPi-IIa, NaPi-IIb, NaPi-IIc, Pit-1 y Pit-2) fue inhibido por los compuestos utilizados (Figura R33).

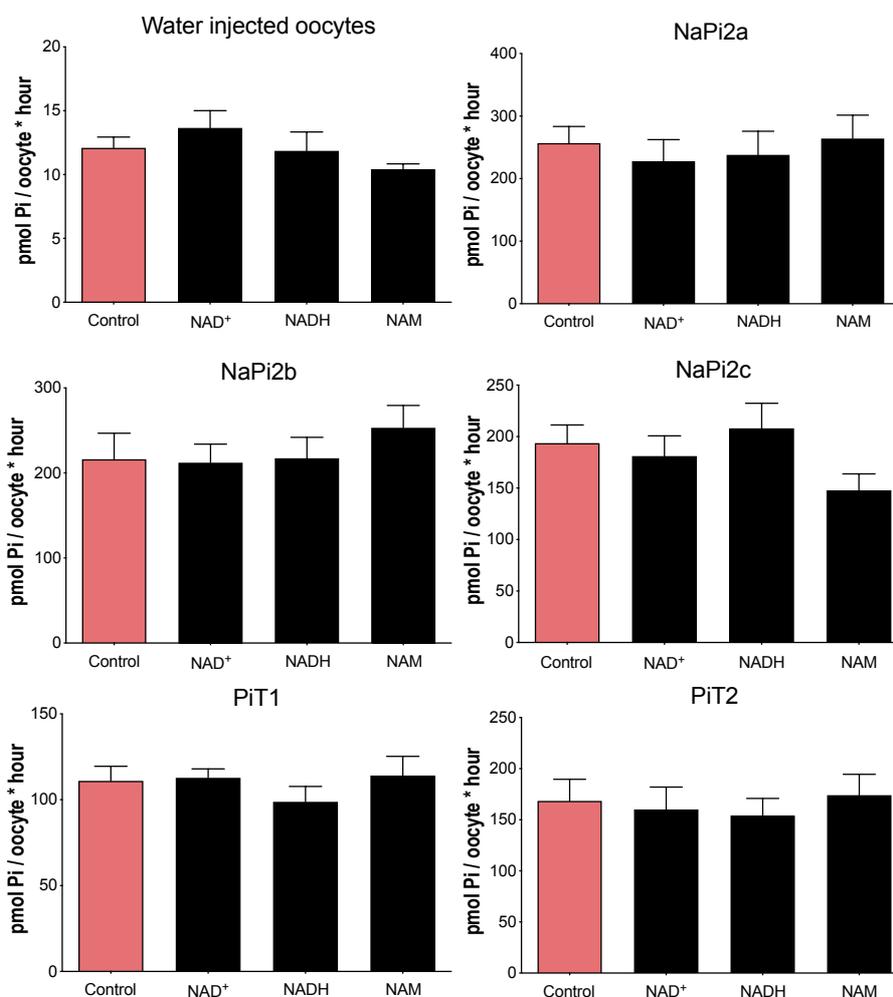


Figura R33: Efecto de NAD⁺, NADH y NAM sobre los cotransportadores Na/Pi pertenecientes a la familia Slc34 y Slc20 expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos fueron inyectados con 5 ng de cRNA de cada uno de los transportadores y tras 3 días se realizó el transporte con ³²P-Pi durante 1 hora en presencia de 0,5 mM de NAD⁺, NADH y NAM. Mismas concentraciones utilizadas en los 30 minutos de preincubación previos al transporte.

3. 4. ANÁLISIS DE LA RIBOSILACIÓN DE NaPi-IIA Y NaPi-IIB COMO POSIBLE MECANISMO DE INHIBICIÓN

Con el fin de comprobar si la inhibición del transporte de Pi mediada por NAD⁺ supone la ribosilación de los cotransportadores sodio dependientes NaPi-IIa y NaPi-IIb, se realizó un estudio de ribosilación con NAD marcado con ³²P en BBMV de corteza renal y yeyuno.

Las membranas y los geles desecados revelaron la existencia de proteína ribosilada en el homogenado total, pero no se encontraron señales de ³²P en el inmunoprecipitado de NaPi-IIa y NaPi-IIb, ni siquiera tras 1 mes de exposición a las películas, lo que excluiría la posibilidad de la ADP-ribosilación (Figura R34 A). La presencia de NaPi-IIa y NaPi-IIb en el inmunoprecipitado fue confirmada mediante Western-Blot de las membranas tras la exposición (Figura R34 B).

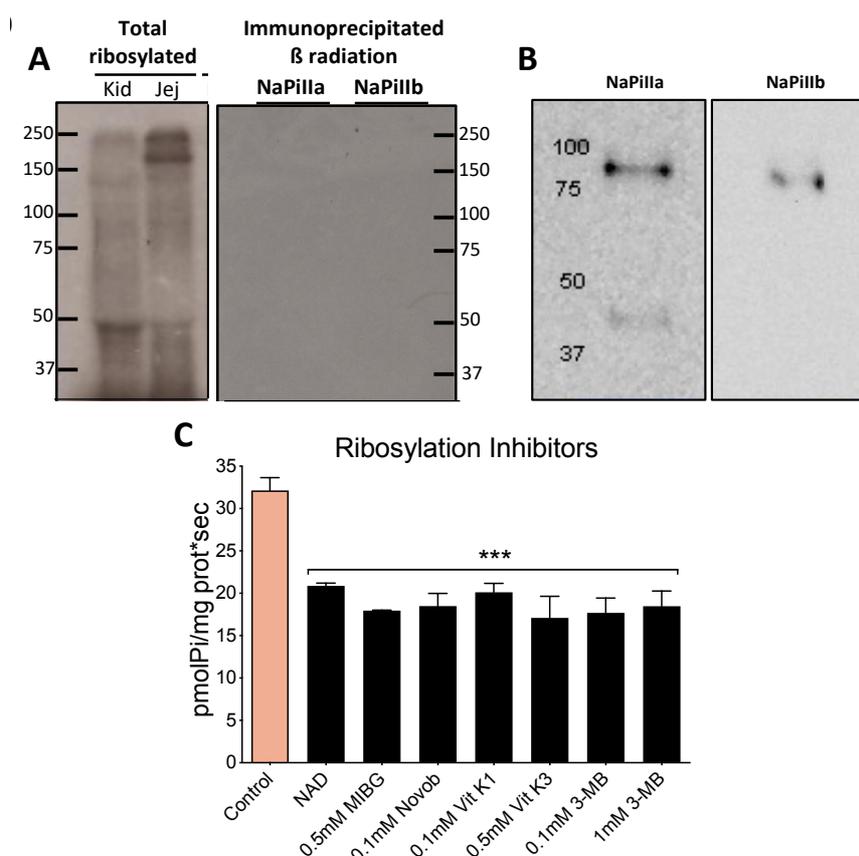


Figura R34: Análisis de la ribosilación en BBMV de corteza renal y yeyuno de rata. **A.** Proteína total ribosilada (izquierda) e inmunoprecipitado de NaPi-IIa y NaPi-IIb (derecha) en película de rayos X expuestas durante 15 días. **B.** Western-Blot de NaPi-IIa y NaPi-IIb del inmunoprecipitado tras la exposición de las membranas durante un mes. **C.** Uso de diferentes inhibidores de la ribosilación en presencia de 50 μM de NAD⁺ en BBMV de corteza renal de rata. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Con el fin de excluir completamente la ribosilación como mecanismo inhibitorio, ya que ésta podría ocurrir no en los transportadores de Pi, sino en proteínas asociadas, se utilizaron a continuación, varios inhibidores de las ADP-ribosiltransferasas (ART): 3-metoxibenzamida, metayodobencilguanidina (MIBG), bisulfito sódico de menadiona (vitamina K3), novobiocina (Novob) y vitamina K₁. Las concentraciones utilizadas fueron las indicadas en la Figura R34 C, tanto en el medio de transporte, como en la preincubación de las vesículas con NAD⁺. Como puede observarse en dicha Figura R34 C, ninguno de los inhibidores de las ART fue capaz de evitar el efecto inhibitorio de NAD⁺ sobre el transporte de Pi.

3. 5. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO EN LA DIETA EN LA CONCENTRACION DE NAD EN RIÑÓN E INTESTINO

Para finalizar, se decidió comprobar si los valores de NAD⁺/NADH presentan variaciones en corteza renal y yeyuno *in vivo*. Para ello se usaron los tejidos de ratas de la primera parte del estudio de adaptaciones agudas, en el cual los animales fueron adaptados a dietas con diferentes concentraciones de Pi (Figura M1).

La concentración de NAD total (NAD⁺/NADH) en corteza renal varió únicamente en las ratas con alimentación restringida a 4 horas, observándose una reducción del 50% en las ratas alimentadas con el pienso de 0,1% de Pi respecto al 1,2% de Pi. En cambio, en mucosa intestinal no se observaron variaciones en la concentración de NAD total (Figura R35).

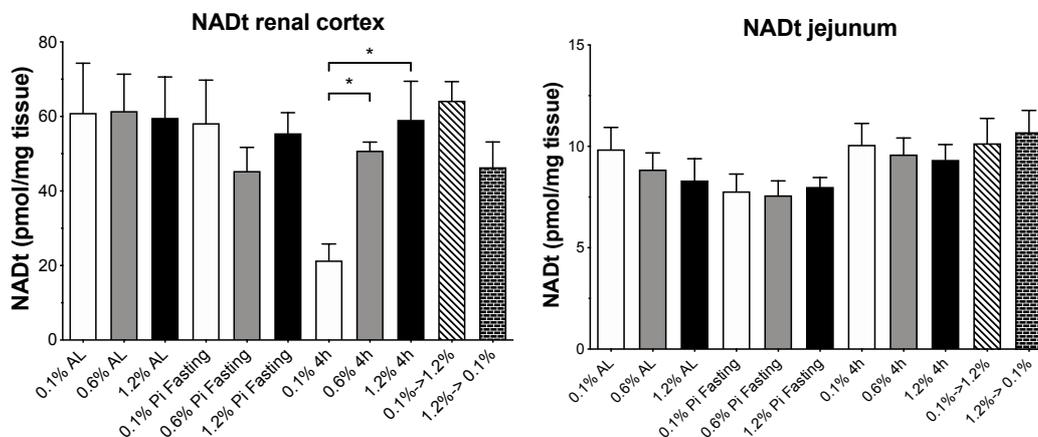


Figura R35: Concentración de NAD total (NAD⁺/NADH) en corteza renal (izquierda) y yeyuno (derecha). *p<0.05.

PARTE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR FUROSEMIDA

4. 1. EFECTO DE FUROSEMIDA SOBRE COTRANSPORTADORES Na/Pi EXPRESADOS EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Se decidió usar una concentración fija de furosemida (5 mM) en la solución de transporte para ver si era capaz de inhibir el transporte de Pi en los ovocitos que expresaban los diferentes transportadores conocidos de fosfato sodio dependientes pertenecientes a la familia Slc34 y Slc20. Como puede observarse en la Figura R36, la furosemida inhibió el transporte de Pi en los ovocitos que expresaban los transportadores de la familia Slc34 (NaPi-IIa, NaPi-IIb y NaPi-IIc), mientras que no se observó ninguna variación en los ovocitos que expresaban Pit-1 y Pit-2, así como en aquellos ovocitos inyectados con agua. Tanto en NaPi-IIa como en NaPi-IIb supuso una reducción de entre el 78 y el 80% en la acumulación de Pi en el interior del ovocito y de hasta el 50% en NaPi-IIc.

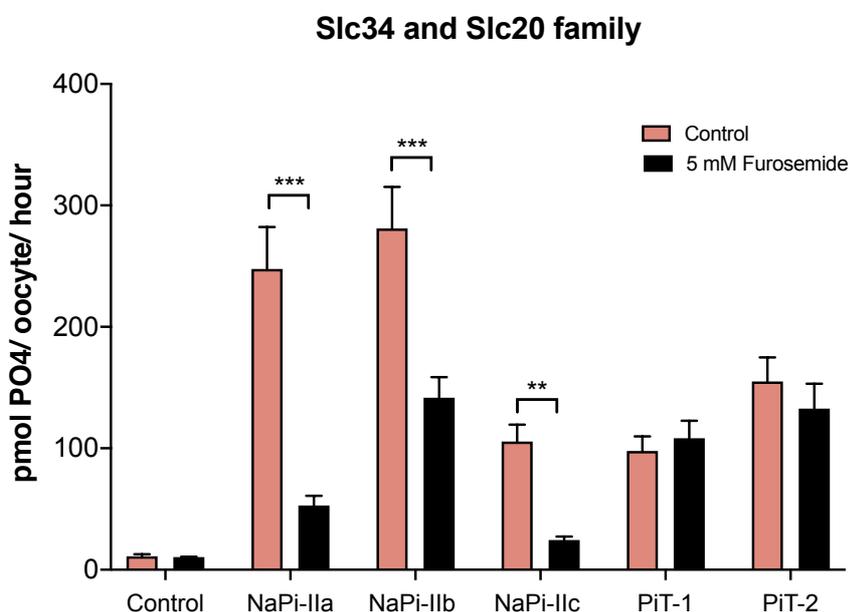


Figura R36: Efecto de furosemida sobre los cotransportadores Na/Pi pertenecientes a la familia Slc34 y Slc20 expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos fueron inyectados con 5 ng de cRNA de cada uno de los transportadores y tras 3 días se realizó el transporte con ^{32}P -Pi durante 1 hora en presencia de 5 mM de furosemida en el medio de transporte. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) se llevaron a cabo estudios de dosis-respuesta de furosemida con una concentración fija de sustrato de 50 μM Pi y

concentraciones crecientes del inhibidor para cada uno de los transportadores en los cuales se observó inhibición (NaPi-IIa, NaPi-IIb y NaPi-IIc).

Se obtuvieron curvas de inhibición dosis-respuesta, en las cuales se produjo una marcada caída del transporte de Pi con un pequeño intervalo de concentraciones de furosemida (Figura R37). Las IC₅₀ fueron calculadas mediante regresión no lineal a través de una ecuación dosis-respuesta con pendiente variable. Los valores para IC₅₀ obtenidos fueron de 4,15 mM en NaPi-IIa, 6,21 mM en NaPi-IIb y 3,92 mM en NaPi-IIc.

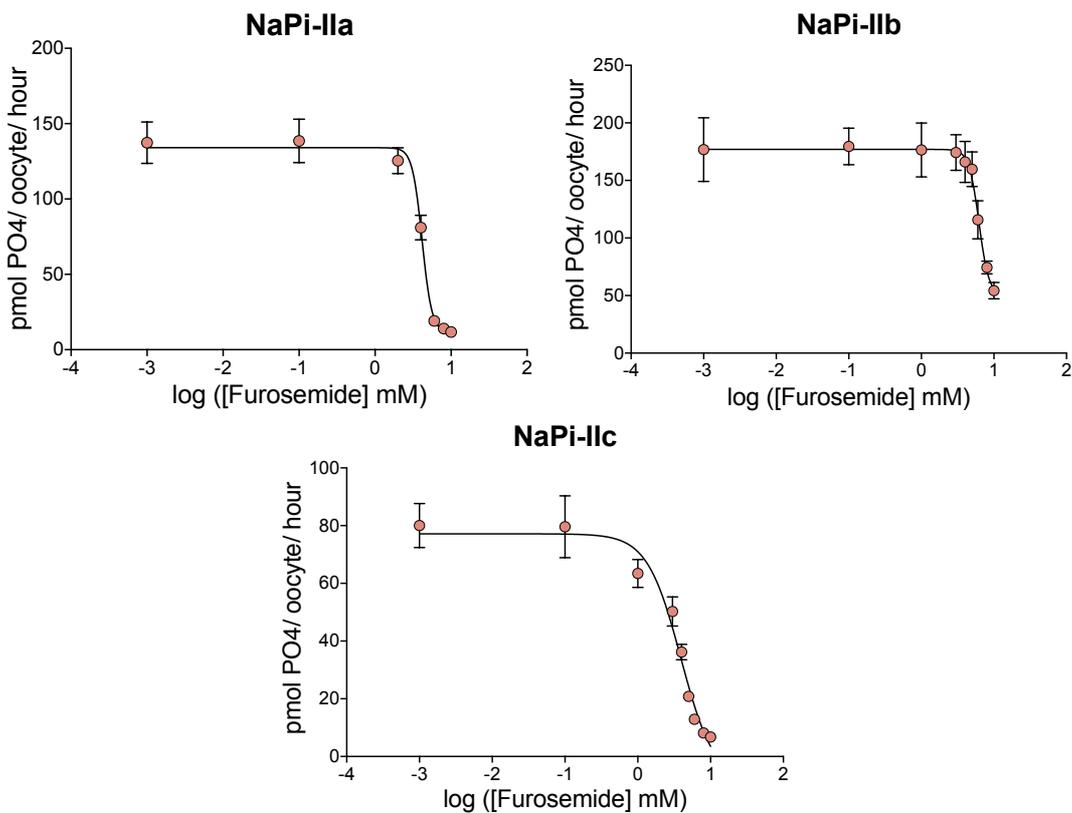


Figura R37: Curva dosis-respuesta para furosemida en NaPi-IIa, NaPi-IIb y NaPi-IIc expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos fueron inyectados con 5 ng de cRNA de cada uno de los transportadores y tras 3 días se realizó el transporte con ³²P-Pi durante 1 hora. La determinación de los valores de IC₅₀ se realizó mediante regresión no lineal usando una ecuación dosis-respuesta tras la transformación en logaritmo de las concentraciones de furosemida en abscisas.

A continuación, se procedió a la determinación del mecanismo de inhibición y al cálculo de la constante de inhibición (K_i) de NaPi-IIa, a través de diferentes curvas de saturación de Michaelis-Menten con distintas concentraciones de furosemida, en ovocitos.

Se realizaron 4 curvas de saturación de Pi, cada una con una concentración de inhibidor presente en el medio de transporte (0, 3, 5 y 8 mM de furosemida). El ajuste

individualizado mediante regresión no lineal mostró el aumento de la K_m con el incremento de la concentración de furosemida en cada curva, mientras que la V_{max} permaneció relativamente constante. Por lo tanto, los cambios aparentes en la afinidad por el sustrato (Pi) permiten corroborar el modelo competitivo de inhibición (Figura R38). A través del ajuste global mediante dicho modelo competitivo se obtuvo una K_i de 1,075 mM de furosemida en el transporte de Pi de NaPi-IIa.

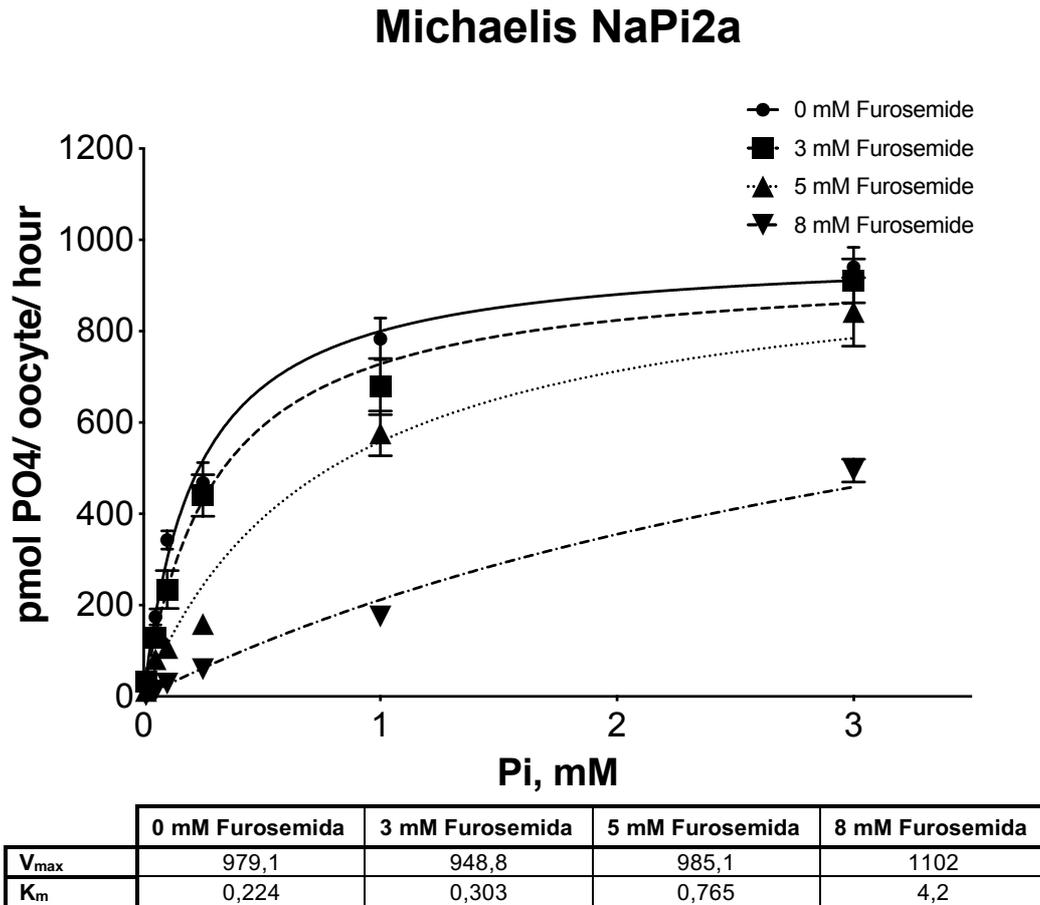


Figura R38: Análisis cinético de la inhibición de furosemida sobre el transporte de Pi para NaPi-IIa. Regresión no lineal de las curvas de saturación tras ajustar mediante la ecuación de Michaelis-Menten.

4. 2. EFECTO DE FUROSEMIDA SOBRE DEL TRANSPORTE DE FOSFATO SODIO-DEPENDIENTE EN CÉLULAS OK

Con el fin de confirmar que la inhibición observada en el transporte de Pi en ovocitos que expresaban los diferentes transportadores Na/Pi de tipo II, se reproducía en las células OK, se realizó la medición del transporte de Pi en presencia de diferentes concentraciones de furosemida.

Con una concentración de 4 mM de furosemida se observó disminución en el transporte de Pi por parte de las células OK (Figura R39). Esa inhibición en el transporte de Pi aumentó con el incremento de la concentración de furosemida a 6 mM y 10 mM, aunque entre ambas concentraciones no se observaron diferencias. Esta situación puede deberse a que se habría alcanzado el máximo efecto ya con la concentración de 6 mM de furosemida.

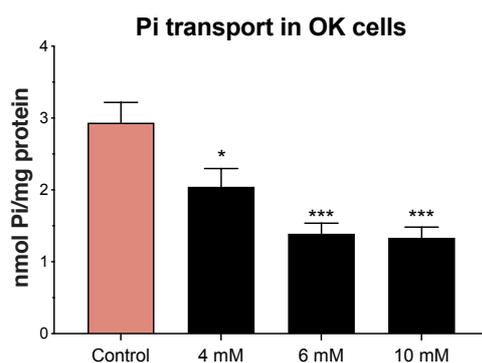


Figura R39: Efecto de furosemida sobre el transporte de Pi en células OK. El medio de transporte contenía las concentraciones indicadas de furosemida. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. 3. EFECTO DE FUROSEMIDA EN RATAS

Finalmente, con el fin de determinar si el efecto inhibitorio sobre el transporte de Pi observado *in vitro* se reproduce *in vivo*, se realizó un estudio con ratas tratadas con furosemida en las cuales se cuantificó el consumo de pienso y la concentración de Pi en heces y orina. La furosemida fue administrada en el pienso a una concentración de 0,5 mg/g de pienso y se tradujo en una dosis promedio de 27 mg/kg. Las ratas fueron mantenidas durante 48 horas en las jaulas metabólicas y se recogieron tanto la orina como las heces cada 24 horas.

El consumo de pienso y en consecuencia la cantidad ingerida de Pi durante las 48 horas del experimento fue similar en ambos grupos y tampoco se observaron diferencias en el Pi fecal analizado en las segundas 24 horas (Figura R40 A y B). Sin embargo, se observaron diferencias en la excreción de Pi en orina (Figura R40 C), ya que aumentó en las ratas tratadas con furosemida. Además, se realizó la medición del pH en la orina sin obtener diferencias entre grupos y se cuantificó el volumen total de orina excretado, en el cual pudo observarse el efecto diurético de la furosemida (Figura R40 D y E).

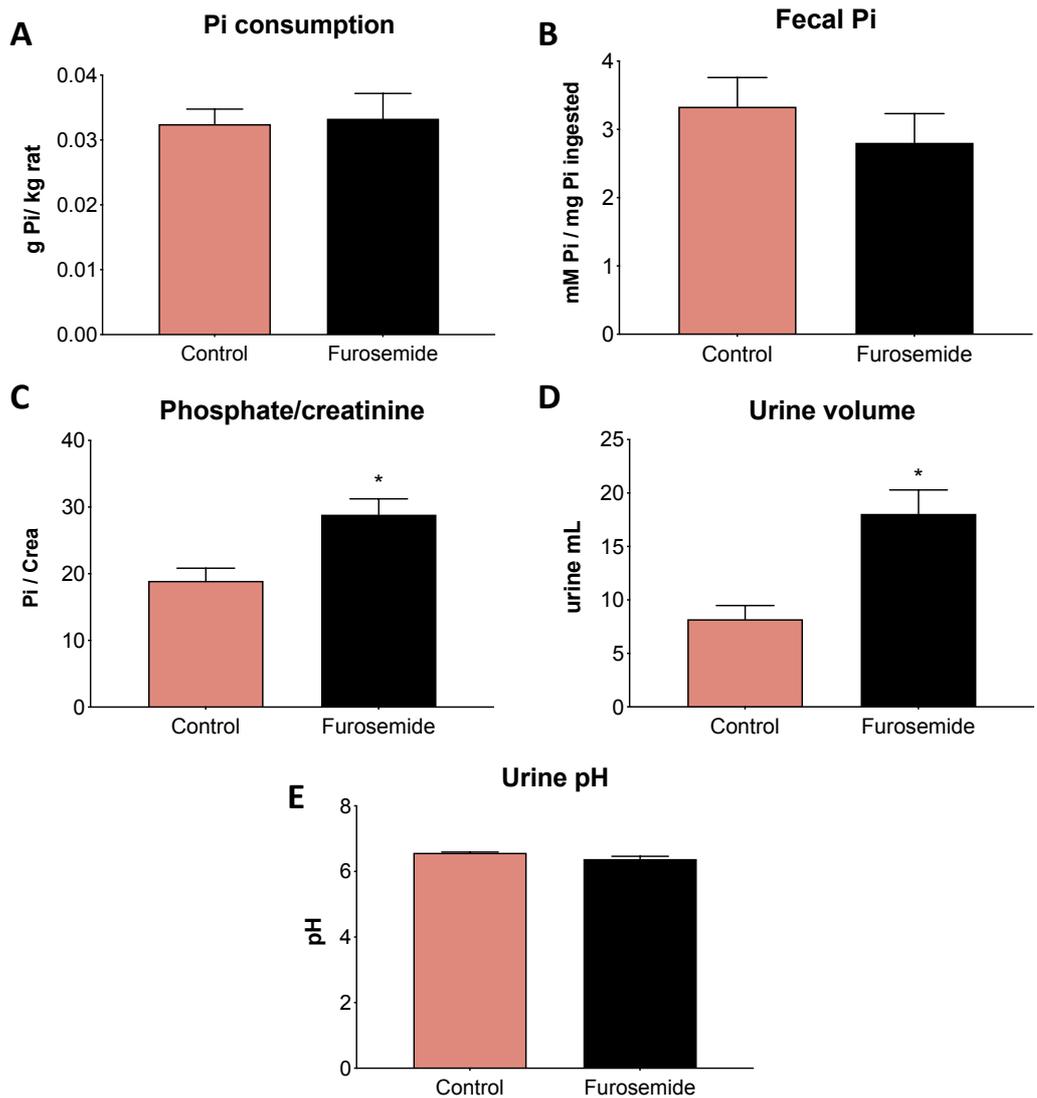


Figura R40: Efecto de furosemida en el metabolismo del Pi. Los datos mostrados corresponden a las mediciones realizadas en las segundas 24 horas en jaula metabólica. **A.** Cuantificación de Pi consumido en 24 horas respecto al peso de los animales. **B.** Fosfato fecal corregido respecto a la cantidad de Pi ingerida **C.** Ratio fosfato/creatinina en orina. **D.** Volumen de orina. **E.** pH en orina. *p<0.05.

PARTE 5. BÚSQUEDA DE NUEVOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SLC4A1

Como ya se ha comentado en la Introducción, múltiples incógnitas permanecen sin resolver respecto al transporte transcelular de Pi, especialmente en intestino delgado. Por ello, se decidió clonar diferentes transportadores de la familia Slc4 para poder expresarlos en ovocitos de *Xenopus laevis* con el fin de analizar su posible implicación en el transporte de Pi.

La Figura R41, muestra la acumulación de Pi en ovocitos que expresan cada uno de los miembros de la familia Slc4. Ninguno de ellos incrementó la toma de Pi sobre el nivel endógeno (ovocitos inyectados con agua). Sin embargo, en el caso de Slc4a1 se observó un descenso de en torno al 50% de la acumulación de ^{32}P respecto a los ovocitos inyectados con agua.

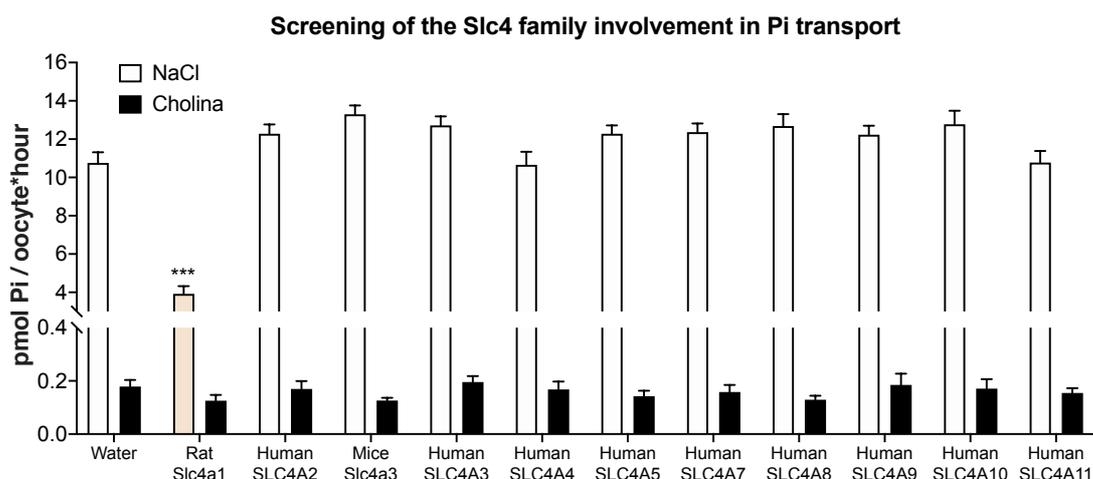


Figura R41: Análisis de la implicación de la familia Slc4 sobre el transporte de Pi. Transporte de Pi en presencia de sodio y colina en diferentes miembros de la familia Slc4. * representa diferencia estadísticamente significativa respecto a los ovocitos control inyectados con agua. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Debido a los resultados preliminares obtenidos al estudiar la familia Slc4, se decidió proceder a la caracterización del transportador Slc4a1 en el transporte de Pi y para ello se llevaron a cabo diferentes estudios tanto en ovocitos de *Xenopus laevis* como *in vivo*.

5. 1. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE FOSFATO PROVOCADA POR LA EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

En primer lugar, se estudió el transporte de Pi en ovocitos que sobreexpresaban Slc4a1 de rata respecto a ovocitos control inyectados con agua, en presencia de diferentes cationes (sodio, colina, potasio y litio). Como se había podido observar en el análisis de los diferentes miembros de la familia Slc4 (Figura R41), los ovocitos que expresaban Slc4a1 mostraron un descenso en la acumulación de Pi en torno a un 50% en presencia de NaCl, con respecto al grupo control. Cuando el catión sodio, fue sustituido por colina, litio o potasio no se observaron variaciones (Figura R42 A). Además, se expresaron cantidades crecientes de cRNA de Slc4a1 en los ovocitos observándose una relación inversa en la acumulación de Pi en las células, es decir, una disminución progresiva de la misma (Figura R42 B).

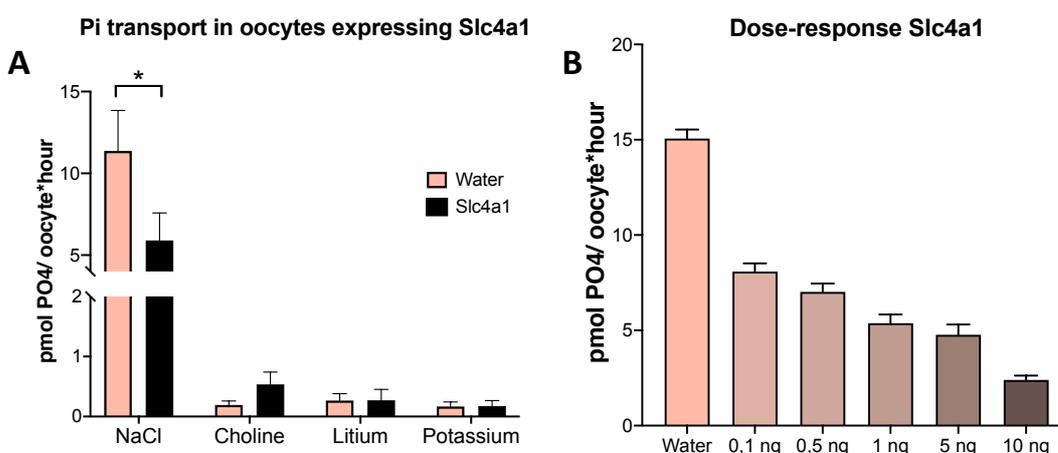


Figura R42: Efecto de Slc4a1 en el transporte de Pi en presencia de diferentes cationes y con diferentes cantidades de cRNA. **A.** Transporte de Pi de ovocitos inyectados con 1 ng de Slc4a1 cRNA respecto a ovocitos inyectados con agua en presencia de soluciones de transporte que contenían NaCl, colina, litio o potasio. **B.** Efecto de la expresión de cantidades crecientes de cRNA de Slc4a1. * $p < 0.05$

Los resultados anteriores se reprodujeron al inyectar el cRNA de SLC4A1 humano (Figura R43 A). Debido a que el transporte de bicarbonato por Slc4a1 va unido necesariamente al antitransporte de ion cloruro, estudiamos si en el caso del Pi la presencia del ion cloruro era también necesaria para el paso del Pi. Se observó que el efecto inhibitorio del Slc4a1 de rata sobre la acumulación de Pi en el interior de los ovocitos fue independiente de cloro (Figura R43 B).

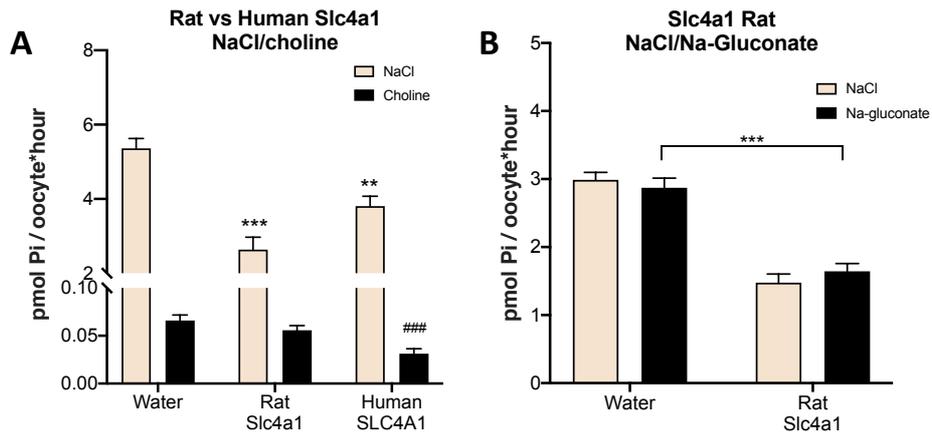


Figura R43: Efecto de Slc4a1 de rata en ausencia de cloro y frente a SLC4A1 humano en presencia de NaCl y colina. **A.** Transporte de Pi en presencia de NaCl o colina en ovocitos inyectados con 1 ng de cRNA. # representa diferencia estadísticamente significativa respecto a los ovocitos inyectados con agua en medio de transporte con colina **B.** Transporte de Pi en presencia de NaCl y en ausencia de cloro en ovocitos inyectados con 1 ng de cRNA. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Con el fin de facilitar el efecto de Slc4a1 con más cantidad de Pi acumulado, y analizar si el efecto se debía exclusivamente al transporte endógeno del ovocito, se procedió a coinyectar el cRNA de Slc4a1 con NaPi-IIa o bien con Pit-1. Como control positivo del experimento, también se coinjectaron NaPi-IIa y Pit-1 con XPR1.

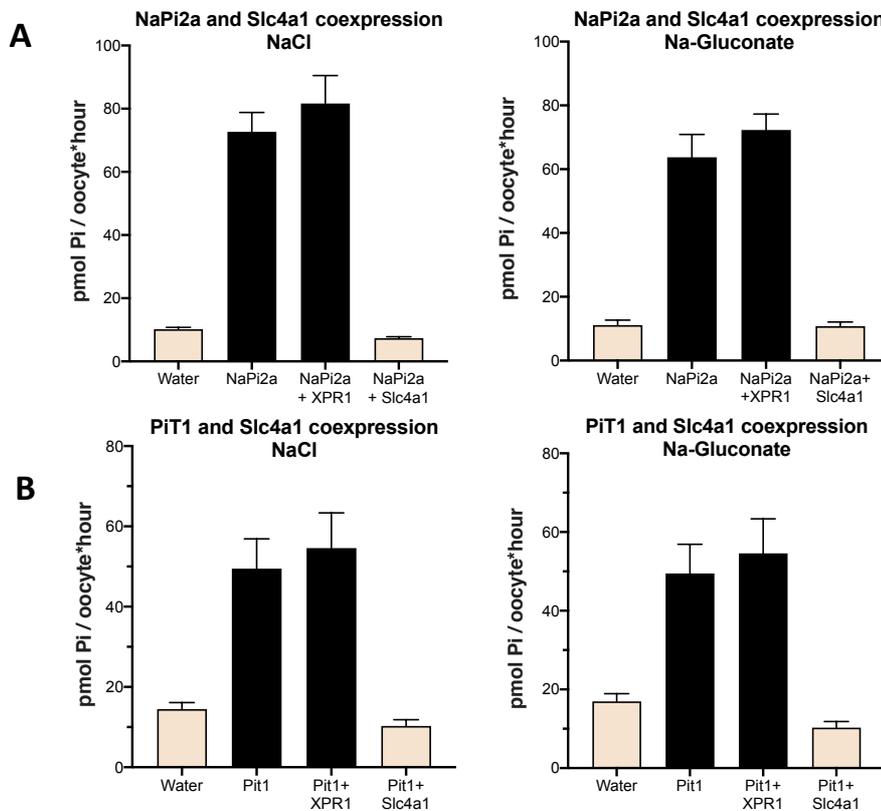


Figura R44: Efecto de la coexpresión de Slc4a1 con NaPi-IIa y Pit-1 en el transporte de Pi. Coexpresión de NaPi-IIa (**A**) y Pit-1 (**B**) con Slc4a1 en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de cloro. Se inyectó 1 ng de cRNA tanto para Pit-1 como NaPi-IIa por separado, mientras que en la coexpresión con otros transportadores se inyectó 1 ng de cRNA de cada uno de ellos.

Como indica la Figura R44, la coexpresión de Slc4a1 con NaPi-IIa y con Pit-1 evitó completamente la acumulación de Pi que se produjo en los ovocitos cuando únicamente expresaban NaPi-IIa o Pit-1. Esta situación sucedió tanto en presencia como en ausencia de cloro, por lo tanto, el efecto inhibitorio de Slc4a1 fue cloruro independiente. La coexpresión con XPR1 no produjo ningún efecto respecto al transporte endógeno, como ya se había comprobado anteriormente (no mostrado).

Con el fin de proseguir con la caracterización de Slc4a1 en el transporte de Pi, se procedió a usar diferentes inhibidores conocidos del intercambio de bicarbonato por Slc4a1: DIDS, SITS, floretina, dipiridamol (DP), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenceno (DNFB) y ácido niflúmico. Ninguno de ellos fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de Slc4a1 sobre la acumulación endógena de Pi en los ovocitos (Figura R45 A) ni a la debida a la expresión de NaPi-IIa (Figura R45 B).

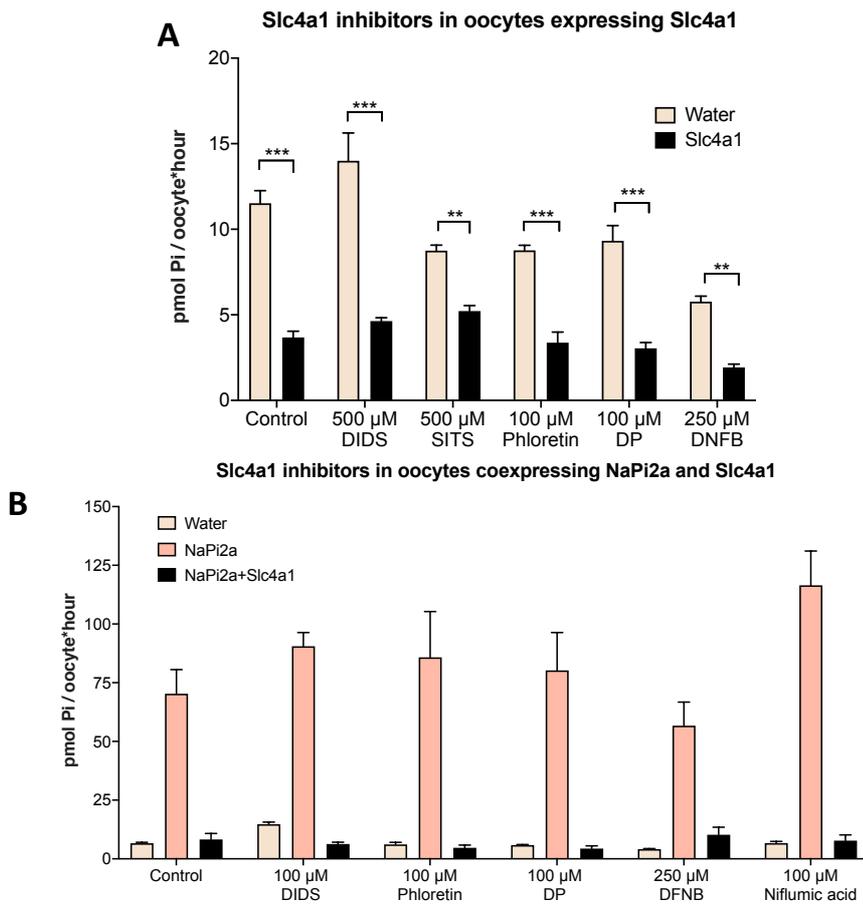


Figura R45: Uso de inhibidores del intercambiador Slc4a1 en el transporte de Pi. **A.** Transporte de Pi en ovocitos inyectados con Slc4a1 y agua, en presencia de NaCl. **B.** Transporte de Pi en ovocitos inyectados con agua, NaPi-IIa y NaPi-IIa con Slc4a1, en presencia de NaCl. En todos los casos la cantidad de cRNA inyectada de cada transportador fue de 1 ng para evitar la saturación del sistema endógeno de traducción.

Con el fin de comprobar la expresión de ambos transportadores en la membrana del ovocito cuando se llevaba a cabo la coinyección de Slc4a1 con otros transportadores como NaPi-IIa, se realizó la biotinylicación y purificación de las proteínas de superficie en el ovocito. En los ovocitos en los cuales se produjo la coexpresión de NaPi-IIa y Slc4a1, ambas proteínas se encontraron presentes en la proteína total biotinilada (Figura R46), así como en aquellos ovocitos que expresaban únicamente Slc4a1 o NaPi-IIa. En los ovocitos inyectados con agua, usados como control negativo, no se encontraron dichas proteínas. Además, como control negativo de la coexpresión con NaPi-IIa el cRNA de éste se coinyectó junto al de Slc4a2, transportador sin efecto sobre la acumulación de Pi en los ovocitos.

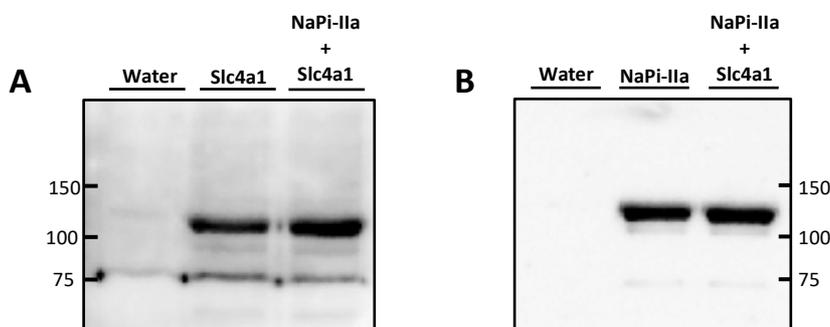


Figura R46: Expresión de NaPi-IIa y Slc4a1 de rata en la membrana de los ovocitos. Detección mediante Western-Blot de Slc4a1 (A) y NaPi-IIa (B) en proteína biotinilada de ovocitos inyectados con agua y los diferentes transportadores indicados en la parte superior.

Con el fin de elucidar si Slc4a1 evita la entrada de Pi o bien incrementa su salida, se llevó a cabo un experimento de inyección directa de ^{32}Pi (ortofosfato) puro en ovocitos previamente inyectados con agua o que expresaban Slc4a1 tras tres días de incubación. La radiactividad que quedaba en los ovocitos a lo largo del tiempo fue determinada como radiación Cherenkov y representada en la Figura R41. No se observaron diferencias entre las cpm de los ovocitos inyectados con agua o con Slc4a1. Aunque sigue siendo la opción más probable, este experimento no permite confirmar un incremento en la salida de Pi del interior del ovocito, causado por Slc4a1.

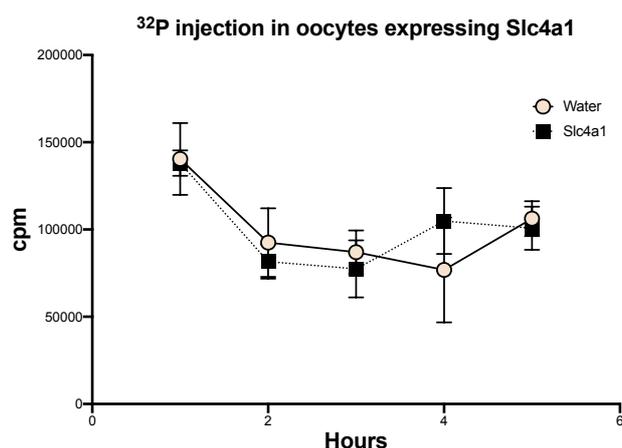


Figura R47: Efecto de Slc4a1 de rata sobre el ^{32}P inyectado en ovocitos. Todos los ovocitos fueron inyectados con 50 nl de ^{32}P y permanecieron en solución de transporte con NaCl hasta su medición a diferentes tiempos.

5. 2. EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN RATAS ADAPTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO EN LA DIETA

Para finalizar, se decidió comprobar la existencia de variaciones en la expresión de Slc4a1 en tejidos de rata, concretamente en corteza renal y yeyuno. Para ello se usaron los tejidos de las ratas de la primera parte del estudio de adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fosfato en la dieta (Figura M1). Concretamente se usaron los tejidos de los animales alimentados con el pienso de 0,1% y 1,2% de Pi de forma crónica y las ratas de las adaptaciones agudas a cambios de Pi en la dieta.

En la expresión de mRNA en corteza renal y yeyuno de Slc4a1 no se observaron variaciones en función del consumo de dietas con diferentes concentraciones de Pi (Figura R48 A). Asimismo, no existieron variaciones en la expresión proteica de SLC4A1 en corteza renal (Figura R48 B). En yeyuno también se procedió a medir la expresión de Slc4a1, no observándose diferencias en la expresión de mRNA. Sin embargo, los anticuerpos existentes no consiguieron identificar la proteína SLC4A1 en la mucosa de yeyuno mediante Western-Blot.

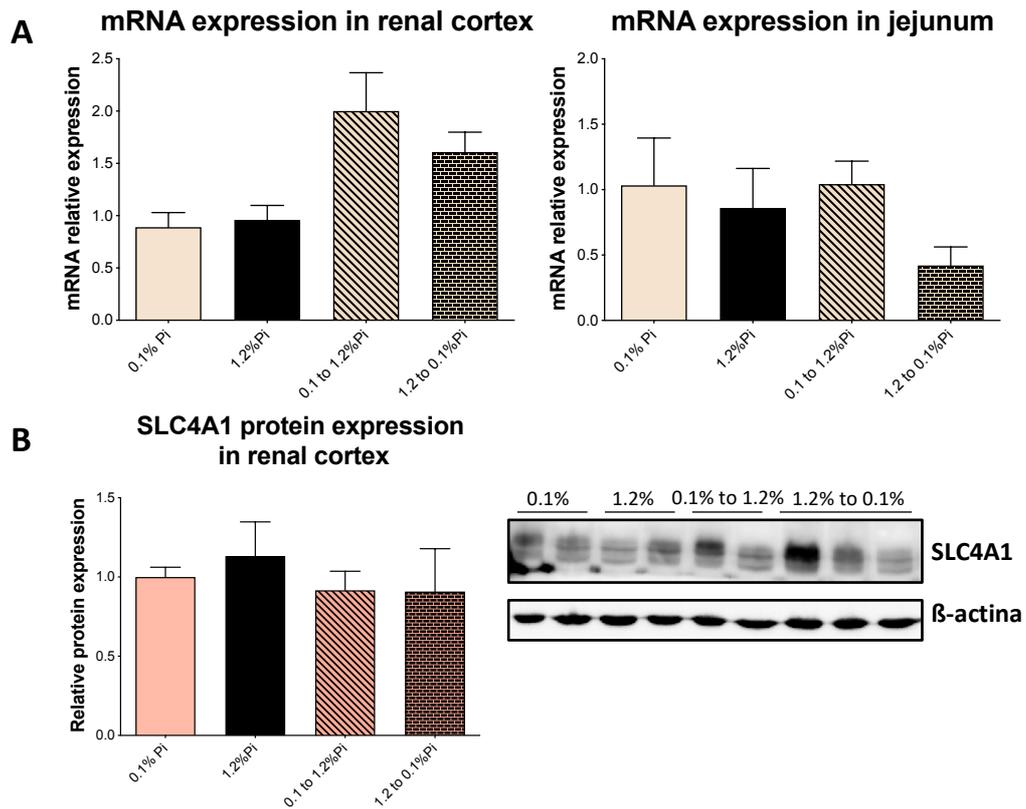


Figura R48: Expresión de Slc4a1 en corteza renal y yeyuno de ratas adaptadas a diferentes concentraciones de Pi en la dieta. **A.** Análisis de la expresión de mRNA en corteza renal (izquierda) y yeyuno (derecha) mediante qPCR. **B.** Expresión proteica de Slc4a1 en corteza renal mediante Western-Blot.

V. DISCUSIÓN

PARTE 1. ADAPTACIONES AGUDAS A CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL FOSFATO EN LA DIETA

Aunque es necesario un conocimiento preciso sobre los factores involucrados en la homeostasis del fosfato, resulta una tarea compleja ya que muchos de ellos interaccionan entre sí. En este apartado se ha intentado dilucidar los diferentes mecanismos que puedan estar participando en la regulación de la homeostasis del Pi en adaptaciones al contenido de Pi en la dieta.

1. 1. REGULACIÓN EN LA INGESTA DE PI

Existen diversos estudios que relacionan variaciones en el apetito con la concentración de Pi en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo. La reducción de la concentración de Pi periférica y central coincide con la inducción del apetito en ratas alimentadas con una dieta con concentraciones reducidas de fosfato (143–145). De la misma manera, cuando las concentraciones de Pi en plasma y líquido cefalorraquídeo se reestablecen, disminuye el apetito (145,146). Por lo tanto, la concentración de Pi en plasma y líquido cefalorraquídeo forma parte de manera directa o indirecta del mecanismo por el cual se estimula el cambio en el comportamiento de los animales. Investigaciones posteriores demostraron que las variaciones en la concentración de Pi del líquido cefalorraquídeo producían cambios de comportamiento en el apetito de los animales, sin necesidad de cambios en la concentración de Pi en plasma (147). Además, encontraron la presencia de transportadores sodio dependientes de Pi (similares a los cotransportadores de la familia Slc34) en distintas áreas del encéfalo, como la amígdala y en células ependimarias circunventriculares del tercer ventrículo. En concreto, se ha postulado que estas células actúen como sensor de Pi, ya que se encuentran en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo y muestran variaciones en la expresión de los transportadores NaPis en su membrana en función de la concentración de Pi (147).

En todas las ratas de este estudio se observó modificación en la ingesta de pienso cuando fueron sometidas a adaptaciones agudas el último día (Figura R1 B), pero dicha modificación en la ingesta fue más marcada en las ratas PTX (Figura R6 B). Sin embargo, cuando las ratas eran alimentadas con la misma dieta de forma crónica no se observó

ninguna modificación en la cantidad ingerida de pienso. Los cambios en el consumo de pienso fueron acompañados con el correspondiente aumento o disminución de la concentración de Pi en plasma en función de si pasaban a consumir el pienso de 1,2% o de 0,1% de Pi, respectivamente (Figura R4 A). Por lo tanto, el cambio agudo de la concentración de Pi en el pienso podría estimular o inhibir el apetito en las ratas.

Además, en las ratas PTX el consumo de pienso fue menor en los grupos alimentados con el pienso de 0,6% y 1,2% de Pi (Figura R6 A). Esta situación se correlaciona con unos valores de Pi en plasma superiores a los obtenidos en las ratas *Sham* (Figura R9). Teniendo en cuenta que el mecanismo por el cual parece estar regulada la ingesta de Pi en ratas depende de la concentración de Pi en líquido cefalorraquídeo y por lo tanto de forma indirecta en plasma (143–147), podría suponer que esa concentración superior de Pi en plasma suponga una inhibición en el apetito de las ratas PTX que no sucede en las ratas *Sham*.

1. 2. ESTADO ÁCIDO BASE

Hemos corroborado que la privación de Pi en la dieta produce una ligera alcalinización en la orina (Figura R2 B y R7 C). Este hecho se ha descrito en múltiples casos clínicos, ya que la hipofosfatemia provocada por la privación de Pi y otras causas, se asocia con acidosis metabólica y bicarbonaturia. En estos pacientes el estado ácido base se recupera únicamente cuando se normaliza la fosfatemia (148). Existen diferentes teorías que intentan explicar este fenómeno. Por un lado, se habla de que la ausencia de Pi en el líquido tubular podría suponer la pérdida de su efecto como sistema amortiguador de pH, lo cual junto con una disminución en la producción de amoníaco provocaría acidosis tubular distal y disminución en la reabsorción de bicarbonato. Por otro lado, la disminución de la concentración de Pi, supondría una disminución en los depósitos de ATP en hígado y tejido muscular, lo que aumentaría la producción de ácido láctico, y esa acidosis ocasionaría rhabdomiólisis en el tejido muscular (142,149).

Además, todos los grupos en las ratas PTX mostraron unos valores de pH ligeramente superiores a los correspondientes en las ratas *Sham*, con la excepción de las ratas PTX adaptadas a 1,2% de Pi (Figura R7 C). En las ratas PTX la eliminación de Pi

a través de la orina también fue menor en comparación con las ratas *Sham* (Figura R7 A), lo cual podría explicar ese ligero aumento en el pH, teniendo en cuenta las teorías que postulan la relación entre la concentración de Pi en el líquido tubular y bicarbonaturia (142,149).

1. 3. TRANSPORTE DE FOSFATO EN CORTEZA RENAL Y YEYUNO

La excreción renal de Pi es el mecanismo más importante en la regulación de la homeostasis del Pi, por ello es importante una correcta adaptación a las variaciones de Pi que puedan producirse en la dieta. El transporte de Pi en corteza renal siempre estuvo en relación con la concentración de Pi administrada en la dieta (Figura R4 C), aumentando cuando la concentración de Pi disminuía en el pienso, así como en el plasma (Figura R4 A). En ratas *Sham* el transporte de Pi en BBMV de corteza renal muestra la misma regulación. Sin embargo, en las ratas PTX, la ausencia de PTH supuso un aumento en el transporte de Pi en las ratas alimentadas con 0,6% y 1,2% de Pi, en comparación con sus respectivos grupos de alimentación en las ratas *Sham*. Pese a ello, se pudo observar el descenso en el transporte de Pi en las ratas PTX adaptadas a 1,2% de Pi respecto a 0,1% de Pi. Todo ello se tradujo en un aumento de la concentración de Pi en plasma (Figura R9 A) y en la disminución de la fosfaturia (Figura R7 A) en ratas PTX alimentadas con los piensos de 0,6% y 1,2% Pi.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados por la ausencia de PTH. La hormona paratiroidea es liberada en respuesta a una disminución en la concentración plasmática de calcio, y también, de forma independiente a un aumento en la de Pi (36). La PTH causa la internalización de NaPi-IIa, NaPi-IIc (30,46,47) y Pit-2 (44), desde la membrana apical de las células tubulares renales, por lo que disminuye la reabsorción de Pi. Consecuentemente, en ausencia de PTH (animales PTX) cuando aumentamos la concentración de Pi en la dieta el transporte de Pi en riñón no disminuye como estaba esperado, aunque sí existe un ligero descenso en el transporte de Pi con la dieta de 1,2% de Pi. Este descenso se podría atribuir directamente al propio mecanismo de adaptación de las células del túbulo proximal en respuesta a cambios en la concentración de Pi y a FGF-23 ya que es el único de los factores fosfatúricos que muestra diferencias entre los grupos (Figura R11 A). FGF-23 actúa de forma muy similar a PTH, produciendo la

disminución en la expresión e internalización de NaPi-IIa y NaPi-IIc en corteza renal (69,70,72).

En cuanto a las adaptaciones a los cambios agudos en la dieta, en ausencia de PTH no se obtuvieron cambios en el transporte de Pi, salvo un ligero aumento en el grupo de animales que cambiaron del pienso de 1,2% a 0,1% de Pi (Figura R9 B). En consecuencia, podemos afirmar que el principal factor en la regulación del riñón a cambios agudos en la concentración de Pi en la dieta es PTH, por encima de FGF-23 u otras fosfatoninas, como ya apuntaba el grupo del Prof. Wagner en estudios anteriores (50).

En cuanto a la absorción intestinal de Pi es el resultado del transporte transcelular y la absorción pasiva paracelular, que será proporcional a la concentración de Pi presente en la luz intestinal, ya que incluso con valores de Pi en el rango milimolar se presenta como un transporte no saturable (96). Además, Eto et al. (97) mediante el uso de la técnica electrofisiológica de *voltage clamp* que permite diferenciar el transporte transcelular del paracelular, determinaron que la vía transcelular representaba el 78% del transporte de Pi en yeyuno de rata, respecto a la ruta paracelular que correspondería al 22% restante. Sin embargo, este estudio se llevó a cabo con una concentración de Pi similar a la K_m del intestino (0,1 mM), por lo que en el estudio se vería favorecida la vía transcelular. Por lo tanto, cuando la concentración de Pi disminuye en la luz del tracto intestinal, el transporte transcelular adquiere una importancia mayor (23).

En la presente tesis se ha analizado el transporte vía transcelular, utilizando BBMV de yeyuno para estudiar el componente sodio dependiente con el fin de simplificar la interpretación de los resultados. Asimismo, el ratio de transporte de Pi en rata es mayor en yeyuno, ligeramente inferior en duodeno y mínimo en íleon (23,150,151), y diversos estudios muestran una mayor relevancia y expresión de NaPi-IIb en esta sección del intestino delgado (23,152). Además, las ratas utilizadas en este estudio fueron mayores de 2 meses para evitar un aumento en la variabilidad entre individuos, debido a que en ratas menores de 42 días se han observado grandes variaciones en el ratio de transporte de Pi sodio dependiente en intestino (153).

En las ratas alimentadas con 0,1% de Pi de forma crónica se observó el aumento del transporte de Pi característico (Figura R4 C). Sin embargo, el intestino no respondió con

la misma rapidez a los cambios agudos en la concentración de Pi en la dieta que el riñón. En las adaptaciones agudas (Figura R4 D) se observaron valores de transporte muy similares entre ambas adaptaciones, pese a tener direcciones opuestas en cuanto al intercambio de piensos. Cuando se produce el cambio a 1,2% de Pi existe una ligera disminución no significativa en el transporte de Pi respecto a las ratas que continúan con la alimentación de 0,1% de Pi. Por lo tanto, en nuestro estudio no se observó el aumento paradójico del transporte de Pi cuando pasamos de una dieta con una concentración reducida de Pi (0,1% de Pi) a otra con una concentración elevada (1,2% de Pi), que había sido descrita por Candeal et al. (154). Pese a ello, nuestros resultados coinciden con los estudios de Giral et al. (23), en los cuales observaron el aumento paradójico en el transporte de Pi en duodeno, pero no en yeyuno, tejido en el cual se han llevado a cabo estas mediciones. La principal diferencia entre estos artículos y nuestras observaciones radica en la formulación del pienso, ya que en los artículos anteriores no se tuvo en cuenta el pH del pienso. La formulación del pienso utilizado en la presente tesis fue ajustada para mantener valores de pH similares entre las tres dietas y por ello fue necesario combinar las distintas sales de manera diferente para procurar que la concentración de los diferentes elementos fuera similar (Anexo 1).

Durante mucho tiempo se ha dudado de si PTH puede tener un efecto directo sobre la absorción intestinal del calcio y el fosfato. Existen estudios que han encontrado relación directa entre el aumento de la absorción intestinal de calcio y PTH en rata (155,156). Sin embargo, el aumento de la absorción intestinal de Pi inducido por PTH de forma directa, únicamente se ha visto en asas intestinales duodenales aisladas de pollo en las cuales, se realizaba perfusión durante 20 minutos con diferentes concentraciones de PTH (157). Si bien es cierto que se ha demostrado la presencia de receptores de PTH en el intestino de rata, concretamente en el epitelio de las microvellosidades, en las células de las criptas intestinales, en las células intersticiales e incluso en la musculatura lisa (158), la opinión generalizada es que el aumento de la absorción intestinal de calcio y fosfato por parte de PTH se produce de forma indirecta, mediante la estimulación en la producción de la vitamina D₃ (48,54). No obstante, la absorción de Pi no se ve modificada en ratones carentes del gen del receptor de vitamina D₃ (35), por lo que PTH podría actuar independientemente de esa vitamina.

Los resultados obtenidos en la presente tesis mostraron la ausencia de modificaciones en el transporte de Pi en BBMV de yeyuno de rata en ausencia de PTH (Figura R9 C), por lo que sustentan la idea de que la PTH no tiene un efecto directo sobre la absorción intestinal de Pi.

Para estudiar la regulación de NaPi-IIb en la adaptación del intestino a la concentración de Pi en la dieta, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión proteica del transportador NaPi-IIb en BBMV de yeyuno, de modo similar a estudios previos de nuestro grupo (154). No solo se modificó la expresión de NaPi-IIb en la membrana apical del tejido intestinal en adaptaciones crónicas a 0,1% de Pi, si no que, en cambios agudos, también existe un aumento en la expresión (Figura R10) que se genera al menos en un intervalo de tiempo inferior a 4 horas y con independencia de PTH y vitamina D₃. Lo cual corrobora las observaciones realizadas en ratones carentes del receptor de vitamina D₃ en los que en respuesta a privación de Pi se observa el aumento en la expresión proteica de NaPi-IIa (31). Por lo tanto, el cambio en la expresión de NaPi-IIb podría estar regulado por las propias variaciones en la concentración de Pi en la dieta.

1. 4. FACTORES DE REGULACIÓN EN LA HOMEOSTASIS DEL PI

Pese a estar descrito el aumento de vitamina D₃, insulina y hormonas tiroideas en respuesta a bajas concentraciones de Pi para aumentar o mantener la fosfatemia (19,159); en nuestras condiciones experimentales ninguna de esas hormonas sufrió ningún cambio en su concentración en plasma. Concretamente, la implicación de la vitamina D₃ en la adaptación del organismo a bajas concentraciones de Pi ha sido controvertida como ya hemos comentado en el apartado anterior, ya que en estudios recientes se ha demostrado que dicha adaptación sería independiente de vitamina D₃ (31,35). Por lo tanto, aunque la administración de estas hormonas provoca un incremento en el transporte intestinal de Pi, no se puede concluir que un incremento en el transporte intestinal de Pi provocado por privación de Pi cause cambios en las concentraciones plasmáticas de las hormonas. Sin embargo, en este estudio no hemos cuantificado la expresión de los receptores de las mismas, que podrían estar incrementados, aunque es poco probable.

Por el contrario, en respuesta a altas concentraciones de Pi en la dieta se produce el aumento de PTH, dopamina, glucocorticoides y diferentes fosfatoninas. Sin embargo, las únicas variaciones observadas fueron en PTH y FGF-23 (Figura R5), cuya regulación es apreciable incluso en las adaptaciones agudas a cambios de Pi en la dieta. En otras palabras, en tan solo 4 horas, que es el tiempo de alimentación en las ratas con alimentación restringida en adaptaciones agudas, se observó un cambio tanto en la concentración de PTH como de FGF-23.

Tras comprobar la ausencia de PTH en ratas PTX se procedió a la determinación de diferentes factores implicados en la regulación de la homeostasis del Pi. Los valores de FGF-23 en ratas PTX son claramente inferiores a los que aparecen en ratas *Sham* (Figura R11 A), lo cual remarca la relevancia de PTH en la producción de FGF-23. Esto puede deberse a que PTH es capaz de estimular la expresión y secreción de FGF-23 a través de los receptores PTHR1 presentes en los osteocitos (49,52,160). No obstante, los valores de FGF-23 en ratas PTX se regularon en función de la concentración de Pi en la dieta, por lo cual no parece ser un estímulo imprescindible para su producción y regulación.

PARTE 2. PRIVACIÓN DE FOSFATO

Como se ha tratado previamente en la introducción, la hipofosfatemia está relacionada con una serie de alteraciones que pueden suponer múltiples complicaciones en pacientes con otras patologías. En este estudio nos hemos centrado en las alteraciones renales relacionadas con la privación de Pi, entre ellas la bicarbonaturia y la alcalinización de la orina, que a su vez se relacionan con alteraciones metabólicas entre las que se incluyen la acidosis metabólica. Además, existen estudios que postulan la posibilidad de que una ingesta reducida de Pi podría ayudar a revertir la calcificación vascular (161). Esta reversión podría guardar relación con la bicarbonaturia y posterior acidosis producida por la privación de Pi, por lo que entender cómo se producen estos mecanismos y sus posibles efectos en el tejido óseo podría aportar valiosa información.

2. 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE NHE3

La presencia de bicarbonaturia en la orina debido a hipofosfatemia podría deberse a una disminución en la reabsorción renal de bicarbonato. La reabsorción del bicarbonato en la nefrona tiene lugar en casi todas las porciones de los túbulos a excepción de los segmentos finos ascendente y descendente del asa de Henle. Se estima que alrededor del 80-90% del bicarbonato se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal, en torno a un 10% en la porción gruesa ascendente del asa de Henle y el resto en el túbulo contorneado distal y túbulos colectores (Figura D1). Tanto en el túbulo contorneado proximal como en el asa de Henle la reabsorción del bicarbonato se produce principalmente gracias a un transporte activo secundario de iones H^+ . Sin embargo, en la porción final del túbulo contorneado distal y en el resto del sistema tubular la reabsorción se produce mediante la excreción activa primaria de H^+ llevada a cabo en las células intercalares de tipo A mediante ATPasas (V-ATPasa y ATPasa H^+/K^+) (2).

Por todo ello, se postuló la hipótesis de que el intercambiador NHE3 fuera uno de los causantes de la bicarbonaturia causada por estados de privación de Pi (108). Este transportador se localiza principalmente en la membrana apical de las células del túbulo contorneado proximal (162) y también se ha descrito su presencia en la porción gruesa

ascendente del asa de Henle (163). La función de NHE3 consiste en intercambiar cationes Na^+ por iones H^+ que son secretados a la luz del túbulo renal mediante transporte activo secundario, ya que el Na^+ es reabsorbido a favor de gradiente al interior celular gracias a la bomba ATPasa Na^+/K^+ presente en la membrana basolateral, que saca Na^+ a cambio de K^+ . Esa secreción de H^+ favorece la reabsorción de bicarbonato, ya que los H^+ reaccionan con los aniones HCO_3^- luminales, produciendo bicarbonato que, mediante la actuación de la anhidrasa carbónica IV presente en la membrana de las células epiteliales tubulares, da lugar a CO_2 que difunde al interior celular. Esta es la vía principal en la reabsorción de bicarbonato (164). Partiendo de esta premisa, se decidió analizar la expresión y funcionalidad de NHE3 en la línea celular OK, modelo celular conocido del epitelio del túbulo contorneado proximal renal.

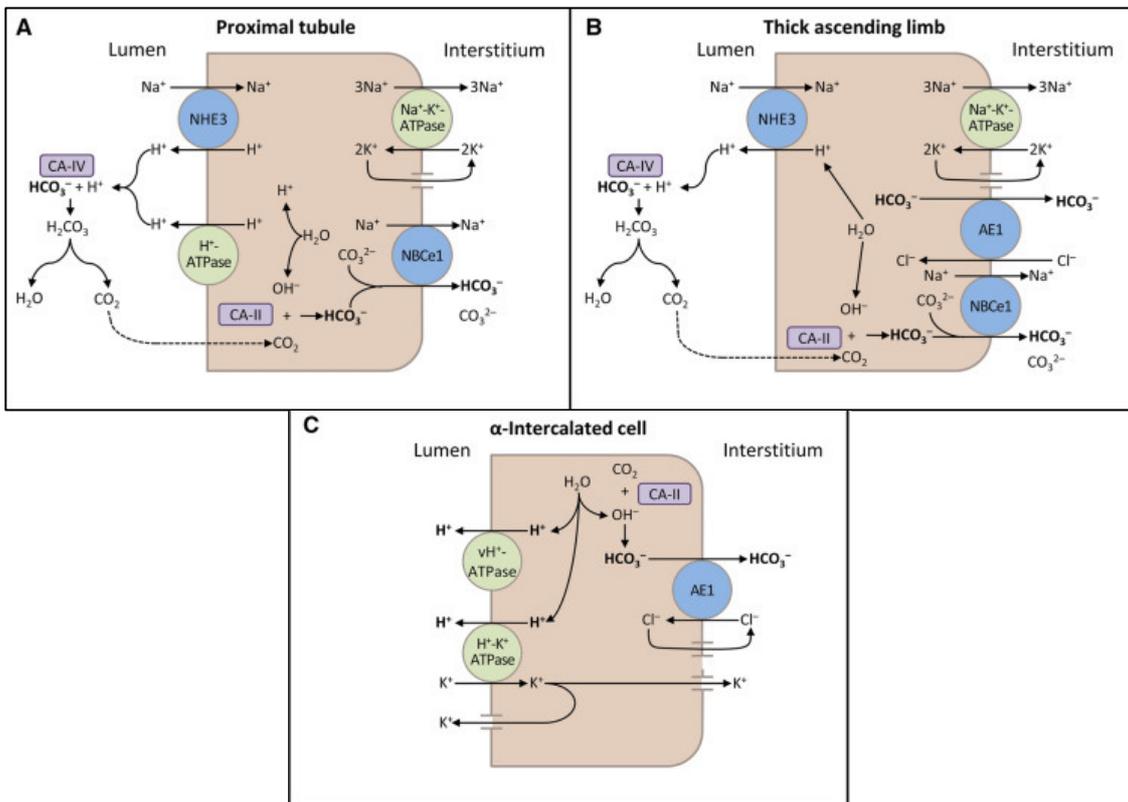


Figura D1: Esquema de los transportadores implicados en la reabsorción renal del bicarbonato. Imagen modificada de Clegg et al. (2020).

Los resultados mostraron un aumento en la expresión proteica de NHE3 en las células adaptadas a 0,1 mM de P_i , tanto en lisado total como en la superficie de la membrana celular (Figura R12). Dicho resultado parece indicar lo contrario a lo esperado en caso de que existiera una deficiencia en la reabsorción del bicarbonato. Por lo que se decidió estudiar la fosforilación de NHE3 en la posición serina 552, forma inactiva de la

proteína, observándose un aumento en su expresión en células adaptadas a 0,1 mM de Pi. Por lo tanto, pese a tener una mayor expresión, podría no traducirse en un aumento de su actividad.

También se analizó la expresión proteica de la V-ATPasa implicada en la excreción de H⁺ necesarios para la reabsorción del bicarbonato, sin encontrar variaciones en la expresión (Figura R12).

Con el fin de confirmar si ese aumento en la expresión de NHE3 se traduce en un aumento o no de su actividad se realizó el protocolo de recuperación de pH. Tras la adaptación a 0,1 mM de Pi, las células OK mostraron una capacidad reducida en la recuperación de pH (Figura R14 B), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Green et al. que vieron que las células OK adaptadas durante 24 horas a un medio en ausencia de Pi, se recuperaban peor a cambios en el pH en presencia de Na⁺ y no en ausencia de este (165). Todos estos hallazgos en su conjunto podrían indicar que la actividad de NHE3 no se encuentra aumentada (pese a observarse un aumento en su expresión), si no que incluso podría estar inhibida.

La regulación en la actividad NHE3 se puede producir tanto por fosforilación directa como por interacción con el extremo C-terminal a través de proteínas con dominios PDZ que se encargan del ensamblaje y localización en la membrana plasmática. La activación de la proteína quinasa A en respuesta a un aumento del AMPc provoca la inhibición de NHE3 debido a la fosforilación en serina 552 y en serina 605 (166). Además, se ha descrito su interacción con las proteínas de ensamblaje lo que puede suponer la redistribución del transportador de las microvellosidades de la membrana en borde en cepillo, a una zona entre las microvellosidades donde permanecería inactivado o con una actividad menor (167,168). Por lo que el aumento de la forma fosforilada en serina 552 (Figura R12) no solo podría indicarnos la inactivación directa de la proteína si no también la redistribución de la misma, reduciendo su actividad, aunque dicho mecanismo quedaría pendiente de comprobación.

Para continuar analizando la implicación del intercambiador NHE3 en la bicarbonaturia causada por estados de privación de Pi se realizó el experimento en ratas alimentadas con diferentes concentraciones de Pi en el pienso durante 1 y 8 semanas.

En primer lugar, se analizó la presencia de bicarbonaturia, aunque no siempre se observó de forma clara ya que se aprecian grandes fluctuaciones en función del momento de medición y de los individuos. Sin embargo, cabe resaltar que los valores de bicarbonato alcanzados en el grupo de animales con privación de Pi (0,1% de Pi) no se alcanzaron en ningún momento en el resto de grupos (Figura R16 C). Por lo tanto, los resultados obtenidos presentan claras coincidencias con estudios previos y con lo observado en múltiples casos clínicos en humanos (142,148,169).

En esos mismos animales, a 1 semana se observó el aumento en la expresión de NHE3 y NHE3 inactivado mediante fosforilación en serina 552 (Figura R19 A). Sin embargo, esto no ocurrió a 8 semanas, donde el aumento en la expresión de NHE3 desaparece (Figura R19 B). En cuanto al resto de transportadores analizados, de nuevo no se obtuvieron cambios en la expresión proteica de la V-ATPasa (Figura R19). En resumen, a 1 semana podría estar produciéndose la disminución en la actividad de NHE3 que se observó en células OK-P derivada de su fosforilación, pero no tras 8 semanas; todo ello teniendo en cuenta que el relativo aumento en la excreción de bicarbonato en orina permaneció hasta ese momento.

Por lo tanto, se presentan varias posibilidades para tratar de explicar lo que ocurre a 8 semanas, por un lado, que la inactivación de NHE3 se lleve a cabo por otros mecanismos, como la redistribución de este en la membrana o la fosforilación del transportador en otros puntos que supongan su inactivación. Además, existiría la posibilidad de que entren en juego otros factores, como podrían ser la inactivación de la anhidrasa carbónica IV o del transportador NBCe1, el cual se ubica en la membrana basolateral donde se encarga de sacar el bicarbonato de las células tubulares en cotransporte con Na^+ (170). Asimismo, cabe destacar que Pendrin (Slc26a4) ha sido descrito como un transportador apical de bicarbonato localizado en los túbulos colectores; más concretamente, en las células intercalares no A no B y en las tipo B (171). Por lo tanto, un aumento en la actividad o expresión de este transportador podría suponer un aumento de la excreción activa de bicarbonato. En definitiva, para identificar el mecanismo o los mecanismos precisos por los que la hipofosfatemia provoca bicarbonaturia es preciso analizar otras hipótesis ya que NHE3 no parece explicar en su totalidad el aumento de la concentración de bicarbonato en orina.

2. 2. PRODUCCIÓN DE AMONIACO EN CÉLULAS OK-P

Existe cierta controversia en cuanto a la producción de amoniaco y la excreción de NH_4^+ en orina en respuesta a privación de Pi. Estudios iniciales señalan que la privación de Pi puede suponer la inhibición de la amoniogénesis en las mitocondrias del riñón, de manera que cuando se infunde Pi la producción de amoniaco se retoma. Este descenso en la producción de amoniaco lo atribuyen a la inhibición de la glutaminasa dependiente de Pi, que produce glutamato el cual actúa como inhibidor de la reacción por retroalimentación negativa (169). Estudios posteriores observaron que la privación de Pi suponía un descenso en la excreción de ion amonio en orina (142,172), acompañada normalmente con una concentración reducida de ácidos titulables. No obstante, Emmett et al. (142), pese a encontrar disminución en la excreción de amoniaco en orina de ratas alimentadas con concentraciones reducidas de Pi, no observaron diferencias en la producción de amoniaco a partir de glutamina en la corteza renal respecto al grupo control. En un estudio más reciente realizado en células OK se observó una disminución del transporte de ion amonio de hasta un 32% cuando las células eran incubadas durante 3 horas en un medio con 0,002 mM de Pi (173).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron por un lado que, la concentración de amoniaco intracelular en las células OK adaptadas a 0,1 mM de Pi disminuía (Figura R13) y por otro lado, que cuando se realizó el protocolo de recuperación de pH, no se encontraron diferencias de pH en las etapas que se relacionan con el transporte de amoniaco e ion amonio (alcalinización y posterior acidificación) entre las células adaptadas a las diferentes concentraciones de Pi (Figura R14 B). Por lo tanto, se puede concluir la ausencia de variaciones en el transporte de NH_4^+ en células OK (173).

En conclusión, dado que el transporte de amonio no se vio modificado, todo indica que la reducción de la concentración intracelular de amoniaco pueda ser debida a una menor producción por parte de las células adaptadas a 0,1 mM de Pi. Sin embargo, no se observaron diferencias en la excreción renal de amoniaco en las ratas alimentadas con 0,1% de Pi, por lo que no se pudo estudiar dicho efecto *in vivo* (Figura R16).

2. 3. EFECTOS DE LA PRIVACIÓN DE FOSFATO SOBRE EL HUESO

Los resultados de este estudio mostraron la presencia en la orina de las ratas alimentadas con 0,1% de Pi un claro aumento del pH (Figura R15), disminución de la excreción del Pi y una marcada calciuria (Figura R16 A y B). A diferencia de la orina, el plasma no presentó cambios en el pH ni en la concentración de calcio (Figura R17 A y D), únicamente se observó hipofosfatemia en las ratas de 1 semana ya que a 8 semanas los valores de Pi en plasma se habían normalizado en los tres grupos. Por lo tanto, si hay una excreción aumentada de bicarbonato y calcio en orina, pero los valores sanguíneos no se modifican, y la concentración de Pi plasmático se normaliza a las 8 semanas (Figura R17 B), podría suponer que dichos componentes pudieran estar siendo movilizados del tejido óseo, ya que es el principal depósito de estos materiales, o bien, deberse a un incremento en la absorción intestinal. Con el fin de estudiar la primera hipótesis se llevó a cabo un estudio sobre la estructura y densidad ósea del tejido.

En primer lugar, mediante microCT se realizó el análisis estructural de las tibias de las ratas alimentadas con las diferentes concentraciones de Pi. En las tibias de las ratas alimentadas con 0,1% de Pi durante 1 semana se observó un ligero aumento en la formación de hueso trabecular, sin que se modifique el hueso cortical (Figura R21 y R22). Este resultado va ligado a un aumento de la secreción de PTH en las ratas alimentadas con 0,6% y 1,2% de Pi (Figura R18), por lo que podría suceder que dicho aumento en el hueso trabecular de las ratas alimentadas con 0,1% de Pi en realidad fuera resultado de un aumento en la resorción ósea de las ratas de 0,6% y 1,2% de Pi debido al efecto de PTH. El efecto de PTH sobre el tejido óseo puede ser variable dependiendo del equilibrio entre resorción y formación ósea (40,41), pero un aumento en su concentración de forma mantenida ha demostrado tener un efecto catabólico (174). La concentración de PTH puede aumentar tan solo 2 horas después de la ingesta de una dieta con un concentración elevada de Pi (51) de manera que los valores de PTH podrían haberse visto aumentados en estas ratas desde el primer día de ingesta de la dieta de 0,6% y 1,2% de Pi. En este caso, la PTH podría estar originando un aumento en la resorción ósea actuando de forma indirecta a través de los osteoblastos, mediante la estimulación de RANKL e inhibición de la osteoprotegerina, resultando en un aumento del número de

osteoclastos y de su actividad (40). Además, su efecto en el tejido óseo se daría con mayor rapidez en hueso trabecular ya que tiene una tasa de recambio muy superior al hueso cortical que se encontraría entre un 2% y un 5% anual (175). Asimismo, cabe añadir que la concentración de DPD en orina, conocido marcador de resorción ósea, se vio aumentada en las ratas alimentadas con el pienso de 1,2% de Pi (Figura R20), pudiendo corroborar esta hipótesis.

Sin embargo, a 8 semanas la remodelación ósea que se produce con la dieta deficiente de Pi (0,1% de Pi) es mucho mayor y más apreciable. Por un lado, hay un aumento del número de trabéculas y de conexiones por lo que disminuye la separación entre trabéculas y por otro lado hay una disminución del grosor del hueso cortical y un ligero aumento de la porosidad de este (Figura R24 y R25). En definitiva, aumento del hueso trabecular y disminución del cortical, una remodelación ósea bastante característica que solo se presenta en circunstancias muy específicas. Por ejemplo, en la enfermedad de Pyle, la cual se caracteriza por una deficiencia de sFRP4, donde aparece una disminución de la densidad del hueso cortical, mientras que el hueso trabecular se encuentra normal o aumentado (176). También se ha demostrado que la administración intermitente de PTH puede provocar la disminución de la densidad del hueso cortical sin tener modificaciones en el hueso trabecular, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual se daría dicha remodelación ósea (177). No obstante, a 8 semanas la concentración de PTH no presenta variaciones entre grupos y únicamente se observa aumento de FGF-23 en las ratas alimentadas con el pienso de 0,6 y 1,2% de Pi y de MEPE en las de 1,2% de Pi (Figura R18).

Cabe añadir que la disminución del tejido óseo cortical a 8 semanas con la privación de Pi podría estar supliendo el exceso de excreción de bicarbonato y calcio a través de la orina a largo plazo; ya que a 1 semana no se aprecian variaciones en el hueso cortical. Pese a encontrar aumento del hueso trabecular, se debe tener en cuenta que el hueso cortical representa el 80% de la masa ósea total, por lo que su déficit puede tener una mayor repercusión de la que podría tener un ligero aumento en el hueso trabecular.

Dada la característica remodelación ósea producida en las ratas alimentadas con 0,1% de Pi en el pienso respecto a 0,6% y 1,2% de Pi, se llevo a cabo el análisis de la

expresión de diferentes osteogénes relacionados con la formación y resorción ósea que pudieran aportar información sobre los mecanismos moleculares implicados.

En primer lugar, se observó una clara regulación de RANKL y osteoprotegerina (OPG), de manera que la osteoprotegerina aumenta su expresión en privación de Pi mientras que la expresión de RANKL disminuye y lo contrario sucede en las ratas alimentadas con 0,6% y 1,2% de Pi (Figura R27). El descubrimiento del sistema RANKL/RANK/OPG en la década de los 90 ha dado una mayor comprensión sobre la regulación de la remodelación ósea, la unión de RANKL con el receptor activador de NF- κ B (RANK) regula la formación, activación y supervivencia de osteoclastos, mientras que la osteoprotegerina se ha descrito como un agente protector del hueso frente a un exceso en la resorción ósea mediante la unión a RANKL, impidiendo su adhesión RANK (178).

Acompañando al aumento de la expresión de OPG en respuesta a la privación de Pi, se observó disminución en la expresión de osteopontina y osteocalcina (Figura R27) ambos factores relacionados con la formación ósea y procesos de mineralización, pero que presentan cierta controversia en cuanto a sus efectos y mecanismos de acción.

La osteocalcina se presenta como uno de los componentes principales de la matriz extracelular del hueso, por lo que ha sido considerada un marcador de formación ósea (179). No obstante, se ha visto que los ratones *knock-out* para osteocalcina muestran un aumento de masa ósea y una mejora de los parámetros biomecánicos del hueso (180), lo cual indica que actúa como un estímulo negativo frente a la formación ósea. Estudios más recientes relacionan dicha acción con la maduración de osteoclastos, pese a ello también se ha demostrado que la deficiencia de osteocalcina no supone cambios en la estructura y mineralización ósea (181,182).

De la misma manera, la osteopontina presenta efectos contradictorios en función del estudio. Esta citoquina secretada por osteoblastos induce la migración y adhesión de osteoclastos (183) y su sobreexpresión se ha relacionado con el riesgo de osteoporosis (184). Sin embargo, su posible efecto sobre osteoblastos no está claro ya que existen estudios contradictorios que hablan tanto de estimulación como de

inhibición de su proliferación, así como ausencia de efecto sobre osteoblastos pero con consecuencias positivas sobre la mineralización ósea (185–187).

Por otro lado, el análisis de la ruta Wnt no aportó demasiada información, ya que ninguno de sus componentes sufrió cambios en su expresión, a excepción de sFRP4 (Figura R28). La ruta Wnt a través de su vía canónica ha demostrado ser un mecanismo importante en el desarrollo y mantenimiento del hueso, de ahí que alteraciones en alguno de sus componentes supongan un gran número de enfermedades óseas (188). La activación de esta ruta produce la disminución en la fosforilación de β -catenina y consecuentemente reduce su degradación por proteosomas, de manera que se acumula en el citoplasma. Posteriormente, se transloca al núcleo, donde regula la expresión genética a través de la activación de diversos factores de transcripción, entre ellos Runx2 que favorecen la diferenciación de los precursores osteoblásticos. Por el contrario, los inhibidores de la ruta Wnt tienen un efecto negativo sobre la supervivencia de los osteoblastos (189). Sin embargo, en nuestro experimento, únicamente se observó un aumento en la expresión de sFRP4 en el caso de ratas alimentadas con 1,2% de Pi en el pienso (Figura R28).

En definitiva, se presentan mínimos cambios en la expresión génica de determinados factores, de los cuales queda pendiente conocer si se traducen en un cambio en su expresión proteica.

PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR NAD

En este estudio nos hemos centrado en los trabajos previos del grupo del Prof. Thomas Dousa (116,118) en los cuales proponían la inhibición competitiva y directa de NAD⁺ y NADH en BBMV de corteza renal de rata.

A pesar de haber sido previamente publicada, la inhibición del transporte de Pi en BBMV de corteza renal y yeyuno por parte de NAD⁺ y NADH necesitó, sorprendentemente, de la preincubación de los compuestos bien a temperatura ambiente o en hielo (Figura R29), pese a tener un carácter de tipo competitivo (Figura R32). Además, la inhibición fue específica para el transporte de Pi sodio dependiente (Figura R30). Sin embargo, NAM en ningún caso fue capaz de inhibir el transporte de Pi *in vitro*, pese a ser un conocido inhibidor *in vivo* (114,123). Por lo tanto, los resultados observados hasta el momento demostrarían que NAM precisaría de mecanismos moleculares propios de organismos vivos como la enzima Nampt, clave en la síntesis de NAD, para poder realizar dicho efecto (117,119).

En función de los resultados obtenidos, el efecto inhibitorio de NAD sobre el transporte sodio dependiente de Pi es independiente del estado de oxidación-reducción del inhibidor, ya que tanto NAD⁺ como NADH son capaces de producirlo. Pese a ello, la forma oxidada de NAD sería más efectiva debido a la menor IC₅₀ obtenida en ambos tejidos, corteza renal y yeyuno (Figura R31). En cuanto al análisis cinético, se confirmó el tipo de inhibición competitiva mediante regresión no lineal (118). La afinidad por Pi disminuyó en presencia de NAD (Figura R32), a pesar de la muy diferente estructura química de NAD⁺/NADH en comparación a la del fosfato.

Sin embargo, la inhibición no parece actuar directamente sobre los cotransportadores Na/Pi tipo II o tipo III, ya que además del hecho de precisar de preincubación para obtener la inhibición en las BBMV (Figura R29); el transporte de Pi en los ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan dichos transportadores no se ve afectado por la presencia de NAD⁺ o NADH (Figura R33).

Por otro lado, la necesidad de preincubar NAD en las BBMV para conseguir el efecto inhibitorio supone la implicación de mecanismos enzimáticos o de otra índole que posibiliten dicho efecto. Aunque el hecho de que la preincubación pueda realizarse en hielo (Figura R29 B), supondría la ralentización o incluso la inhibición de reacciones de tipo enzimático. Por lo tanto, descartada la mayor parte de los procesos de tipo enzimático, una de las principales posibilidades sería la ADP ribosilación por dos razones principales. Por un lado, es una reacción que precisa de la presencia de NAD⁺ o NADH, pero no de NAM. Además, algunas de las ADP ribosiltransferasas (ART) pueden actuar en frío y producir ribosilación *in vitro* (138).

Entre las enzimas capaces de producir ribosilación se encuentran las ARTDs (ART *diphtheria toxin like*), las ARTCs (ART *cholera toxin like*) y dos miembros de la familia de las sirtuinas (SIRT4 y SIRT6) (190). En este estudio nos centramos en las ARTCs (ART1-ART4), también llamadas ecto-ARTs, que se expresan en la membrana celular de múltiples epitelios entre los que se encuentran riñón, duodeno, yeyuno y pulmón; e incluso pueden estar presentes en el líquido extracelular, a diferencia de las ARTDs que son intracelulares (191). Incluso se ha descrito la capacidad de ART2.2 de producir ribosilación de proteínas en cultivos primarios de células T de ratón mediante incubación con NAD-³²P durante 20 minutos a 4°C (140).

En consecuencia, se estudió la posibilidad de que una reacción de ribosilación fuera la responsable del mecanismo de inhibición del transporte de Pi. Sin embargo, tras un mes de exposición de la película radiográfica a las membranas con las proteínas inmunoprecipitadas y supuestamente ribosiladas, no se encontraron signos de ribosilación con ³²P-NAD de NaPi-IIa y NaPi-IIb (Figura R34 A).

Además, para confirmar el resultado negativo y eliminar la posibilidad de que otras proteínas relacionadas con los transportadores de Pi fueran las ribosiladas, se utilizaron varios inhibidores farmacológicos de la ribosilación en BBMV de corteza renal. Los inhibidores probados fueron MIBG, novobiocina y vitamina K₁, que tienen una mayor especificidad por la inhibición de la mono-ADP-ribosilación propia de las ARTCs; y vitamina K₃ y 3-metoxibenzamida, capaces de inhibir también la poli-ADP-ribosilación (193–195). El uso de los diferentes compuestos no fue capaz de revertir el efecto

inhibitorio de NAD^+ sobre el transporte de Pi (Figura R34 B). No obstante, si se observan diversas bandas en el lisado total incubado con ^{32}P -NAD, indicando la presencia de proteínas ribosiladas en las vesículas (Figura R34 A), pero que no estarían implicadas en la inhibición del transporte producido por NAD^+ , ya que el uso de inhibidores de la ribosilación no revierte el efecto.

Otros posibles efectos posttraduccionales en los que se ha descrito la implicación del sistema NAD^+/NADH además de la ribosilación, serían la desacetilación de proteínas y la modificación del potencial redox (196). En concreto, se ha demostrado que NAM es capaz de producir un efecto oxidativo en BBMV de corteza renal junto con la inhibición del transporte de Pi, siendo solo revertida con la adición de DTT que actúa a modo de agente reductor (122). Otras teorías en cuanto al mecanismo de acción de NAD^+ , postulan la posibilidad de que NAD^+ en el interior celular se transforme en ribosa ADP cíclica, que a su vez produzca la movilización de los depósitos de calcio intracelulares y ocasione la translocación de los transportadores sodio dependientes de la familia Slc34 de la membrana plasmática (197). Sin embargo, no ha sido demostrada y se desconocería el mecanismo por el cual se produciría la entrada de NAD^+ al interior celular ya que NAD^+/NADH son impermeables a la membrana plasmática.

Sin embargo, sí se ha demostrado la unión directa de NAD^+/NADH a las vesículas (198), reacción que alcanza el equilibrio a 20°C tras 15 minutos de incubación con NAD^+ , indicando la posible acción directa de NAD^+ sobre las BBMV. Posteriormente, Gmaj et al. (199) vieron que no se producía inhibición del transporte de Pi en BBMV cuando NAD^+ estaba presente en el interior de las vesículas exclusivamente. Por lo tanto, la unión de NAD^+ a proteínas presentes en la membrana plasmática es un punto clave en la regulación de los transportadores de Pi. Además, existen múltiples estudios que describen la unión de NAD^+ a diferentes proteínas de membrana como CD38, clave en la hidrólisis de NAD^+ en el medio extracelular; o diversos canales iónicos (196).

En función de los resultados obtenidos, esta posible proteína de membrana a la que se podría unir NAD debería ser capaz de modular la actividad de los transportadores de Pi y no encontrarse presente de forma endógena en los ovocitos de *Xenopus laevis*. La identificación de las proteínas de membrana a las cuales se unen $\text{NAD}^+/\text{NADH}/\text{NAM}$ para

realizar su función sería un paso clave para entender el mecanismo de acción de este sistema.

3. 1. REGULACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE NAD EN CORTEZA RENAL Y YEYUNO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO EN LA DIETA

Como ya hemos comentado en la sección anterior, la inhibición del transporte de Pi por NAD⁺/NADH en BBMV es de tipo competitivo. Sin embargo, la inyección de NAM *in vivo* produce la inhibición de tipo no competitivo del transporte de Pi sodio-dependiente (118). Por lo tanto, *in vivo* NAM podría estar actuando aumentando la concentración del NAD⁺ intracelular gracias a la acción de la enzima Nampt (119,120). Por ello se procedió a cuantificar la concentración total de NAD en corteza renal y yeyuno, aprovechando los tejidos obtenidos en el experimento de adaptaciones agudas a cambios en la concentración del fosfato en la dieta.

Los resultados mostraron únicamente una disminución en la concentración de NAD total (incluye NAD⁺/NADH) en corteza renal en las ratas alimentadas con una dieta de 0,1% de Pi restringida a 4 horas al día (Figura R35). No obstante, dicho mecanismo se produce exclusivamente en riñón ya que en intestino no encontramos dicha regulación. En esas ratas la reabsorción renal de Pi se encuentra aumentada, por lo cual de tener NAD efecto inhibitorio sobre el transporte de Pi, sería beneficioso el descenso de este en el tejido. Este resultado nos lleva a pensar en la posibilidad de que o bien se produzca un descenso en la producción de NAD mediante la disminución de la acción de la enzima Nampt o bien un aumento en su degradación. Más concretamente, se han descrito cambios en la actividad de la enzima Nampt renal y en consecuencia cambios en la concentración de NAD en respuesta a otros estímulos como la hepatectomía parcial (119).

PARTE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR FUROSEMIDA

La furosemida es conocida por ser un potente diurético que actúa mediante la inhibición del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) presente en el segmento ascendente del asa de Henle, aumentando la excreción urinaria de sodio, cloro, potasio, calcio y magnesio. Solo unos pocos estudios muestran efecto de la furosemida sobre la excreción renal de Pi (200,201). Su uso principal reside en el tratamiento de edemas asociados a insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática y enfermedad renal entre otras causas, así como el tratamiento de la hipertensión leve y moderada (202).

En nuestros estudios, la furosemida actuó únicamente sobre los transportadores Na/Pi de la familia Slc34, NaPi-IIa, NaPi-IIb y NaPi-IIc (Figura R36) inhibiendo el transporte de Pi con un modelo de inhibición de tipo competitivo (Figura R38), lo cual es curioso dado que la estructura química del compuesto no presenta similitudes con la del fosfato (Figura D2).

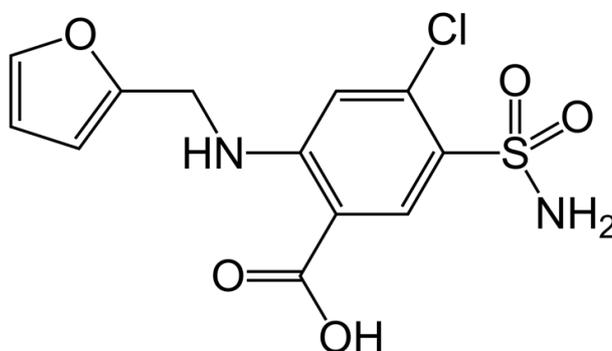


Figura D2: Estructura química de la furosemida ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$).

El estudio *in vivo* con ratas tratadas con furosemida, mostró por un lado el efecto diurético esperable de la furosemida por el que es ampliamente conocida y utilizada en la clínica, pero también un aumento en la excreción renal de Pi (Figura R40 C y D). Sin embargo, en un gran número de estudios realizados en diferentes especies, con diferentes dosis de furosemida y diferentes vías de administración, no se observaron cambios en la excreción renal de Pi. Incluso en alguno de ellos observaron disminución en la excreción renal de Pi (203–207). Solo unos pocos estudios han descrito este

aumento, más concretamente en humanos con la administración de furosemida intravenosa a una dosis de 40 mg/kg (200,201).

Por lo tanto, los cambios observados en la excreción renal junto con las observaciones *in vitro* indican la posibilidad de que dicho aumento en la excreción renal de Pi sea originado mediante la inhibición de la reabsorción de Pi en el túbulo proximal a través de la inactivación de NaPi-IIa y NaPi-IIc.

Por otro lado, la concentración de Pi en las heces no se ve modificada en las ratas tratadas con furosemida (Figura R40 B), por lo que pese a encontrar inhibición del transporte de Pi a través de NaPi-IIb *in vitro*, no parece tener una repercusión *in vivo*. Esto podría deberse al mecanismo de absorción de Pi en el intestino, ya que con concentraciones normales o elevadas de Pi en la dieta la vía paracelular podría estar supliendo el descenso en la absorción de Pi por la vía transcelular debida a la inhibición de NaPi-IIb en caso de que esta se produjera. Por ejemplo, el ratón carente de NaPi-IIb solo muestra descenso en la concentración de Pi en plasma cuando es adaptado a una dieta con bajas concentraciones de Pi, por lo cual le atribuyen una mayor importancia en la privación de Pi (17). Además, NaPi-IIb presentó una IC₅₀ mayor que NaPi-IIa y NaPi-IIc (Figura R37) y solo se observó una inhibición del 50% a 5 mM de furosemida (Figura R36). Por lo tanto, los datos obtenidos en la inhibición de furosemida sobre NaPi-IIb sumado a que es el transportador con mayor afinidad por el Pi, justificarían la ausencia de cambios en la absorción intestinal.

PARTE 5. BÚSQUEDA DE NUEVOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SLC4A1

5. 1. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE FOSFATO PROVOCADA POR LA EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

En estudios previos de este grupo de investigación se realizó la caracterización del transporte de Pi sodio independiente en células CacoBBE. Dicho transporte fue inhibido parcialmente por bicarbonato, sulfato, oxalato, DIDS y SITS (99), lo cual indica la posible implicación en el transporte de Pi de intercambiadores de aniones como el bicarbonato. Por esa razón, se decidió analizar la familia Slc4, ya que estos transportadores son conocidos por ser capaces de transportar bicarbonato (HCO_3^-) o carbonato (CO_3^{2-}) con al menos un ion monoatómico (ya sea Na^+ o Cl^-). Además, todos los miembros que la forman son transportadores presentes en la membrana plasmática de diferentes tejidos (208). Como puede observarse en la Figura R41 de todos los transportadores de la familia Slc4, solo Slc4a1 produjo variaciones en el transporte de Pi respecto a los ovocitos inyectados con agua. Por lo tanto, se procedió a evaluar la posible implicación de Slc4a1 en el transporte de Pi.

El intercambiador de aniones Slc4a1, también conocido como AE1 o Band 3, es una glicoproteína presente principalmente en la membrana plasmática de los eritrocitos y en las células α intercalares de tipo A (208). Además, se ha descrito expresión de mRNA en corazón y colon, entre otros tejidos (209).

El mecanismo de acción principal de AE1 consiste en intercambiar bicarbonato (HCO_3^-) por cloro (Cl^-) con un gradiente electroneutro por lo que la dirección del intercambio dependerá del gradiente químico transmembrana (208). Mínimas variaciones se han observado en cuanto a su transporte, ya que se ha descrito su capacidad para transportar OH^- en lugar de Cl^- y el cotransporte de SO_4^{2-} con H^+ en intercambio con el anión Cl^- (210,211). De forma excepcional, se ha observado que algunas variantes de AE1 pertenecientes a peces y ciertas mutaciones son capaces de modificar el patrón de transporte característico provocando que Slc4a1 transporte

cationes como Na^+ y K^+ (212,213). En cuanto a su implicación con el transporte de Pi , se ha descrito con anterioridad en estudios *in vitro* con el uso de cultivos primarios de eritrocitos la capacidad de Slc4a1 de transportar Pi (214,215).

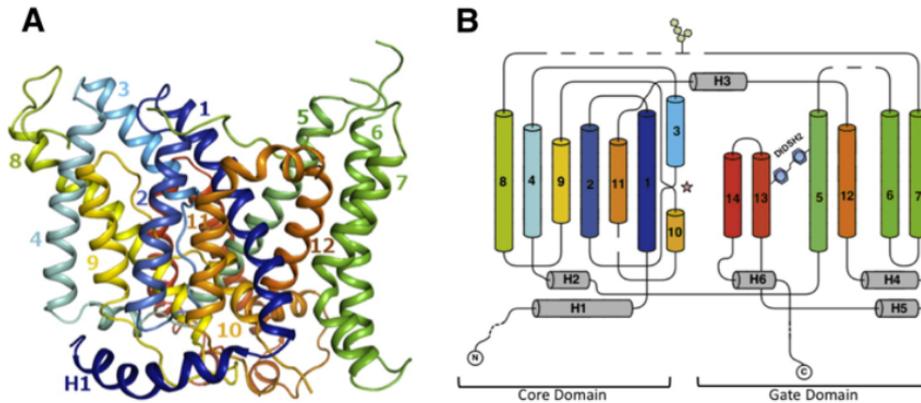


Figura D3: Estructura tridimensional y diagrama bidimensional de la glicoproteína transmembrana Slc4a1 formada por 14 dominios transmembrana. Imagen obtenida de Reithmeier et al. (2016)

Las funciones principales de Slc4a1 descritas guardan relación con la reabsorción renal del bicarbonato y con el transporte de CO_2 de los tejidos a los pulmones a través de la circulación sanguínea. Más concretamente, el CO_2 que se encuentra en alta concentración en los tejidos difunde al interior de los glóbulos rojos donde gracias a la anhidrasa carbónica se transforma en bicarbonato y H^+ . Este incremento en la concentración intracelular de H^+ produce que el oxígeno (O_2) se suelte de la hemoglobina y llegue a los tejidos. En este proceso AE1 se encuentra sacando del interior de los eritrocitos el exceso de iones bicarbonato generados. Asimismo, el proceso se revierte en los pulmones, donde el CO_2 es liberado al plasma sanguíneo y difunde a través de los alveolos pulmonares donde es eliminado mediante la respiración (216). Por otro lado, Slc4a1 se encuentra en la membrana basolateral de las células α intercalares de tipo A, localizadas en la parte final del túbulo contorneado distal y en los túbulos colectores. En ellas es un elemento clave en la reabsorción del bicarbonato del interior celular a la circulación sanguínea (217).

En este estudio, la expresión de Slc4a1 supuso un descenso de en torno al 50% en el transporte endógeno de Pi por parte de los ovocitos en presencia de sodio respecto a los ovocitos inyectados con agua (Figura R42 A y R43 A). Por lo tanto, los resultados indican que Slc4a1 podría actuar como un transportador de salida de Pi . Sin embargo, la

disminución en el transporte de Pi solo apareció cuando el protocolo se realizó en presencia de NaCl y no cuando este fue sustituido por colina, potasio o litio (Figura R42 A). Esta situación se debe a que el fosfato entra en el interior del ovocito mediante cotransportadores sodio dependientes de Pi endógenos presentes en la membrana de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

Además, pese a que Slc4a1 es un conocido intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, el efecto que parece tener sobre el transporte de Pi es cloro independiente (Figura R43 B). Para corroborar dicho efecto se usaron inhibidores como, DIDS y SITS, ambos derivados del estilbena, que disminuyen la afinidad del Cl^- por el transportador (218), DP y DFNB que impiden la unión del Cl^- produciendo un cambio en la conformación del intercambiador (216), y ácido niflúmico que inhibe el intercambio de aniones (219). Ninguno de ellos revirtió el efecto de Slc4a1 sobre la acumulación de Pi en los ovocitos (Figura R45) corroborando el efecto cloro independiente, lo cual coincide con estudios anteriores donde postulaban la posibilidad de que el Pi fuera transportado mediante difusión lenta a través del punto de unión del bicarbonato sin necesidad de la presencia de cloro (214).

Los resultados obtenidos señalan a Slc4a1 como un transportador de salida de Pi, pero en la inyección de ^{32}P no se observó esta salida, o que al menos fuera de mayor intensidad que la del propio ovocito, incluso tras 4 horas. Este resultado podría deberse al tamaño del ovocito, ya que su diámetro es de 1 mm aproximadamente, unas 100 veces mayor que el tamaño de una célula eucariota que es de apenas unas 10 micras. Podría suceder que la nanoinyección de la solución de transporte en el polo vegetal del ovocito introduzca el ^{32}P demasiado lejos de la membrana y de su zona subyacente donde podría darse la salida de Pi y por ello no ser capaces de detectarlo. Además, el método de inyección no nos permite controlar la profundidad a la cual inyectamos la solución, por lo tanto, de ser este el motivo, no podría ser resuelto. También podría ocurrir que la salida de ^{32}P por el orificio de la inyección fuera muy superior a la debida a Slc4a1, pero esto no se ha observado en otros casos, en los que el cierre por reparación del orificio es muy rápido (220). En cualquier caso, resulta sorprendente el efecto de Slc4a1, que consigue anular completamente la actividad de NaPi-IIa y Pit-1 expresados en los ovocitos (Figura R44).

En definitiva, Slc4a1 presenta un transporte de Pi de salida y parece actuar a modo de canal ya que actúa con independencia de cloro y otros aniones y cationes y su actividad no es regulada por ninguno de los inhibidores conocidos del AE1.

5. 2. EXPRESIÓN DE SLC4A1 EN RATA ADAPTADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO EN LA DIETA

Con el fin de conocer la relevancia que podría tener Slc4a1 en el transporte de Pi *in vivo* se analizó la expresión de RNA y proteína de Slc4a1 en varios tejidos de ratas adaptadas a diferentes concentraciones de Pi en la dieta.

Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de Slc4a1 entre los diferentes grupos en los tejidos analizados, en este caso yeyuno y corteza renal (Figura R48). No obstante, dado que el análisis de la expresión no mostró diferencias, podría ser interesante conocer su localización en el tejido mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia con el fin de analizar posibles modificaciones en su distribución. Además, su distribución en la membrana basolateral, presenta interesantes posibilidades ya que se desconoce la identidad de los transportadores de Pi encargados de la salida de Pi de las células.

En definitiva, la relevancia del transportador Slc4a1 en la homeostasis del Pi parece ser limitada al menos con los resultados obtenidos hasta el momento y quedaría pendiente de analizar su expresión en otros tejidos incluidos colon, médula renal o corazón, donde se ha encontrado una expresión elevada de este transportador (209). Aunque cabe destacar que el ratón *knock-out* muestra un cuadro patológico que incluye acidosis metabólica hiperclorémica con presencia de orina alcalina en ausencia de bicarbonaturia, con hipercalciuria e hiperfosfaturia (221). Además, estos animales presentan depósitos de fosfato cálcico en la médula renal y un ligero aumento de la concentración de Pi en sangre, lo cual indica un posible efecto de Slc4a1 sobre la homeostasis del Pi.

VI. CONCLUSIONES

ADAPTACIONES A CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL FOSFATO EN LA DIETA

- En las ratas PTX desaparece la regulación del transporte de Pi en la corteza renal a cambios agudos en la concentración de Pi en la dieta, corroborando el papel principal de PTH, por encima de FGF-23.
- La adaptación del transporte de Pi intestinal no se ve modificada en ausencia de PTH, lo cual descarta un posible efecto directo de PTH sobre la absorción intestinal. Además, la expresión del transportador NaPi-IIb se regula en función de la concentración de Pi en la dieta, incluso en cambios agudos y con independencia de PTH y vitamina D₃.
- La PTH es un importante estímulo en la producción de FGF-23, ya que disminuye su producción en las ratas PTX, pero no parece ser imprescindible ya que la concentración en plasma es modificada en ausencia de PTH, directa o indirectamente, gracias a los cambios en la concentración plasmática de Pi.
- La privación de Pi en células OK produce el aumento en la expresión de NHE3 y de su forma inactiva fosforilada, que parece no traducirse en un aumento en su actividad ya que tienen una adaptación deficiente a cambios en el pH.
- En células OK la disminución de los valores intracelulares de amoníaco indica una posible disminución en su producción, ya que la capacidad de transporte no se modifica.
- La expresión de NHE3 en ratas alimentadas con 0,1% de Pi durante 1 semana reproduce los datos obtenidos en células OK, pero no tras 8 semanas descartando la hipótesis de que la inhibición de la actividad o expresión de NHE3 sea el causante de la bicarbonaturia resultante.
- Los cambios en la estructura ósea aumentan con 8 semanas de privación de Pi, causando una remodelación ósea que se traduce en una disminución del hueso cortical y un aumento del hueso trabecular.

CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE FOSFATO POR NAD Y FUROSEMIDA

- El mecanismo de inhibición de NAD⁺ y NADH sobre el transporte de Pi en BBMV requiere de preincubación, es de tipo competitivo y puede actuar tanto a temperatura ambiente como a 4°C. Sin embargo, NAM carece de efecto.
- No se han encontrado evidencias de que el mecanismo de inhibición de NAD se produzca a partir de la ribosilación de los transportadores NaPi-IIa y NaPi-IIb.
- Ninguno de los tres compuestos utilizados NAD⁺/NADH/NAM ha sido capaz de inhibir el transporte de Pi en ovocitos de *Xenopus Laevis* que expresaban los diferentes transportadores sodio dependientes de Pi conocidos, indicando su actuación mediante algún mecanismo no presente en los ovocitos de rana.
- La furosemida inhibe el transporte de Pi en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan los transportadores de la familia Slc34 (NaPi-IIa, NaPi-IIb y NaPi-IIc) y el mecanismo de inhibición por el cual actúa sobre NaPi-IIa es de tipo competitivo.
- El tratamiento con furosemida en ratas provoca el aumento en la excreción renal de Pi, por lo que podría estar actuando mediante la inhibición de la reabsorción renal de Pi a través de los transportadores NaPi-IIa y NaPi-IIc.
- La falta aparente de efecto sobre la absorción intestinal coincide con la menor inhibición de furosemida sobre NaPi-IIb junto con una mayor IC₅₀, así como la limitada relevancia de NaPi-IIb en la absorción intestinal de Pi.

BÚSQUEDA DE NUEVOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SLC4A1

- El intercambiador Slc4a1 parece actuar como un canal de salida de Pi, ya que no es afectado por variaciones de cloro y los diferentes inhibidores conocidos del transportador no producen ningún efecto sobre dicha salida de Pi.
- La expresión de Slc4a1 en yeyuno y corteza renal no se ve modificada en respuesta a cambios en la concentración de Pi en la dieta, lo cual indicaría que la regulación de su actividad no es necesaria para el control homeostático del Pi.

VII. REFERENCIAS

1. Penido M, Grogan M, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol*. 2012;2039–48.
2. Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL. *Brenner and Rector's The Kidney*. 10th Ed. Elsevier; 2016. 2636 p.
3. Komaba H, Fukagawa M. Phosphate—a poison for humans? *Kidney Int*. 2016 Oct;90(4):753–63.
4. Berner W, Kinne R, Murer H. Phosphate transport into brush-border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biochem J*. 1976;160(3):467–74.
5. Tenenhouse HS, Martel J. Renal adaptation to phosphate deprivation: lessons from the X-linked Hyp mouse. *Pediatr Nephrol*. 1993;7(3):312–8.
6. Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, et al. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 protein) is a Cl-dependent urate exporter. *J Biol Chem*. 2010;285(34):26107–13.
7. Villa-Bellocosta R, Sorribas V. Different effects of arsenate and phosphonoformate on Pi transport adaptation in opossum kidney cells. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2009;297(3).
8. Wagner CA, Hernando N, Forster IC, Biber J. The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2013;466(1):139–53.
9. Beck L. Expression and function of Slc34 sodium–phosphate co-transporters in skeleton and teeth. Vol. 471, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Springer Verlag; 2019. p. 175–84.
10. Forster IC, Loo DDF, Eskandari S. Stoichiometry and Na⁺ binding cooperativity of rat and flounder renal type II Na⁺-Pi cotransporters. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1999;276(4 45-4).
11. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):5372–7.
12. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(1):22–44.

13. Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, Biber J. Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(24):14564–9.
14. Andrini O, Ghezzi C, Murer H, Forster IC. The leak mode of type II Na⁺-Pi cotransporters. *Channels*. 2008;2(5):346–57.
15. Murer H, Forster I, Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;447(5):763–7.
16. Hernando N, Myakala K, Simona F, Knöpfel T, Thomas L, Murer H, et al. Intestinal depletion of NaPi-IIb/Slc34a2 in mice: Renal and hormonal adaptation. *J Bone Miner Res*. 2015;30(10):1925–37.
17. Knöpfel T, Pastor-Arroyo EM, Schnitzbauer U, Kratschmar D V., Odermatt A, Pellegrini G, et al. The intestinal phosphate transporter NaPi-IIb (Slc34a2) is required to protect bone during dietary phosphate restriction. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
18. Bacconi A, Virkki L V., Biber J, Murer H, Forster IC. Renouncing electroneutrality is not free of charge: Switching on electrogenicity in a Na⁺-coupled phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(35):12606–11.
19. Biber J, Hernando N, Forster I. Phosphate Transporters and Their Function. *Annu Rev Physiol*. 2013;75(1):535–50.
20. Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Ostí JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, et al. SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet*. 2006;78(2):179–92.
21. Ravera S, Virkki L V., Murer H, Forster IC. Deciphering PiT transport kinetics and substrate specificity using electrophysiology and flux measurements. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;293(2).
22. Villa-Bellosta R, Ravera S, Sorribas V, Stange G, Levi M, Murer H, et al. The Na⁺-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009;296(4):691–9.
23. Giral H, Caldas Y, Sutherland E, Wilson P, Breusegem S, Barry N, et al. Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate.

- Am J Physiol Renal Physiol. 2009;297(5):F1466–75.
24. Couasnay G, Bon N, Devignes C-S, Sourice S, Bianchi A, Véziers J, et al. PiT1/Slc20a1 Is Required for Endoplasmic Reticulum Homeostasis, Chondrocyte Survival, and Skeletal Development. *J Bone Miner Res.* 2019;34(2):387–98.
 25. Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, et al. Molecular Cloning and Hormonal Regulation of PiT-1, a Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter from Rat Parathyroid Glands. *Endocrinology.* 1998;139(4):1692–9.
 26. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost.* 2010;104(3):464–70.
 27. Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1030–6.
 28. Levine BS, Ho LD, Pasiiecznik K, Coburn JW. Renal adaptation to phosphorus deprivation: Characterization of early events. *J Bone Miner Res.* 2009;1(1):33–40.
 29. Levi M, Lötscher M, Sorribas V, Custer M, Arar M, Kaissling B, et al. Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal Pi transporter to alterations in dietary Pi. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol.* 1994;267(5):F900–8.
 30. Keusch I, Traebert M, Lötscher M, Kaissling B, Murer H, Biber J. Parathyroid hormone and dietary phosphate provoke a lysosomal routing of the proximal tubular Na/Pi-cotransporter type II. *Kidney Int.* 1998;54(4):1224–32.
 31. Segawa H, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Shono M, Yamamoto T, et al. Internalization of renal type IIc Na-Pi cotransporter in response to a high-phosphate diet. *Am J Physiol Physiol.* 2005;288(3):F587–96.
 32. Lötscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M. Role of microtubules in the rapid regulation of renal phosphate transport in response to acute alterations in dietary phosphate content. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1302–12.
 33. Ritthaler T, Traebert M, Lötscher M, Biber J, Murer H, Kaissling B. Effects of phosphate intake on distribution of type II Na/Pi cotransporter mRNA in rat

- kidney. *Kidney Int.* 1999;55(3):976–83.
34. Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, et al. Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287(1):F39–47.
 35. Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, et al. Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1-alpha-OHase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(2 57-2):429–34.
 36. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J bone Miner Res.* 1996;11(7):970–6.
 37. Burnett SAM, Gunawardene SC, Bringhurst FR, Jüppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res.* 2006;21(8):1187–96.
 38. Jain A, Fedarko NS, Collins MT, Gelman R, Ankrom MA, Tayback M, et al. Serum levels of Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4158–61.
 39. Vervloet MG, Van Ittersum FJ, Büttler RM, Heijboer AC, Blankenstein MA, Ter Wee PM. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(2):383–9.
 40. O'Brien CA, Jilka RL, Fu Q, Stewart S, Weinstein RS, Manolagas SC. IL-6 is not required for parathyroid hormone stimulation of RANKL expression, osteoclast formation, and bone loss in mice. *Am J Physiol Metab.* 2005;289(5):E784–93.
 41. O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, et al. Control of Bone Mass and Remodeling by PTH Receptor Signaling in Osteocytes. Jin D-Y, editor. *PLoS One.* 2008;3(8):e2942.
 42. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007;40(6):1434–46.
 43. Jankowski M, Biber J, Murer H. PTH-induced internalization of a type IIa Na/Pi cotransporter in OK-cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 1999;438(5):689–93.
 44. Picard N, Capuano P, Stange G, Mihailova M, Kaissling B, Murer H, et al. Acute

- parathyroid hormone differentially regulates renal brush border membrane phosphate cotransporters. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2010;460(3):677–87.
45. Traebert M, Völkl H, Biber J, Murer H, Kaissling B. Luminal and contraluminal action of 1-34 and 3-34 PTH peptides on renal type IIa Na-Pi cotransporter. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2000;278(5):F792–8.
 46. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int*. 2006;70(9):1548–59.
 47. Lederer ED, Khundmiri SJ, Weinman EJ. Role of NHERF-1 in regulation of the activity of Na-K ATPase and sodium-phosphate co-transport in epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(7):1711–9.
 48. Burnett-Bowie S-AM, Henao MP, Dere ME, Lee H, Leder BZ. Effects of hPTH(1-34) Infusion on Circulating Serum Phosphate, 1,25-Dihydroxyvitamin D, and FGF23 Levels in Healthy Men. *J Bone Miner Res*. 2009;24(10):1681–5.
 49. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many 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*. 2010;299(4):F882–9.
 50. Thomas L, Bettoni C, Knöpfel T, Hernando N, Biber J, Wagner CA. Acute Adaption to Oral or Intravenous Phosphate Requires Parathyroid Hormone. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(3):903–14.
 51. Bourgeois S, Capuano P, Stange G, Mühlemann R, Murer H, Biber J, et al. The phosphate transporter NaPi-IIa determines the rapid renal adaptation to dietary phosphate intake in mouse irrespective of persistently high FGF23 levels. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2013;465(11):1557–72.
 52. Scanni R, VonRotz M, Jehle S, Hulter HN, Krapf R. The Human Response to Acute Enteral and Parenteral Phosphate Loads. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2730–9.
 53. Camalier CE, Yi M, Yu LR, Hood BL, Conrads KA, Lee YJ, et al. An integrated understanding of the physiological response to elevated extracellular phosphate. *J Cell Physiol*. 2013;228(7):1536–50.
 54. Pike JW, Christakos S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(4):815–43.

55. Kabakoff B, Kendrick NC, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-stimulated active uptake of phosphate by rat jejunum. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1982;243(6):E470–E475.
56. Hildmann B, Storelli C, Danisi G, Murer H. Regulation of Na⁺ - P(i) cotransport by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rabbit duodenal brush-border membrane. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 1982;242(5):G533-9.
57. Hattenhauer O, Traebert M, Murer H, Biber J. Regulation of small intestinal Na-P(i) type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. *Am J Physiol Liver Physiol.* 1999;277(4):G756–62.
58. Friedlaender MM, Wald H, Dranitzki-Elhalel M, Zajicek HK, Levi M, Popovtzer MM. Vitamin D reduces renal NaPi-2 in PTH-infused rats: complexity of vitamin D action on renal Pi handling. *Am J Physiol Physiol.* 2001;281(3):F428–33.
59. Kurnik BRC, Hruska KA. Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1985;817(1):42–50.
60. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25- dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(17):8097–101.
61. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ upregulates FGF23 gene expression in bone: The final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(6 52-6):1036–42.
62. Econs MJ, Drezner MK. Tumor-Induced Osteomalacia - Unveiling a New Hormone. *N Engl J Med.* 1994;330(23):1679–81.
63. Wesseling-Perry K. FGF-23 in bone biology. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(4):603–8.
64. Ho BB, Bergwitz C. FGF23 signalling and physiology. *J Mol Endocrinol.* 2020;66(2):R23–32.
65. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J Biol Chem.* 2006;281(10):6120–3.
66. Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol*

- Metab. 2008;19(7):239–45.
67. Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*. 2012;51(3):621–8.
 68. Erben RG, Andrukhova O. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. *Bone*. 2017;100:62–8.
 69. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(2):409–14.
 70. Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V, Quigley R. Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney Int*. 2005;68(3):1148–53.
 71. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2003;19(3):429–35.
 72. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009;297(2):282–91.
 73. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45–51.
 74. Ide N, Olauson H, Sato T, Densmore MJ, Wang H, Hanai J ichi, et al. In vivo evidence for a limited role of proximal tubular Klotho in renal phosphate handling. *Kidney Int*. 2016;90(2):348–62.
 75. Perwad F, Zhang MYH, Tenenhouse HS, Portale AA. Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase expression in vitro. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2007;293(5):1577–83.
 76. Miyamoto KI, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial*. 2005;9(4):331–5.

77. Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H, Hirata M, Segawa H, et al. Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *J Biol Chem*. 2003 Jan 24;278(4):2206–11.
78. De Beur SMJ, Finnegan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, et al. Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Res*. 2002;17(6):1102–10.
79. Berndt TJ, Bialesz B, Craig TA, Tebben PJ, Bacic D, Wagner CA, et al. Secreted frizzled-related protein-4 reduces sodium-phosphate co-transporter abundance and activity in proximal tubule cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2006;451(4):579–87.
80. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest*. 2003;112(5):785–94.
81. Cho HY, Choi HJ, Sun HJ, Yang JY, An JH, Cho SW, et al. Transgenic mice overexpressing secreted frizzled-related proteins (sFRP)4 under the control of serum amyloid P promoter exhibit low bone mass but did not result in disturbed phosphate homeostasis. *Bone*. 2010;47(2):263–71.
82. Rowe PSN, De Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, et al. MEPE, a New Gene Expressed in Bone Marrow and Tumors Causing Osteomalacia. *Genomics*. 2000;67(1):54–68.
83. Marks J, Churchill LJ, Debnam ES, Unwin RJ. Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein Inhibits Phosphate Transport. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(12):2313–20.
84. Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J, Shimkets R. Fibroblast Growth Factor 7: An Inhibitor of Phosphate Transport Derived from Oncogenic Osteomalacia-Causing Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):1012–20.
85. Whyte MP, Zhang F, Wenkert D, Mumm S, Berndt TJ, Kumar R. Hyperphosphatemia with low FGF7 and normal FGF23 and sFRP4 levels in the circulation characterizes pediatric hypophosphatasia. *Bone*. 2020;134:115300.
86. Lu X, Hu MC. Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular

- Disease. *Kidney Dis.* 2017;3(1):15.
87. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010;24(9):3438–50.
 88. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):124–36.
 89. Alcalde AI, Sarasa M, Raldúa D, Aramayona J, Morales R, Biber J, et al. Role of Thyroid Hormone in Regulation of Renal Phosphate Transport in Young and Aged Rats. *Endocrinology.* 1999;140(4):1544–51.
 90. Hammerman MR. Interaction of insulin with the renal proximal tubular cell. *Am J Physiol.* 1985;249(1 Pt 2):F1–11.
 91. Abraham MI, McAteer JA, Kempson SA. Insulin stimulates phosphate transport in opossum kidney epithelial cells. *J Physiol Physiol.* 1990;258(6):F1592–F1598.
 92. Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Seikaly M, et al. Renal Na/H exchanger NHE-3 and Na-PO₄ cotransporter NaPi-2 protein expression in glucocorticoid excess and deficient states. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(9):1560–7.
 93. Bacic D, Capuano P, Baum M, Zhang J, Stange G, Biber J, et al. Activation of dopamine D1-like receptors induces acute internalization of the renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa in mouse kidney and OK cells. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2005;288(4):F740.
 94. Isaac J, Glahn RP, Appel MA, Onsgard M, Dousa TP, Knox FG. Mechanism of Dopamine Inhibition of Renal Phosphate Transport¹. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2(11):1601–7.
 95. Katai K, Miyamoto KI, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, et al. Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J.* 1999;343(3):705–12.
 96. Aloia JF, Yeh JK. Effect of hypophysectomy on intestinal phosphate absorption in rats. *Bone.* 1985;6(2):73–7.
 97. Eto N, Tomita M, Hayashi M. NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(3):217–21.

98. Marks J. The role of SLC34A2 in intestinal phosphate absorption and phosphate homeostasis. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2019;471(1):165–73.
99. Candéal E, Caldas YA, Guillén N, Levi M, Sorribas V. Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells. *AJP Cell Physiol*. 2014;307(12):C1113–22.
100. Giovannini D, Touhami J, Charnet P, Sitbon M, Battini JL. Inorganic Phosphate Export by the Retrovirus Receptor XPR1 in Metazoans. *Cell Rep*. 2013;3(6):1866–73.
101. Amasheh S, Fromm M, Günzel D. Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol*. 2011;201(1):133–40.
102. King AJ, Siegel M, He Y, Nie B, Wang J, Koo-McCoy S, et al. Inhibition of sodium/hydrogen exchanger 3 in the gastrointestinal tract by tenapanor reduces paracellular phosphate permeability. *Sci Transl Med*. 2018;10(456):6474.
103. Gaasbeek A, Meinders AE. Hypophosphatemia: An update on its etiology and treatment. *Am J Med*. 2005;118(10):1094–101.
104. Silver J, Kilav R, Sela-Brown A, Naveh-Many T. Molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Pediatr Nephrol*. 2000;14(7):626–8.
105. Knochel JP. Hypophosphatemia. *West J Med*. 1981;134(1):15.
106. Brautbar N, Carpenter C, Baczynski R, Kohan R, Massry SG. Impaired energy metabolism in skeletal muscle during phosphate depletion. *Kidney Int*. 1983;24(1):53–7.
107. Lichtman MA, Miller DR, Cohen J, Waterhouse C. Reduced red cell glycolysis, 2, 3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate concentration, and increased hemoglobin-oxygen affinity caused by hypophosphatemia. *Ann Intern Med*. 1971;74(4):562–8.
108. Gold LW, Massry SG, Arieff AI, Coburn JW. Renal bicarbonate wasting during phosphate depletion. A possible cause of altered acid base homeostasis in hyperparathyroidism. *J Clin Invest*. 1973;52(10):2556–62.
109. Goyal R, Jialal I. Hyperphosphatemia. Hughes E, Rubio G, editors. *StatPearls*. 2020;
110. Hruska KA, Sugatani T, Agapova O, Fang Y. The chronic kidney disease — Mineral

- bone disorder (CKD-MBD): Advances in pathophysiology. *Bone*. 2017;1–7.
111. Carfagna F, Vecchio L Del, Pontoriero G, Locatelli F. Current and potential treatment options for hyperphosphatemia. *Expert Opin Drug Saf*. 2018;17(6):597–607.
 112. Block GA, Rosenbaum DP, Yan A, Greasley PJ, Chertow GM, Wolf M. The effects of tenapanor on serum fibroblast growth factor 23 in patients receiving hemodialysis with hyperphosphatemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(2):339–46.
 113. Ginsberg C, Ix JH. Nicotinamide and phosphate homeostasis in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25(4):285–91.
 114. Katai K, Tanaka H, Tatsumi S, Fukunaga Y, Genjida K, Morita K, et al. Nicotinamide inhibits sodium-dependent phosphate cotransport activity in rat small intestine. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(5):1195–201.
 115. Wu KI, Bacon RA, Al-Mahrouq HA, Kempson SA. Nicotinamide as a rapid-acting inhibitor of renal brush-border phosphate transport. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1988;255(1 (24/1)).
 116. Kempson SA, Colon-Otero G, Ou SY, Turner ST, Dousa TP. Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide as an intracellular regulator of renal transport of phosphate in the rat. *J Clin Invest*. 1981;67(5):1347–60.
 117. Tatsumi S, Katai K, Kaneko I, Segawa H, Miyamoto K. NAD metabolism and the SLC34 family : evidence for a liver-kidney axis regulating inorganic phosphate. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2018;(Phosphate transport in Pflugers Archiv).
 118. Kempson SA, Turner ST, Yusufi AN, Dousa TP. Actions of NAD⁺ on renal brush border transport of phosphate in vivo and in vitro. *Am J Physiol Physiol*. 1985;249(6):F948–55.
 119. Nomura K, Tatsumi S, Miyagawa A, Shiozaki Y, Sasaki S, Kaneko I, et al. Hepatectomy-related hypophosphatemia: A novel phosphaturic factor in the liver-kidney axis. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(4):761–72.
 120. Miyagawa A, Tatsumi S, Takahama W, Fujii O, Nagamoto K, Kinoshita E, et al. The sodium phosphate cotransporter family and nicotinamide phosphoribosyltransferase contribute to the daily oscillation of plasma inorganic phosphate concentration. *Kidney Int*. 2018;93(5):1073–85.

121. Campbell PI, Abraham MI, Kempson SA. Increased cAMP in proximal tubules is acute effect of nicotinamide analogues. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol.* 1989;257(6):F1021–6.
122. Suzuki M, Capparelli AW, Jo OD, Yanagawa N. Thiol redox and phosphate transport in renal brush-border membrane. Effect of nicotinamide. *Biochim Biophys Acta- Biomembr.* 1990;1021(1):85–90.
123. Eto N, Miyata Y, Ohno H, Yamashita T. Nicotinamide prevents the development of hyperphosphataemia by suppressing intestinal sodium-dependent phosphate transporter in rats with adenine-induced renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(7):1378–84.
124. Azzarolo AM, Ritchie G, Quamme GA. Some characteristics of sodium-independent phosphate transport across renal basolateral membranes. *BBA - Biomembr.* 1991;1064(2):229–34.
125. Dallaire L, Giroux S, Béliveau R. Regulation of phosphate transport by second messengers in capillaries of the blood-brain barrier. *BBA - Biomembr.* 1992;1110(1):59–61.
126. Dallaire L, Beliveau R. Phosphate transport by capillaries of the blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 1992;267(31):22323–7.
127. Solomon DH, Wilkins RJ, Meredith D, Browning JA. Characterisation of inorganic phosphate transport in bovine articular chondrocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(1–4):99–108.
128. Ito M, Matsuka N, Izuka M, Haito S, Sakai Y, Nakamura R, et al. Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast-like cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2005;288(4):C921–C931.
129. Lacerda-Abreu MA, Russo-Abrahão T, Cosentino-Gomes D, Nascimento MTC, Carvalho-Kelly LF, Gomes T, et al. H⁺-dependent inorganic phosphate transporter in breast cancer cells: Possible functions in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2019;1865(9):2180–8.
130. Bowen JW, Levinson C. Phosphate concentration and transport in Ehrlich ascites tumor cells: Effect of sodium. *J Cell Physiol.* 1982;110(2):149–54.
131. Lacerda-Abreu MA, Russo-Abrahão T, Meyer-Fernandes JR. The roles of sodium-independent inorganic phosphate transporters in inorganic phosphate

- homeostasis and in cancer and other diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):1–12.
132. Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, et al. Intestinal Npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(11):2348–58.
 133. Ozkan P, Mutharasan R. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2002;1572(1):143–8.
 134. Biber J, Stieger B, Stange G, Murer H. Isolation of renal proximal tubular brush-border membranes. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1356–9.
 135. Wiederkehr MR, Di Sole F, Collazo R, Quiñones H, Fan L, Murer H, et al. Characterization of acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by dopamine in opossum kidney cells. *Kidney Int.* 2001;59(1):197–209.
 136. Guillén N, Caldas YA, Levi M, Sorribas V. Identification and expression analysis of type II and type III Pi transporters in the opossum kidney cell line. *Exp Physiol.* 2019 Jan 1;104(1):149–61.
 137. Sorribas V, Guillén N, Sosa C. Substrates and inhibitors of phosphate transporters: from experimental tools to pathophysiological relevance. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2018;
 138. Menzel S, Adriuch S, Bannas P, Haag F, Koch-Nolte F. Monitoring Expression and Enzyme Activity of Ecto-ARTCs. In: Correction to: ADP-ribosylation and NAD⁺ Utilizing Enzymes. 2018. p. E1–E1.
 139. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature.* 1971;233(5316):177–82.
 140. McErlane S. Surgical (Survival) oocyte collection from *Xenopus Laevis*. UBC Animal Care Guidelines. 2013. p. 1–5.
 141. Stevens CW, Maciver DN, Newman LC. Testing and Comparison of Non-Opioid Analgesics in Amphibians. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2001;40(4):23–7.
 142. Emmett M, Goldfarb S, Agus ZS, Narins RG. The Pathophysiology of Acid-Base Changes in Chronically Phosphate-Depleted Rats. *Adv Exp Med Biol.* 1977;59:291–8.
 143. Ohnishi R, Segawa H, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Tatsumi S, et al. Control of phosphate appetite in young rats. *J Med Investig.* 2007;54(3–4):366–9.

144. Czarnogorski M, Woda CB, Schulkin J, Mulrone SE. Induction of a phosphate appetite in adult male and female rats. *Exp Biol Med*. 2004;229(9):914–9.
145. Landsman A, Lichtstein D, Bacaner M, Ilani A. Dietary phosphate-dependent growth is not mediated by changes in plasma phosphate concentration. *Br J Nutr*. 2001;86(2):217–23.
146. Sweeny JM, Seibert HE, Woda C, Schulkin J, Haramati A, Mulrone SE. Evidence for induction of a phosphate appetite in juvenile rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1998;275(4):R1358–65.
147. Mulrone SE, Woda CB, Halaihel N, Louie B, McDonnell K, Schulkin J, et al. Central control of renal sodium-phosphate (NaPi-2) transporters. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2004;286(4):F647–52.
148. Palmese S, Pezza M, De Robertis E. Hypophosphatemia and metabolic acidosis. *Minerva Anestesiol*. 2005;71(5):237–42.
149. Kurtz TW, Hsu CH. Impaired distal nephron acidification in chronically phosphate depleted rats. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1978;377(3):229–34.
150. Marks J, Lee GJ, Nadaraja SP, Debnam ES, Unwin RJ. Experimental and regional variations in Na⁺-dependent and Na⁺-independent phosphate transport along the rat small intestine and colon. *Physiol Rep*. 2015;3(1):e12281.
151. Loghman-Adham M. Adaptation to changes in dietary phosphorus intake in health and in renal failure. *J Lab Clin Med*. 1997;129(2):176–88.
152. Marks J, Srai SK, Biber J, Murer H, Unwin RJ, Debnam ES. Intestinal phosphate absorption and the effect of vitamin D: A comparison of rats with mice. *Exp Physiol*. 2006;91(3):531–7.
153. Borowitz SM, Ghishan FK. Maturation of jejunal phosphate transport by rat brush border membrane vesicles. *Pediatr Res*. 1985;19(12):1308–12.
154. Candéal E, Caldas YA, Guillén N, Levi M, Sorribas V. Intestinal phosphate absorption is mediated by multiple transport systems in rats. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2017;312(4):G355–66.
155. Picotto G, Massheimer V, Boland R. Parathyroid hormone stimulates calcium influx and the cAMP messenger system in rat enterocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1997;273(4):C1349–53.
156. Nemere I, Szego CM. Early actions of parathyroid hormone and 1, 25-

- dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine: I. Limited lysosomal enzyme release and calcium uptake. *Endocrinology*. 1981;108(4):1450–62.
157. Nemere I. Parathyroid hormone rapidly stimulates phosphate transport in perfused duodenal loops of chicks: Lack of modulation by vitamin D metabolites. *Endocrinology*. 1996;137(9):3750–5.
 158. Watson PH, Fraher LJ, Hendy GN, Chung UI, Kisiel M, Natale B V., et al. Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J Bone Miner Res*. 2000;15(6):1033–44.
 159. Levi M, Gratton E, Forster IC, Hernando N, Wagner CA, Biber J, et al. Mechanisms of phosphate transport. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(8):482–500.
 160. Rhee Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, et al. PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling. *J Bone Miner Res*. 2011;26(5):1035–46.
 161. Finch JL, Lee DH, Liapis H, Ritter C, Zhang S, Suarez E, et al. Phosphate restriction significantly reduces mortality in uremic rats with established vascular calcification. *Kidney Int*. 2013;176(3):139–48.
 162. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, et al. NHE3: A Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1993;265(5 34-5).
 163. Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int*. 1995;48(4):1206–15.
 164. Wagner CA. Effect of mineralocorticoids on acid-base balance. *Nephron - Physiol*. 2014;128(1–2):26–34.
 165. Green J, Foellmer O, Kleeman CR, Basic MM. Acute phosphate depletion inhibits the Na⁺/H⁺ antiporter in a cultured renal cell line. *Am J Physiol*. 1993;265:F440–8.
 166. Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, Moe OW. Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP: Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J Biol Chem*. 1999;274(7):3978–87.
 167. Biemesderfer D, DeGray B, Aronson PS. Active (9.6 S) and Inactive (21 S)

- Oligomers of NHE3 in Microdomains of the Renal Brush Border. *J Biol Chem.* 2001;276(13):10161–7.
168. Bobulescu IA, Moe OW. Luminal Na⁺/H⁺ exchange in the proximal tubule. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2009;458(1):5–21.
169. Yu HL, Giammarco R, Goldstein MB, Stinebaugh BJ, Halperin ML. Stimulation of ammonia production and excretion in the rabbit by inorganic phosphate. Study of control mechanisms. *J Clin Invest.* 1976;58(3):557–64.
170. Maunsbach AB, Vorum H, Kwon TH, Nielsen S, Simonsen B, Choi I, et al. Immunoelectron microscopic localization of the electrogenic Na/HCO₃ cotransporter in rat and ambystoma kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(12):2179–89.
171. Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, et al. Pendrin, encoded by the pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):4221–6.
172. Arruda JA, Julka NK, Rubinstein H, Sabatini S, Kurtzman NA. Distal acidification defect induced by phosphate deprivation. *Metabolism.* 1980;29(9):826–36.
173. Chen JG, Kempson SA. Phosphate deprivation inhibits NH₄⁺ transport in OK cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1993;1149(2):299–304.
174. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology.* 2016;31(3):233–45.
175. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Vol. 1092, *Annals of the New York Academy of Sciences.* Ann N Y Acad Sci; 2006. p. 385–96.
176. Kiper POS, Saito H, Gori F, Unger S, Hesse E, Yamana K, et al. Cortical-Bone Fragility — Insights from sFRP4 Deficiency in Pyle’s Disease. *N Engl J Med.* 2016;374(26):2553.
177. Ott SM. Cortical or Trabecular Bone: What’s the Difference? *Am J Nephrol.* 2018;47(6):373–5.
178. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139–46.
179. Komori T. Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):1–15.

180. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382(6590):448–52.
181. Feteih R, Tassinari MS, Lian JB. Effect of sodium warfarin on vitamin K-dependent proteins and skeletal development in the rat fetus. *J Bone Miner Res*. 1990;5(8):885–94.
182. Nickel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM, Vashishth D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *ACS J surfaces colloids*. 2013;29(45).
183. Kim JM, Kim MY, Lee K, Jeong D. Distinctive and selective route of PI3K/PKC α -PKC δ /RhoA-Rac1 signaling in osteoclastic cell migration. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;437(C):261–7.
184. Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Hou W, Zhou Y. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit*. 2020;26:e919159-1.
185. Huang W, Carlsen B, Rudkin G, Berry M, Ishida K, Yamaguchi DT, et al. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone*. 2004;34(5):799–808.
186. Holm E, Gleberzon JS, Liao Y, Sørensen ES, Beier F, Hunter GK, et al. Osteopontin mediates mineralization and not osteogenic cell development in vitro. *Biochem J*. 2014;464(3):355–64.
187. Forsprecher J, Wang Z, Goldberg HA, Kaartinen MT. Transglutaminase-mediated oligomerization promotes osteoblast adhesive properties of osteopontin and bone sialoprotein. *Cell Adhes Migr*. 2011;5(1):65–72.
188. Regard JB, Zhong Z, Williams BO, Yang Y. Wnt signaling in bone development and disease: Making stronger bone with Wnts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12):1–17.
189. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. Vol. 13, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. p. 767–79.
190. Lüscher B, Bütepage M, Eckeil L, Krieg S, Verheugd P, Shilton BH. ADP-Ribosylation, a Multifaceted Posttranslational Modification Involved in the Control of Cell Physiology in Health and Disease. *Chem Rev*. 2018;118(3):1092–136.
191. Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kühl M, Reche P, et al. The family of

- toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci.* 2009;11(7):1657–70.
192. Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, et al. NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7 -Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells. *J Immunol.* 2009;182(5):2898–908.
 193. Yau L, Molnar P, Moon MC, Buhay S, Werner JP, Molnar K, et al. Meta-iodobenzylguanidine, an inhibitor of arginine-dependent mono(ADP-ribosyl)ation, prevents neointimal hyperplasia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(3):717–24.
 194. Del Vecchio M, Balducci E. Mono ADP-ribosylation inhibitors prevent inflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;310(1–2):77–83.
 195. Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem.* 1992;267(3):1569–75.
 196. Koch-Nolte F, Fischer S, Haag F, Ziegler M. Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. *FEBS Lett.* 2011;585(11):1651–6.
 197. Dousa TP. Modulation of renal Na-Pi cotransport by hormones acting via genomic mechanism and by metabolic factors. *Kidney Int.* 1996;49(4):997–1004.
 198. Braun-Werness JL, Jackson BA, Werness PG, Dousa TP. Binding of nicotinamide adenine dinucleotide by the renal brush border membrane from rat kidney cortex. *Biochim Biophys Acta- Biomembr.* 1983;732(3):553–61.
 199. Gmaj P, Biber J, Angielski S, Stange G, Murer H. Intravesicular NAD has no effect on sodium-dependent phosphate transport in isolated renal brush border membrane vesicles. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 1984 Jan;400(1):60–5.
 200. Puschett JB, Goldberg M. The acute effects of furosemide on acid and electrolyte excretion in man. *J Lab Clin Med.* 1968;71(4):666–77.
 201. Steele TH. Dual effect of potent diuretics on renal handling of phosphate in man. *Metabolism.* 1971;20(8):749–61.
 202. Carone L, Oxberry SG, Twycross R, Charlesworth S, Mihalyo M, Wilcock A. Furosemide. *J Pain Symptom Manage.* 2016;52(1):144–50.

203. Rodriguez HJ, Walls J, Yates J, Klahr S. Effects of acetazolamide on the urinary excretion of cyclic AMP and on the activity of renal adenylyl cyclase. *J Clin Invest.* 1974;53(1):122–30.
204. Carrière S, Dandavino R, Roehefort F, Daigneault A, Lanoix C. Bumetanide, a new loop diuretic. *Clin Pharmacol Ther.* 1976;20(4):424–38.
205. Haas JA, Larson M V., Marchand GR, Lang FC, Greger RF, Knox FG. Phosphaturic effect of furosemide: role of PTH and carbonic anhydrase. *Am J Physiol.* 1977;232(2):F105–10.
206. McNabb WR, Noormohamed FH, Brooks BA, Lant AF. Renal actions of piretanide and three other “loop” diuretics. *Clin Pharmacol Ther.* 1984;35(3):328–37.
207. Tuchman S, Asico LD, Escano C, Bobb DA, Ray PE. Development of an animal model of nephrocalcinosis via selective dietary sodium and chloride depletion. *Pediatr Res.* 2013;73(2):194–200.
208. Romero MF, Chen AP, Parker MD, Boron WF. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol Aspects Med.* 2013 Apr;34(2–3):159–82.
209. Papageorgiou P, Shmukler BE, Stuart-Tilley AK, Jiang L, Alper SL. AE anion exchangers in atrial tumor cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2001;280(3):H937–45.
210. Milanick MA, Gunn RB. Proton-sulfate co-transport: Mechanism of H⁺ and sulfate addition to the chloride transporter of human red blood cells. *J Gen Physiol.* 1982 Jan 1;79(1):87–113.
211. Jennings ML. Proton fluxes associated with erythrocyte membrane anion exchange. *J Membr Biol.* 1976 Dec;28(1):187–205.
212. Guizouarn H, Gabillat N, Motais R, Borgese F. Multiple transport functions of a red blood cell anion exchanger, tAE1: its role in cell volume regulation. *J Physiol.* 2001;535(2):497–506.
213. Ellory JC, Guizouarn H, Borgese F, Bruce LJ, Wilkins RJ, Stewart GW. Leaky Cl⁻-HCO₃⁻ exchangers: Cation fluxes via modified AE1. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2009;364(1514):189–94.
214. Galanter WL, Hakimian M, Labotka RJ. Structural determinants of substrate specificity of the erythrocyte anion transporter. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 1993;265(4 34-4):C918–26.

215. Labotka RJ, Kleps RA. A Phosphate-Analogue Probe of Red Cell pH Using Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*. 1983;22(26):6089–95.
216. Reithmeier RAF, Casey JR, Kalli AC, Sansom MSP, Alguel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. Vol. 1858, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V.; 2016. p. 1507–32.
217. Verlander JW, Madsen KM, Tisher CC. Effect of acute respiratory acidosis on two populations of intercalated cells in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1987;253(6 (22/6)):F1142–56.
218. Alper SL. Molecular physiology and genetics of Na⁺-independent SLC4 anion exchangers. Vol. 212, *Journal of Experimental Biology*. *J Exp Biol*; 2009. p. 1672–83.
219. Falke JJ, Chan SI. Molecular Mechanisms of Band 3 Inhibitors. 3. Translocation Inhibitors. *Biochemistry*. 1986;25(24):7899–906.
220. Chernova MN, Stewart AK, Barry PN, Jennings ML, Alper SL. Mouse Ae1 E699Q mediates SO₄²⁻/anion exchange with [SO₄²⁻]_i-dependent reversal of wild-type p_{Ho} sensitivity. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2008;295(2):302–12.
221. Stehberger PA, Shmukler BE, Stuart-Tilley AK, Peters LL, Alper SL, Wagner CA. Distal renal tubular acidosis in mice lacking the AE1 (Band3) Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (slc4a1). *J Am Soc Nephrol*. 2007 May;18(5):1408–18.

Anexo 1: Formulación de piensos

Calculated composition			
g/kg	P = 0,1	P = 0,6	P = 1,2
pregelatinized cornstarch	377,9	370,5	338,5
casein	180,0	180,0	180,0
maltodextrin	142,0	142,0	142,0
sucrose	110,0	110,0	110,0
soybean oil	70,0	70,0	70,0
crude cellulose	50,0	50,0	50,0
AIN minerals without KH₂PO₄	35,0	35,0	35,0
AIN vitamins	10,0	10,0	10,0
L-cystine	3,0	3,0	3,0
choline bitartrate	2,5	2,5	2,5
potassium phosphate dibasic K₂HPO₄	0,0	18,9	41,3
monosodium phosphate NaH₂PO₄	0,0	8,1	17,7
sodium chloride	3,4		
potassium chloride	16,2		
Na Sodium %	0,29	0,29	0,44
K Potassium %	0,96	0,96	1,97
P Phosphorus %	0,10	0,62	1,23
Water %	7,0	7,1	6,9
Protein %	15,9	15,9	15,9
Fat %	7,4	7,4	7,4
Minerals %	4,2	4,2	6,5
Cellulose %	3,6	3,6	3,6
Starch %	46,1	45,5	42,6
Sugars %	14,7	14,7	14,7
ENA %	61,9	61,8	59,8
ATWATER Kcal/Kg	3776,9	3775,8	3691,3
ATWATER MJ/kg	15,8	15,8	15,5
Energy		-	-
Protein Kcal/kg	637,4	637,2	636,2
Fat Kcal/kg	664,8	664,7	663,9
Carbohydrates Kcal/kg	2474,6	2473,9	2391,2
% EB from protein	16,9	16,9	17,2
% EB from fat	17,6	17,6	18,0
% EB from carbohydrates	65,5	65,5	64,8
ME Pig MJ/kg	16,1	16,0	15,6
ME Kcal/kg	3836,9	3820,9	3716,5