

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE FGF23 EN MÉDULA ÓSEA:
POTENCIAL MECANISMO DE LA RESISTENCIA A LA ACCIÓN DE
ERITROPOYETINA EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA”**

FRANCISCA ISIDORA AHUMADA CASTILLO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA**

Director de Tesis: Dr. Luis Michea Acevedo

Co-Director: Dr. Luis Toro Cabrera.

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

FRANCISCA ISIDORA AHUMADA CASTILLO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 de junio de 2018.

Director de Tesis:

Dr. Luis Michea Acevedo

Co-Director de Tesis:

Dr. Luis Toro Cabrera

Comisión Informante:

Dr. Ramón Rodrigo (Presidente)

Dra. Leticia Elgueta

Dr. Germán Ebensperger

Agradecimientos:

*Luis Michea, MD, PhD**

*Luis Toro, MD, PhD**

*Víctor Barrientos, PhD (c)**

*Sra. Eliana Pino**

*Macarena Rojas, MSc**

**Laboratorio de Fisiología Integrativa, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

Financiamiento: FONDECYIT Regular 1171869

I. ÍNDICE

II. RESUMEN.....	Pág. 5-6
III. ABSTRACT.....	Pág. 7-8
IV. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 9-15
V. HIPÓTESIS.....	Pág. 16
VI. OBJETIVO GENERAL.....	Pág. 16
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	Pág. 16
VIII. METODOLOGÍA.....	Pág. 17-22
IX. RESULTADOS.....	Pág. 23-46
X. CONCLUSIÓN.....	Pág. 47-51
XI. DATOS PRELIMINARES.....	Pág. 52-53
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 54-58

II. RESUMEN

La anemia en la enfermedad renal crónica (ERC) es frecuente y se asocia a mayor morbimortalidad y mala calidad de vida. En la etiopatogenia de la anemia de la ERC destaca la resistencia a la acción de la hormona eritropoyetina (EPO) en las células eritropoyéticas de la médula ósea (MO) y la deficiencia relativa de la producción de EPO. Dado este déficit relativo, la EPO recombinante humana (EPOrh) forma parte del tratamiento habitual de la anemia de la ERC terminal.

Por otra parte, el Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23) es una hormona peptídica secretada por osteocitos y osteoblastos. Los niveles de FGF23 están elevados en el plasma de los pacientes ERC, lo que se asocia a efectos patológicos cardiovasculares y óseos. Nuestros estudios recientes demostraron que FGF23 también es producido por células progenitoras eritropoyéticas de la MO y que, frente al estímulo de EPO, estas células aumentan la expresión y secreción de FGF23.

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar el efecto de FGF23 sobre la acción eritropoyética de EPO en MO de ratones ERC. El modelo animal implementado fue el de nefropatía crónica por oxalato. Se utilizaron 4 principales grupos experimentales de ratones machos C57Bl/6: grupo control (CTL), CTL con EPOrh, ERC y ERC con EPOrh (misma dosis de EPOrh para ambos grupos: 5000 UI/Kg s.c, RecormonTM, Roche). Se realizaron mediciones en sangre (hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), porcentaje de reticulocitos y FGF23), riñón (mRNA de EPO y Klotho) y MO (abundancia relativa de progenitores y precursores eritropoyéticos a través de citometría de flujo; mRNA de FGF23, FGFR1, FGFR3, Klotho y EPOR; y proteína FGF23).

Resultados: en relación al grupo CTL, en la MO de la ERC se encontró un aumento de la proteína FGF23 y de la abundancia del transcrito de FGF23, EPOR, FGFR1 y Klotho; además, encontramos en ERC hay un aumento del mRNA de EPO renal. Por otro lado, vimos que luego de la administración de EPOrh se produjo un aumento del mRNA FGF23 en la MO de ratones control y ERC, que se correlacionó a un aumento de FGF23 plasmático. Finalmente, en la ERC no hubo cambio en el Hto, Hb ni en la abundancia relativa de

progenitores/precursores de la MO, contrariamente a lo observado en el grupo CTL, además, luego de EPOrh se observó una caída del porcentaje de reticulocitos en ERC.

Las principales conclusiones y discusiones de esta tesis son: 1) en la MO de la ERC hay un aumento de la expresión de FGF23, lo que sugiere que la MO es una fuente que contribuye al aumento de los niveles circulantes de FGF23 en la ERC; 2) se encontró una resistencia a la acción eritropoyética de EPO en la MO de la ERC, la que dependería de un efecto diferencial de EPO sobre las células eritropoyéticas que más proliferan (progenitores eritropoyéticos) que podría estar mediado por FGF23 a nivel local en la MO y 3) EPO estimula la expresión y secreción de FGF23 en grupos CTL y ERC.

III. ABSTRACT

Anemia in chronic kidney disease (CKD) is common and is associated with increased morbimortality and poor life quality. Resistance to the action of the hormone erythropoietin (EPO) in the erythropoietic cells of the bone marrow (BM) and the relative deficiency production of EPO are factors that contribute to anemia in CKD. Because of this relative deficit, human recombinant EPO (EPOrh) is a usual anemia treatment in end stage renal disease.

Moreover, the Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) is a peptide hormone secreted by osteocytes and osteoblasts. The plasma levels of FGF23 are elevated in CKD patients, which is associated with adverse cardiovascular and bone effects. Our recent studies showed that FGF23 is also produced by erythropoietic progenitor cells of BM and that against the stimulation of EPO, these cells increase the expression and secretion of FGF23.

The main objective of this thesis was to study FGF23 effect on erythropoietic action of EPO in BM of CKD. The CKD model implemented was oxalate nephropathy. Four main experimental groups of male C57Bl/6 mice were used: control group (CTL), CTL with rhEPO, CKD, and CKD with rhEPO (same dose of EPOrh for both groups: 5000 IU/Kg s.c, Recormon TM, Roche). Measurements were made in blood (hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), percentage of reticulocytes and FGF23), kidney (mRNA of EPO and Klotho) and BM (relative abundance of progenitors and erythropoietic precursors through flow cytometry; mRNA of FGF23, FGFR1, FGFR3, Klotho and EPOR; and protein FGF23).

Results: in the BM of CKD we found greater FGF23 protein abundance and greater mRNA abundance of FGF23, EPOR, FGFR1 and Klotho vs. CTL. In addition, we saw an increase in renal EPO mRNA of CKD. After EPO administration we detected a FGF23 mRNA increase in CTL and CKD BM, which was correlated to plasma FGF23 rise. Also; in CKD, after EPO administration, there was no change in the Hct, Hb or in the relative BM abundance of progenitors/precursors, contrary to what was observed in CTL; additionally, after rhEPO a drop in the percentage of reticulocytes was observed in CKD.

The main conclusions and discussions of this thesis are: 1) there is a higher FGF23 expression in the BM of CKD, suggesting that BM is a source that contributes to the higher FGF23 plasma levels in CKD, 2) BM of CKD is resistance to the EPO erythropoietic action, which would depend on a differential effect of EPO on the erythropoietic cells that proliferate the most (erythropoietic progenitors), what could be mediated by FGF23 locally in the BM and 3) EPO stimulates the expression and secretion of FGF23 in CTL and CKD groups.

IV. INTRODUCCIÓN

Anemia y Enfermedad Renal Crónica

La anemia, definida como una concentración de hemoglobina (Hb) menor a 13g/dL en hombres o menor a 12g/dL en mujeres; afecta al 75% de los pacientes con ERC terminal (ERCT)¹, la forma más severa de insuficiencia renal donde se requieren medidas de soporte renal artificiales (diálisis) para la supervivencia del paciente. La anemia es un factor asociado a hipertrofia ventricular izquierda, progresión de la ERC, mala calidad de vida, mayor tasa de hospitalización por causa cardiovascular y mayor mortalidad²⁻⁷.

Etiopatogenia de la anemia en la ERC

La anemia que presentan los pacientes ERC es multifactorial. Entre sus causas se ha propuesto la destrucción mecánica prematura de los glóbulos rojos (GR) en uremia⁸, pérdida de sangre (púrpura, sangrado ginecológico y gastrointestinal)⁹, disminución de la absorción fisiológica del hierro en el tubo digestivo¹⁰, además de la participación de citoquinas con efecto inhibitorio en la eritropoyesis medular¹¹⁻¹⁶. Sin embargo, es aceptado que el principal factor causal es la disminución relativa de la producción de eritropoyetina (EPO) renal¹⁷. La EPO es una hormona proteica sintetizada principalmente en el riñón¹⁸ por un subgrupo de fibroblastos peritubulares de la corteza renal, de la zona yuxtamedular¹⁹⁻²³. La oxigenación tisular es el principal estímulo que regula la secreción de EPO²⁴, siendo la caída del hematocrito y la hipoxia (transporte disminuido de oxígeno en la sangre) los principales estimuladores de la síntesis y secreción de EPO.

Los pacientes con ERC presentan niveles plasmáticos de EPO anormalmente bajos para el contexto de anemia. Datos de la literatura muestran que los niveles de EPO plasmática de pacientes con ERC anémicos puede estar en rango normal o mayor a lo normal en relación a pacientes sanos, con adecuada oxigenación y hematocrito; y que estos valores son más bajos que los encontrados en pacientes con anemia no renal^{25,66}. Estos niveles inadecuados de EPO en la ERC podrían explicarse por una disminución de la masa de fibroblastos peritubulares funcionales y por una reducción de la síntesis de EPO en las células funcionales como consecuencia de una hiperoxia relativa, derivada del aumento de flujo sanguíneo a las nefronas remanentes¹⁰. Sumado a esto, se ha visto que existe una respuesta disminuida a la EPO

inclusive en pacientes con ERCT estables y bien dializados²⁶, lo que constituiría un factor adicional contribuyente al desarrollo de anemia. Si esta disminución de la respuesta es debida a toxinas urémicas, a enfermedades asociadas o a deficiencia relativa de hierro, no está claro.

Eritropoyesis y EPO

Muy brevemente, la eritropoyesis depende de células progenitoras tempranas, llamadas BFU-e (“*burst forming unit erythroid*”, *burst* por su gran capacidad de producción de eritroblastos en cultivos); y tardías, llamadas CFU-e (*colony forming unit erythroid*)²⁴. El receptor de EPO (EPOR) está en estos dos tipos de células progenitoras; no obstante, el principal blanco de la EPO son las CFU-e, las que son sensibles a bajas concentraciones²⁷ y requieren EPO para una proliferación limitada, para su supervivencia y maduración terminal^{28,29,30}. A partir de las CFU-e se forman los proeritroblastos, luego secuencialmente se generan los eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos, reticulocitos y finalmente los eritrocitos²⁴. Se ha observado que por cada proeritroblasto se producen 49 eritroblastos, 113 reticulocitos (82 en médula, 31 en sangre) y 3300 eritrocitos maduros^{31,32}. De manera que esta distribución de precursores conforma una “pirámide eritroidea” (cada proeritroblasto es la punta de una pirámide, y las células maduras se ubican en la base de ésta).

Eritropoyesis y EPO en la ERC

Es aceptado que la distribución de precursores (la forma de la “pirámide eritroidea”) no se altera mayormente en la anemia de la ERC³³. Sin embargo, existe poca información detallada de la MO de los pacientes ERC y ERC que reciben EPOrh. Se ha reportado que la celularidad de la MO de los pacientes ERC en hemodiálisis se encuentra disminuida³⁴. Además, los progenitores (BFU-e y CFU-e) se encuentran en niveles subnormales. El tratamiento con EPOrh durante 2, 12 y 24 meses aumenta la celularidad, secundario a un aumento del componente eritroide (razón mieloide/eritroide disminuida); aumenta el porcentaje de eritroblastos y de CFU-e hasta niveles normales, y de BFU-e a niveles mayores a lo normal^{34,35}.

Uso de EPO recombinante para el tratamiento de la anemia de los pacientes ERC

La terapia con EPOrh es de uso habitual en los pacientes ERC. Esta terapia fue masificada en la década de los 80's, convirtiéndose en una terapia estándar para pacientes con ERCT y anemia refractaria a tratamiento con hierro. En la ERC existe indicación de tratamiento con EPOrh cuando se descartan otras causas corregibles de anemia, hay reservas de hierro normales y existe una anemia sintomática con Hb < 10 g/dL, o en pacientes en diálisis con Hb < 10 g/dL (independiente de la sintomatología). La meta terapéutica es alcanzar una concentración de Hb 11-12 g/dL³⁶. Actualmente el 90% de los pacientes en diálisis en EEUU y Europa reciben EPOrh para el tratamiento de la anemia³⁷. En Chile, la administración de la EPOrh se incluyó en el GES en el año 2010 y actualmente el 65,7% de los pacientes en diálisis reciben EPOrh³⁸.

A pesar de la alta eficacia de la terapia con EPOrh, donde más del 95% de los pacientes alcanzan las metas de Hb³⁹, se han reportado importantes efectos adversos, como hipertensión y trombosis de la fístula AV^{40,41}. Si bien los estudios clínicos han demostrado que EPOrh mejora la calidad de vida y la capacidad funcional de los pacientes, no se ha demostrado mejoría de la supervivencia. Más aún, el incremento de la Hb a valores normales se asocia a mayor mortalidad⁴², lo que no estaría dado por el aumento de la concentración de Hb *per se* sino que por el uso de altas dosis de EPOrh por mecanismos no precisados⁴³.

El Factor de Crecimiento Fibroblástico 23

El Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23) es una hormona peptídica sintetizada en el hueso. Clásicamente se acepta que es sintetizada y secretada por osteoblastos y osteocitos⁴⁴. Sus acciones endocrinas incluyen la inhibición de la reabsorción de fosfato en el túbulo proximal renal, la inhibición de la síntesis de vitamina D activa renal (mediante la inhibición del compuesto 1,25-dihidroxi vitamina D, necesario para la formación de vitamina D activa)⁴⁵, y la disminución de la síntesis y secreción de parathormona en la glándula paratiroides⁴⁶. Además, FGF23 tiene acciones autocrinas/paracrinas en el tejido óseo, incluyendo la disminución de la mineralización y del crecimiento longitudinal del hueso⁴⁷. Con respecto a sus receptores, FGF23 actúa a través de una familia de receptores de membrana plasmática (FGFR1-4). Las principales isoformas que median la acción de FGF23

son FGFR1 y FGFR3 las que requieren de la presencia del cofactor proteico Klotho, cuya síntesis se produce principalmente en el túbulo distal del riñón. La asociación de FGF23 a Klotho aumenta 2-3 órdenes de magnitud la afinidad de los receptores por su ligando.^{46,48}

En la ERC, los niveles plasmáticos del FGF23 ([FGF23]p) se elevan significativamente, en forma precoz y directamente proporcional a la caída de la velocidad de filtración glomerular (VFG)⁴⁹. Estos niveles llegan a ser más de 1000 veces superiores en los pacientes en hemodiálisis comparados a personas sanas⁵⁰. El aumento de FGF23 circulante es un factor de riesgo independiente de mayor mortalidad⁵¹. Se han descrito múltiples efectos patogénicos de FGF23, tales como hipertrofia miocárdica, calcificación vascular en aorta y arterias de conducción periférica, progresión de la calcificación aórtica en pacientes con ERCT en HD y mayor riesgo de enfermedad coronaria secundaria al aumento de [FGF23]p.^{53-57-y 78} Además, estudios recientes han demostrado que el FGF23 estimula la secreción de aldosterona, lo que podría contribuir al desarrollo de hipertensión arterial, infarto miocárdico, insuficiencia cardíaca y accidente cerebro vascular.⁵⁸⁻⁶⁰

Por otro lado, en la ERC existe un déficit del cofactor Klotho plasmático, lo que debiese causar una menor activación de los receptores FGFR1 y FGFR3. Por ello se ha postulado que las acciones deletéreas del FGF23 en el paciente ERC dependerían de la activación de receptores de baja afinidad, que serían Klotho independientes y que en condiciones fisiológicas no son activados por FGF23, como el receptor tipo 4.⁵²

EPO induce la secreción de FGF23: papel de EPOrh en el aumento de FGF23 circulante de la ERC

Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que el FGF23 es producido por las células eritropoyéticas de la MO, además de osteocitos y osteoblastos⁷⁷ (ver sección “XI. Datos preliminares” p.52). En cultivos de células troncales humanas, sometidas a protocolo de diferenciación hematopoyética *in vitro*, se observó que las células BFU-e/CFU-e expresan elevados niveles de mRNA FGF23. Además, encontramos que la incubación de células eritropoyéticas de la MO de ratón con EPOrh causa rápido aumento de la expresión de FGF23. Consistente con esta observación en células en cultivo, el suministro de EPOrh en ratones produce una rápida alza del [FGF23]p. El aumento de la expresión de FGF23 en los cultivos

de células de MO, así como también el aumento *in vivo* asociado a los aumentos de EPO circulante, puede ser prevenido por un antagonista farmacológico del receptor homodimérico de EPO (EPOR). Todos estos antecedentes muestran que EPO, vía EPOR, estimula la expresión y secreción de FGF23 desde la MO.

El descubrimiento de la producción/secreción de FGF23 por células progenitoras y precursoras eritropoyéticas de la MO, estimuladas por EPO, muestra una nueva interacción endocrina entre el riñón y la MO, que podría tener relevancia para la eritropoyesis. Además, postulamos que el uso de EPOrh podría ser un factor inductor adicional de la expresión y secreción de FGF23 desde los progenitores eritropoyéticos de la MO, contribuyendo a aumentar los niveles circulantes de FGF23. Nuestros estudios previos muestran aumento de la expresión de FGF23 en MO de ratones ERC por nefrectomía subtotal (modelo 5/6), por lo que es plausible plantear que el tratamiento con EPOrh es un factor adicional para causar un aumento de la [FGF23]p, secundariamente al aumento de expresión y secreción de FGF23 desde la MO (ver sección “XI. Datos preliminares” p.52).

Modulación de la expresión y secreción de FGF23 de la MO: EPO y FGF23/Klotho

Como mencionamos previamente, los niveles circulantes de FGF23 aumentan tempranamente durante el desarrollo de ERC, precediendo el aumento de los niveles plasmáticos de fosfato o PTH. Se acepta que el aumento de los niveles plasmáticos de FGF23 es secundario al aumento de la secreción ósea de FGF23⁶⁷. Estudios recientes en tejido óseo muestran que existe un mecanismo de retroalimentación positiva, auto-paracrina que induciría la expresión de FGF23 ósea.⁶¹ Ratones KO-tejido específico para Klotho óseo no muestran aumentos en la expresión de FGF23 después de la inducción de ERC experimental.⁶¹ Estos datos han sido interpretados como indicación de que la activación de FGFRs Klotho-dependientes del tejido óseo es necesaria para que se active la expresión de FGF23 en el tejido óseo durante el desarrollo de ERC.

Por otra parte, nuestros estudios preliminares⁷⁷ mostraron que las células eritropoyéticas de la MO producen FGF23 y que son una fuente de FGF23 circulante. Además, nuestros estudios preliminares muestran que la nefrectomía bilateral en ratones (modelo experimental de insuficiencia renal aguda) produce un rápido aumento (4 horas) de [FGF23]p y de la expresión

de FGF23 en la MO, sin afectar la expresión de FGF23 en el tejido óseo. Estos resultados sugieren que la MO podría ser una de las fuentes que contribuye al aumento de la [FGF23]p durante el desarrollo de ERC. En nuestros estudios preliminares también observamos que la inyección de Klotho recombinante a ratones sometidos a nefrectomía bilateral permite prevenir la inducción de la expresión de FGF23 en la MO. Por lo tanto, en base a nuestros resultados concluimos que la activación por FGF23 de FGFRs Klotho-dependientes inhibe la expresión de FGF23 en las células de la MO (Figura 1.A. En este contexto, en condiciones normales (niveles circulantes normales de Klotho), FGF23 inhibe su propia expresión en la MO. Por ello, nuestros estudios muestran una aparente contradicción en los mecanismos de regulación de la expresión de FGF23 en tejido óseo (osteocitos-osteoblastos) comparados con las células eritropoyéticas de la MO. Finalmente, de acuerdo a nuestros datos, es esperable que en la ERC, en que existe déficit de Klotho, se produzca un mayor aumento de la expresión y la [FGF23]p en la MO y que la inyección de EPOrh exacerbe el aumento de FGF23 circulante (Figura 1.B).

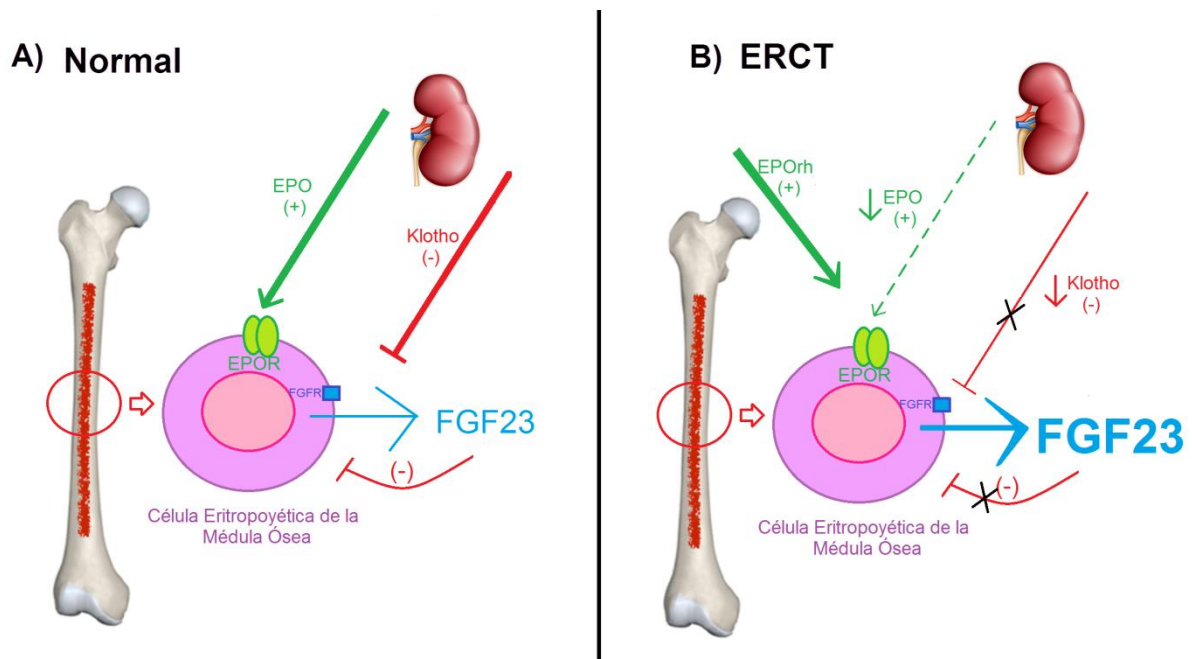


Figura 1. Propuesta Modelo Regulación de la Producción de FGF23 por parte de células eritropoyéticas de la MO en individuo normal versus ERCT. (Explicación en texto).

FGF23 como modulador de la acción eritropoyética de EPO

La anemia en pacientes con ERC se asocia a aumentos en el FGF23⁶². El suministro de FGF23 disminuye los niveles plasmáticos de EPO⁶³. La eliminación genética de Klotho, que se traduce en una incapacidad de unión de FGF23 a sus receptores FGFR1 y FGFR3, produce un aumento de la eritropoyesis en ratones⁶⁴. Estos resultados indican que FGF23 es un inhibidor de la eritropoyesis, vía activación de FGFR1 y FGFR3. De hecho, se ha demostrado la expresión de estas isoformas receptoriales en las células precursoras y progenitoras eritropoyéticas de MO de ratones⁶³, sugiriendo que FGF23 podría tener una acción endocrina y/o paracrina como modulador de la eritropoyesis vía los FGFR1 y FGFR3 presentes en células precursoras y progenitoras eritropoyéticas de MO. Aunque estos resultados sugieren una relación fisiológica entre EPO y FGF23 a nivel de la MO, se desconocen el(los) efectos y mecanismo(s) que explicarían la interacción entre FGF23, EPO y hematopoyesis/anemia.

Dados los antecedentes expuestos, postulamos que fisiológicamente FGF23 disminuiría la eritropoyesis en la MO, a través de una acción mediada por FGFRs Klotho-dependientes de las células eritropoyéticas. Además, planteamos que en ERC aumenta la expresión de FGF23 en la MO y que la inyección de EPO_{rh} potencia la inducción de la expresión de FGF23 en la MO de animales ERC. En consecuencia, en esta tesis se evaluaron los niveles de FGF23 en la MO de animales ERC experimental y se analizó si FGF23 posee un efecto modulador de la acción de EPO_{rh} en la proliferación y/o diferenciación de los precursores eritropoyéticos.

V. HIPÓTESIS

En la ERC, FGF23 disminuye la eritropoyesis en la médula ósea, mediante un efecto inhibitorio de la acción de EPO sobre los progenitores/precursores eritropoyéticos.

VI. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de FGF23 sobre la acción eritropoyética de EPO en MO de ratones control y ERC.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nº1 “Caracterizar la abundancia relativa de los precursores y progenitores eritropoyéticos de la médula ósea de ratones sanos y ERC”.

Nº2 “Determinar el efecto de EPO_{rh} sobre la abundancia relativa de precursores y progenitores eritropoyéticos de la MO de ratones sanos y ERC”.

Nº3 “Determinar el efecto de EPO_{rh} sobre la expresión en MO y niveles plasmáticos de FGF23 en ratones sanos y ERC”.

VIII. METODOLOGÍA

1. Animales

Se utilizaron ratones machos C57Bl/6, de 8-12 semanas de edad, de peso inicial de 20-25 grs., mantenidos con ciclos luz/oscuridad de 12/12 horas, a una temperatura de 21°C + 1°C con humedad controlada de 40-50%. Los animales recibieron comida y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron mantenidos según las recomendaciones para manejo y cuidado de animales de experimentación *Guide For The Use Of Laboratory Animals* del *National Institute of Health* y el protocolo experimental fue enviado para aprobación al Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA #0988 FMUCH).

2. Modelo experimental de ERC inducida por oxalato⁶⁵

En este modelo, se induce la enfermedad renal crónica por medio de una intervención en la dieta de los animales. El protocolo comienza con una dieta control (libre de calcio y oxalato) durante 3 días, seguido de una dieta alta en oxalato soluble (50 µmol de oxalato sódico por gramo de una dieta estándar libre de calcio (*Dyets Inc. Calcium Free AIN-76 #200150*) durante 14 días (o 21 días dependiendo del nivel de nitrógeno ureico plasmático). La eliminación del calcio de la dieta aumenta la cantidad de oxalato soluble disponible para la absorción. Cumplidos los 14 días (ó 21), los animales vuelven a una dieta estándar (*LabDiet, 5P00, ProLab RMH 3000*) a libre demanda por 7 días más antes de comenzar el período de experimentación con EPOrh. El agua en cualquiera de los grupos y en todo momento siempre fue *ad libitum*. (Figura 2).

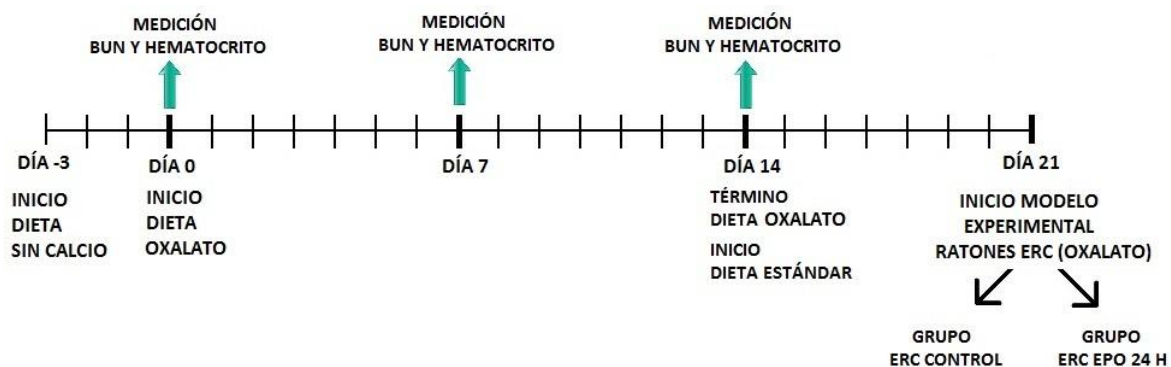


Figura 2. Esquema representativo del modelo experimental de inducción de nefropatía crónica por cristales de oxalato.

3. Grupos experimentales.

Los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales: 1) grupo control, 2) grupo control tratado con EPOrh, 3) ERC y 4) ERC tratado con EPOrh. Se administró una dosis de EPOrh vía subcutánea (5000 UI/Kg s.c, RecormonTM, Roche). El grupo de animales control tratado con EPOrh se constituyó de 5 subgrupos determinados por el tiempo desde la inyección de EPOrh (grupos de 2, 4, 8, 24 y 48 EPOrh). El *n* de los animales control y de los subgrupos de animales control tratado con EPOrh fue de 4-6 animales. El grupo de animales ERC tratado con EPOrh, se constituyó por dos subgrupos; un primer subgrupo al que se le realizaron a las 24 horas luego de la inyección de EPOrh (*n*=3) y un segundo subgrupo al que sólo se le realizó varias mediciones seriadas de plasma (a las 2, 4, 8 y 24 horas) para determinación de FGF23 luego de una sola dosis de EPOrh (tiempo 0h) (*n*=3). El *n* del grupo de animales ERC sin tratamiento (tiempo 0h) fue de 3.

4. Determinaciones de hematocrito, hemoglobina y determinaciones en plasma.

La determinación del hematocrito y recolección de plasma se realizaron al tiempo 0h de todos los animales y una vez por semana, cada semana mientras duró el período de experimentación. Las tomas de muestras se realizaron con suministro continuo de anestesia en dosis de mantención según protocolo estándar anestésico (inhalación de oxígeno asociado a isofluorano a distintas concentraciones: 3% para inducción anestésica y 1.5% para mantención anestésica continua), momento en el cual se realizó un corte transversal a menos de 1mm del extremo distal de la cola del animal, para luego recolectar las gotas de sangre en un capilar heparinizado, obteniendo un volumen total menor de 50µL. El capilar fue centrifugado por 3 minutos a 11.000 rpm, posterior a esto se midió el hematocrito y se recolectó el plasma.

Finalizado el período de experimentación, los animales fueron anestesiados mediante sedación inhalatoria con isofluorano, se realizó la extracción de sangre de la vena cava inferior para obtención de plasma. La muestra se utilizó para determinaciones de nitrógeno ureico plasmático (BUN) (*Urea/BUN-UV ASR #21516, BioSystems S.A. España*), fósforo plasmático (*Phosphate Assay Kit Colorimetric, #ab65622, Abcam, Cambridge, Reino Unido*) y FGF23 mediante un kit de ELISA comercial para FGF23 intacto (iFGF23) (*Immutopics, Athens, OH, Cat#60-6600*) y para FGF23 c-terminal (cFGF23) (*Immutopics, Athens, OH, Cat#60-6300*). Además, la determinación de hemoglobina se realizó con el método de cianmetahemoglobina

y el porcentaje de reticulocitos se informó según mediciones automatizadas con el analizador *Mindray BC6800* (citometría de flujo + fluorescencia + impedancia) obteniendo un valor que se correlacionó microscópicamente con indicadores reticulocitarios en la observación del frotis teñido con *May Grünwald-Giemsa (MGG)*; ambas mediciones se realizaron en laboratorio externo (*Vetlab*, Santiago, Chile) a partir de muestra sanguínea obtenida al momento del sacrificio una vez terminado el período de experimentación.

5. Aislamiento de las células de la MO.

Los fémures y tibias de ratón fueron extraídos en condiciones estériles y se obtuvieron las epífisis de cada hueso. La MO se enjuagó usando una jeringa de 1mL con una aguja de calibre G26 rellena con medio PBS (*phosphate buffer salt*) suplementado con 0.2% albúmina de suero bovino. Las resuspensiones de células se hicieron pipeteando repetidamente y pasando a través de un colador de células de 40µm. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se lavó con medio PBS. Los glóbulos rojos se lisaron resuspendiendo el sedimento de células en 1mL de tampón de lisis ACK durante 1 minuto y luego se centrifugaron y se resuspendieron en medio.

6. Análisis células hematopoyéticas de la MO mediante citometría de flujo.

Las células de MO se incubaron con *rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse Fc Block™, BD Biosciences, San José, CA)* y luego se marcaron con *rat anti-mouse CD71* conjugado con PEcy7 y *rat anti-mouse TER119* conjugado con PE (ambos *BD Biosciences*) en PBS/BSA al 0.5% durante 60 min a 4°C. Luego, las células se lavaron en PBS/BSA al 0.5%, se resuspendieron en paraformaldehído al 1% y se dejaron en un rotor a 4°C durante 15 minutos. Finalmente las células se lavaron dos veces más y se resuspendieron 5×10^5 en 200µL de de PBS/BSA al 0.5%; finalmente, se dejaron refrigeradas a 4°C por 24 horas para después analizar la expresión superficial de las proteínas usando el *software* BD FACSDiva en un citómetro de flujo BD FACS-CantoII (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ*). Se recogieron datos de fluorescencia de al menos 100.000 eventos para cada muestra. La intensidad fluorescente media (FLI) se utilizó como medida de la expresión superficial de la proteína. Las células no teñidas o células teñidas con un solo anticuerpo se usaron como control.

7. Extracción de RNA de células de la MO.

Se extrajo RNA total de muestra de células de la MO a 4°C a partir aproximadamente 2 mm² de tejido recién extraído del animal en 1mL de TRIZOL. Las muestras se trataron por 30 minutos a 37°C con DNAsa I (*DNA-free*TM, *Ambion 17 Applied BioSystems*) para eliminar eventual contaminación con DNA genómico. La cuantificación del RNA se realizará por el método fluorométrico *Quant-iT*TM *Assay (Invitrogen)* de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para verificar la integridad del RNA, se utilizó el método de electroforesis horizontal denaturante en gel de agarosa 1.2% (p/v), en tampón MOPS 1X (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico 20 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2). El gel fue examinado en transiluminador con el sistema de captura de imágenes *DI-01 Kodak Easy Share P880*. La imagen digital fue analizada con el programa *Adobe Photoshop 7.0* para determinar la abundancia relativa de las bandas de 18S y 28S, aceptándose sólo aquellas muestras que presentaron una razón 28S/18S superior a 2.0.

8. Transcripción Reversa

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR *Improm-II*TM *Reverse Transcription System (Promega Corporation)*, utilizando 0.2 µg de RNA total como templado, de acuerdo a instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido fue utilizado como templado en reacciones de polimerasa en cadena cuantitativas (qPCR).

9. Partidores.

Los partidores utilizados fueron diseñados a partir de las secuencias del mRNA presentes en GEN BANK y el uso del *software Amplifix1.5.4*. Una vez diseñados se evaluó la especificidad realizando una búsqueda *Blast* de las secuencias de cada oligonucleótido. Para cada set de partidores se determinaron las condiciones óptimas para amplificación del gen de interés. Los partidores fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies, Inc.*

Target	Partidor Sense 5´- 3`	Partidor Asense 5´- 3`
18S	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	GCT GGA ATT ACC GCG GCT
FGF23	CAG GCA CCG CTA TTC AGA AT	TGT GTG TGA GTA CAG ATT CCC C
EPO	AGG TCC CAG ACT GAG TGA AA	AGG CTA CGT AGA CCA CTG AT
Klotho	TGA CAA CTA CGT TCA AGT GGA CA	GCC GGA TGG CAG AGA AAT CA

10. PCR en tiempo real.

El qPCR fue realizado en un termociclador *Applied BioSystems*, método *SYBRGreen*. Se determinó la abundancia de 18S (transcrito constitutivo), para todas las muestras bajo las mismas condiciones: DEPC-H₂O, *buffer* Taq DNA Polimerasa, MgCl₂ 2.5 mM, *dNTPs* 0.2 mM, Taq DNA Polimerasa 2U (*Promega Corporation*). La determinación de la abundancia de los transcritos se realizó siguiendo la misma metodología descrita. En todas las reacciones se incluyó curva estándar con diluciones conocidas y crecientes del producto de PCR de interés. Finalmente, los resultados se expresaron como la razón del transcrito de interés/18S.

11. Extracción de proteínas

Se prepararon extractos de proteínas totales a partir de los tejidos de interés en *buffer* sacarosa mediante homogenizado en *Lysing Matrix D Tube (MP Biomedicals)*, 4°C tampón sacarosa con inhibidores de proteasas (*ROCHE*) y fosfatasa (*ROCHE*). Luego, el homogenado fue centrifugado a 4000rpm durante 15 minutos a 4° C (*Centrifuge 5415 R, Eppendorf*). El sobrenadante obtenido se guardó alicuotado a -20°C.

12. Western Blot

Se determinó la concentración de proteínas en cada muestra utilizando como estándar albúmina sérica bovina (*Winkler, BM-0150*). Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (4-12%). Se utilizó *buffer* de corrida (Tris 1.5%, Glicina 7.2%, SDS 0.5%), a 75 V durante 30 minutos y luego a 150 V hasta el final de la corrida del frente de migración.

Para la electrotransferencia se utilizó una cámara *Transblot-SD (BioRad)*, en una membrana de nitrocelulosa (*Trans-Blot Transfer Medium, BioRad*). Se bloqueó la membrana en 5% BSA o leche descremada en *buffer* TTBS, dependiendo del anticuerpo primario a usar. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario para FGF23 (ab123502, Abcam). Luego se incubó en presencia de anticuerpo secundario (*H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate, Santa Cruz*). La carga de proteínas de las distintas muestras fue verificada a través de la cuantificación de β -actina. Para el revelado, se utilizó quimio luminiscencia mediante *EZ-ECL Western Blotting Substrate (BI, Biological Industries)* y foto-

documentador de imágenes CLINX. La densitometría se realizó con el programa *Adobe Photoshop 7.0*.

13. Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar (*SEM*) de los valores obtenidos en cada condición experimental. Las variables continuas fueron analizadas mediante prueba T de *Student* o prueba U de *Mann-Whitney*, según distribución de los datos. Para los datos múltiples seriados se utilizó ANOVA más prueba de Tukey. Se aceptó como nivel de significancia estadística un valor de $P < 0.05$.

IX. RESULTADOS

Implementación del modelo animal

El modelo experimental utilizado fue el de ERC secundario a nefropatía por depósito de cristales de oxalato en murinos. Este modelo produce un rápido deterioro de la función renal, aumento importante en la [FGF23]_p y anemia; además de otras características típicas de la ERCT⁶⁵. R ratones machos C57BL/6 fueron alimentados con dieta sin calcio y alta en oxalato (50µM/g de alimento) entre 14 y 21 días, luego se mantuvieron 7 días con dieta normal (21 a 28 días después del inicio de la dieta con oxalato). Para determinar si el animal presentaba ERC, semanalmente se estudió si aumentaba el nitrógeno ureico plasmático (indicador de caída de la VFG). Además, se realizaron estudios histológicos renales a las 4 semanas luego de haber iniciado el protocolo de nefropatía por oxalato, para determinar daño estructural (alteración de la estructura tubular, depósito de cristales intratubulares e infiltrado inflamatorio). Para evaluar alteraciones fisiopatológicas secundarias a ERC, se midió hematocrito, hemoglobina y fosfato plasmático, para evidenciar desarrollo de anemia e hiperfosfatemia.

Se realizó el seguimiento semanal del nitrógeno ureico plasmático (BUN) a animales control y a animales con la dieta alta en oxalato descrita, por un período de 5 semanas, tomando como tiempo de inicio el momento en que se realizó el cambio a la dieta inductora de nefropatía por oxalato. Se observó que el grupo con dieta alta en oxalato experimentó un progresivo y mantenido aumento del BUN, detectable desde la segunda semana hasta el fin del seguimiento (Figura 3).

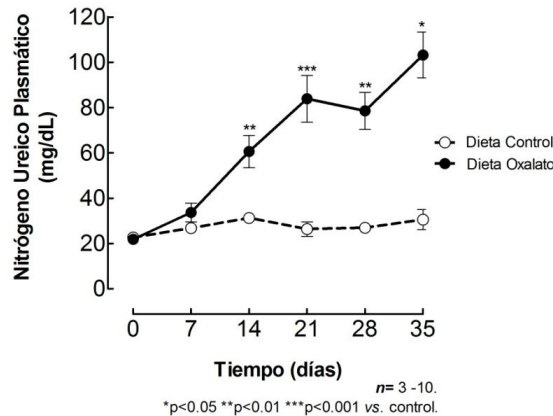


Figura 3. Evolución del nitrógeno ureico plasmático en grupo control vs. grupo inducción nefropatía por oxalato. Se grafican medias \pm SEM.

Los siguientes parámetros no-hematológicos fueron comparados entre el grupo ERC (animales en el día 21-28 post inicio dieta alta en oxalato) vs. el grupo control: a) peso final del animal: no presentó diferencias significativas entre ambos grupos, b) variación de peso en el tiempo de estudio (diferencia entre peso final y peso inicial): fue positiva en el grupo control y negativa en el grupo ERC, con diferencia significativa entre ambos grupos; c) valores plasmáticos del nitrógeno ureico y fósforo: fueron significativamente más altos en el grupo ERC vs. grupo control. (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros no hematológicos grupo control vs ERC. Se indican media \pm SEM.

	Control	ERC	p-value (t-test)
Peso (g)	27.8 \pm 2.4 (n=4)	21.4 \pm 1.7 (n=6)	0.053
Peso final – Peso inicial (g)	4.7 \pm 1.1 (n=4)	- 4.1 \pm 1.6 (n=6)	**0.0036
BUN (mg/dL)	27.5 \pm 7.2 (n=6)	76.8 \pm 7.2 (n=5)	**0.0014
Fosfatemia (mg/dL)	8.5 \pm 0.8 (n=5)	12.9 \pm 0.4 (n=6)	**0.0004

Por otro lado, la histología renal del grupo ERC en relación al grupo control muestra infiltrado mononuclear, pérdida de la estructura tubular y depósito de cristales. Estos hallazgos son compatibles con nefropatía por cristales de oxalato (Figura 4).

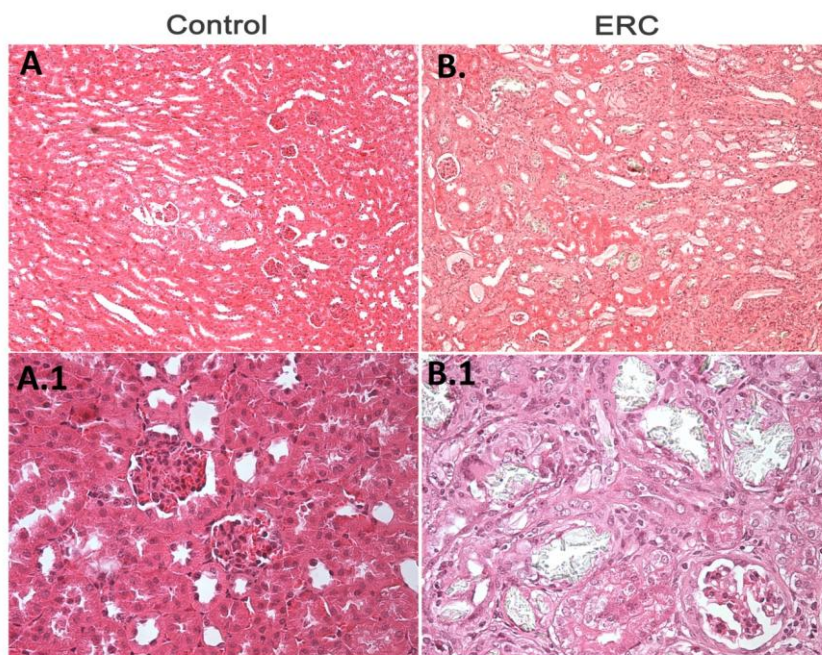


Figura 4. Histología tejido renal ratones control y con nefropatía por oxalato (tinción hematoxilina-eosina). **A.** Tejido cortical renal ratón control (vista microscopio 10x), **A.1.** Tejido cortical renal ratón control (vista microscopio 40x). **B.** Tejido cortical renal ratón con nefropatía por oxalato (vista microscopio 10x), **B.1** Tejido cortical renal ratón con nefropatía por oxalato (vista microscopio 40x).

FGF23 en plasma y MO de animales ERC

Para evaluar si en nuestro modelo experimental de ERC se alteraba la expresión de FGF23, analizamos los niveles plasmáticos, la abundancia de mRNA y la proteína FGF23 en MO en muestras entre los 21 y 28 días, fin del periodo previo al suministro de EPOrh. Inicialmente, para la caracterización de ERC medimos FGF23 intacto (iFGF23) en plasma, que corresponde a la proteína FGF23 de longitud total (masa molecular ~ 32kDa) y que es la biológicamente activa. La concentración plasmática de iFGF23 en el grupo ERC resultó ser 10 veces mayor que en el grupo control (Figura 5A). Con respecto a la abundancia de FGF23 en la MO de ratones ERC, se encontró un aumento del mRNA de FGF23 en el grupo ERC, de 5 veces respecto al grupo control (Figura 5B). La medición de FGF23 proteína en MO resultó ser 6.0 veces mayor en ERC vs. el grupo control (Figura 5C).

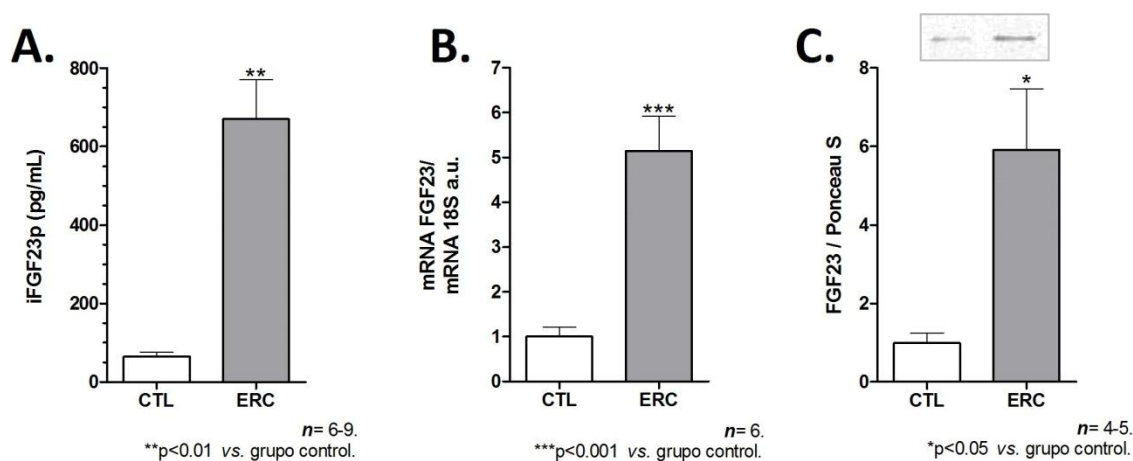


Figura 5. Niveles FGF23 grupo control vs ERC. A. Nivel plasmático de FGF23 (intacto). **B.** mRNA de FGF23 en médula ósea. **C.** Proteína FGF23 en médula ósea. Se grafican medias + SEM. Barras blancas: grupo control. Barras grises: grupo ERC.

Expresión de EPO y Klotho renal en ERC

Estudios recientes han mostrado que la ERC experimental (nefrectomía 5/6)⁸⁰ puede modificar la expresión renal de EPO. Encontramos que la ERC por oxalato aumentó la abundancia de mRNA EPO, la que resultó ser 6.5 veces mayor en el grupo ERC vs. el grupo control (Figura 6A). Por otro lado, existen varios reportes de mRNA de Klotho en riñón y además, se acepta que es en este órgano (tanto en murinos como en el ser humano) donde el nivel de mRNA de Klotho alcanza es más alto⁸¹. Nuestros resultados muestran que la abundancia del mRNA de Klotho renal fue un 60% menor en ERC vs. el grupo control. (Figura 6B).

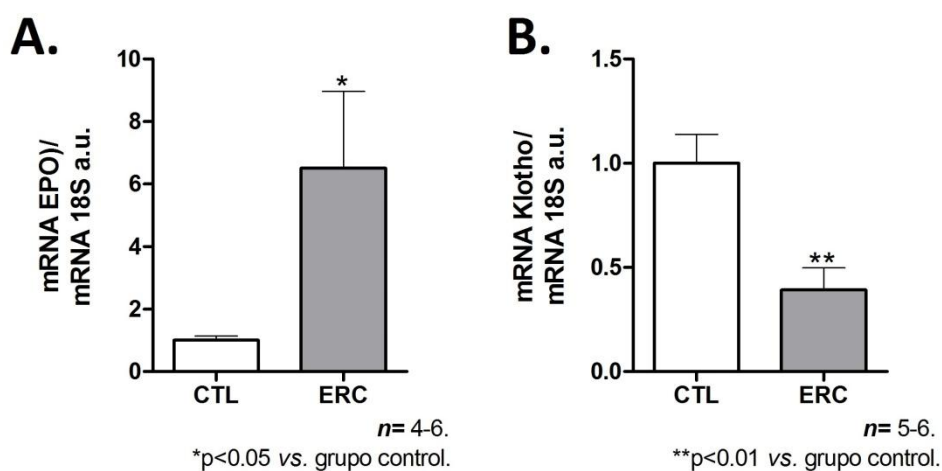


Figura 6. Efecto de ERC sobre los niveles del transcrito de EPO y Klotho en riñón. **A.** Abundancia de mRNA de EPO renal en ratones control vs. ERC. **B.** Abundancia de mRNA de Klotho renal en ratones control vs. ERC. Se grafican medias + SEM. Barras blancas: grupo control. Barras grises: grupo ERC.

Receptores de FGF23, Klotho y EPOR en médula ósea ERC

Considerando la alteración del eje EPO-FGF23-Klotho presente en los animales ERC, determinamos la abundancia de los transcritos de los receptores de FGF23, FGFR1 y FGFR3, además de la expresión del cofactor Klotho y la expresión del receptor de eritropoyetina (EPOR) en la MO. Encontramos que la abundancia del transcrito de FGFR1 es 2.1 veces mayor en los animales ERC (Figura 7A); en cambio, la expresión de FGFR3 no presentó diferencia significativa en ERC vs. el grupo control (Figura 7B). Existe evidencia previa de la presencia de mRNA de Klotho en MO⁸¹. Nosotros también detectamos el mRNA de Klotho en la MO de animales control. Además, encontramos que la ERC aumentó la expresión del

mRNA de Klotho 4.5 veces vs. el grupo control (Figura 7C). La abundancia del mensajero de EPOR en MO presentó un alza de 3.2 en el grupo ERC respecto al control (Figura 7D).

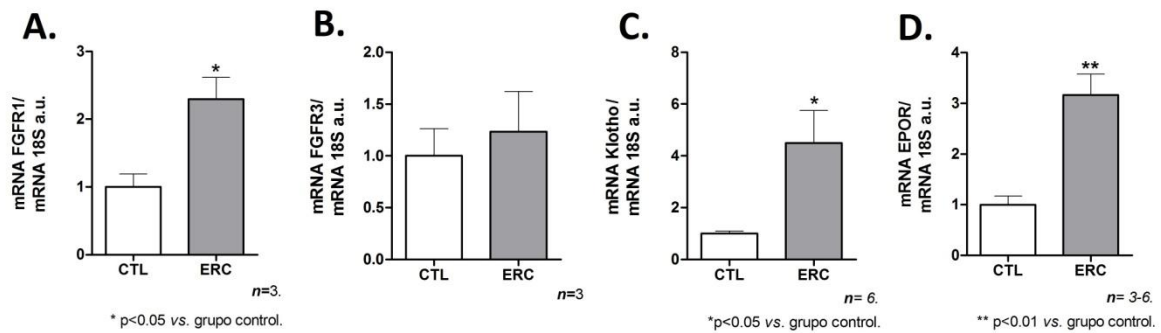


Figura 7. Expresión genes en MO de ratones control vs ERC. **A.** FGFR1. **B.** FGFR3. **C.** Klotho. **D.** EPOR. Se grafican medias + SEM. Barras blancas: grupo control. Barras grises: grupo ERC.

Parámetros Hematológicos en ERC

Se realizó un registro semanal de la evolución del hematocrito de los animales que iniciaron la dieta alta en oxalato en relación al grupo con dieta control. Se observó que el grupo con dieta alta en oxalato experimentó una caída del hematocrito, detectable a partir de la segunda semana, que se sostuvo hasta el final del seguimiento (quinta semana). (Figura 8).

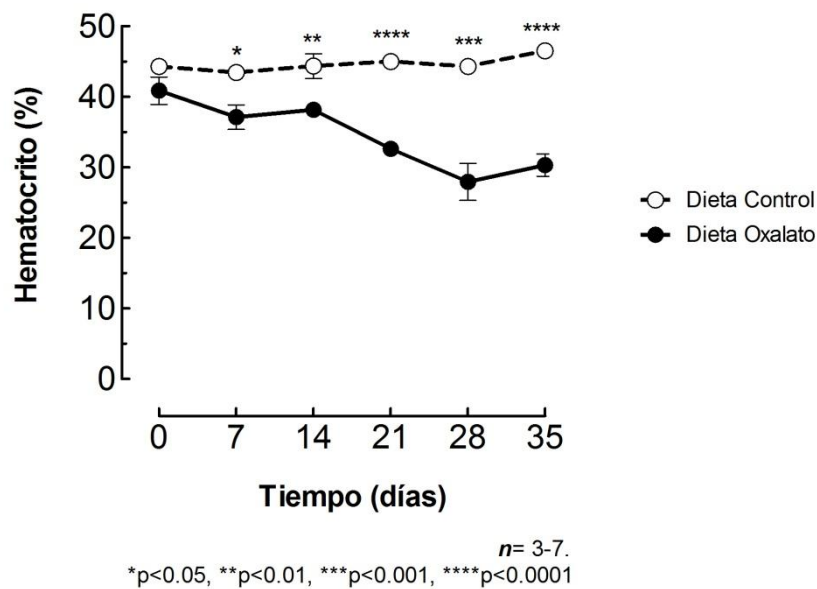


Figura 8. Evolución hematocrito del grupo inducción nefropatía por oxalato vs. grupo control. Se grafican medias ± SEM.

En el grupo ERC los valores de hemoglobina y hematocrito fueron de 9.1 ± 1.0 g/dL y $28.7 \pm 1.9\%$, respectivamente, significativamente más bajos que en el grupo control (13.2 ± 0.3 g/dL y $39.5 \pm 0.7\%$). (Figura 9A y 9B). Se evaluó también el índice de producción reticulocitaria (IPR), que corresponde al porcentaje de reticulocitos normalizado al valor de hematocrito normal, el que da cuenta de la eritropoyesis efectiva. Los animales ERC presentaron un IPR significativamente menor que el grupo control (0.8 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.1), sugiriendo anemia arregenerativa; por otro lado, el porcentaje de reticulocitos (sin ajustar por hematocrito) no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. (Figura 9C Y 9D).

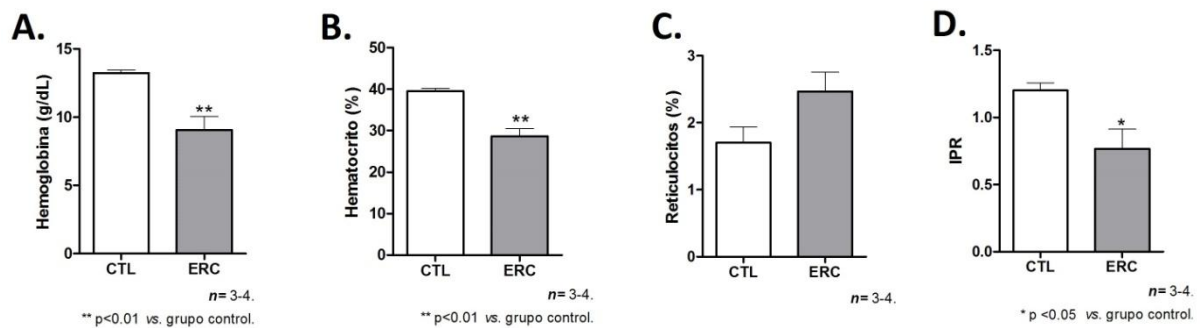


Figura 9. Parámetros hematológicos grupo control vs ERC. **A.** Hematocrito. **B.** Hemoglobina. **C.** Porcentaje de reticulocitos. **D.** Índice de producción reticulocitaria (IPR). Se grafican medias + SEM. Barras blancas: grupo control. Barras grises: grupo ERC.

La abundancia relativa de los progenitores y precursores eritropoyéticos de la MO es similar en ratones sanos y ERC

Los animales ERC desarrollaron anemia arregenerativa, la que podría resultar de la alteración de los compartimientos de los progenitores y precursores eritropoyéticos de la MO. Por lo tanto, determinamos la abundancia relativa de las células eritroides de la MO en muestras de MO de ratones control y ERC, a través de citometría de flujo de acuerdo a la expresión de los marcadores de superficie celular CD71 y Ter119. CD71 es un marcador de superficie celular que corresponde al receptor de transferrina y se expresa en progenitores eritropoyéticos (BFU-e, pero principalmente en CFU-e) y también en proeritroblastos y eritroblastos tempranos. Por otro lado, el marcador Ter119 corresponde a una glicoforina A y se expresa en precursores eritropoyéticos más tardíos (eritroblastos tempranos y tardíos). Con estos dos marcadores fue posible identificar cuatro grupos de poblaciones celulares (Figura 10). Desde el estadio de menor diferenciación al de mayor diferenciación eritropoyética, estos grupos son los siguientes: el primer grupo es negativo para CD71 y negativo para Ter119, en éste se encuentra la mayoría de las células de la MO (no eritropoyéticas) más los progenitores BFU-e. Por esta razón, a este primer grupo se le llamó **“Otros y BFU-e”**; el segundo grupo corresponde a las células con marcaje positivo para CD71 pero negativo para Ter119, este corresponde a los progenitores eritroides, por lo que será llamado **“CFU-e y BFU-e”**; el tercer grupo contiene células con marcaje positivo para ambos marcadores, éste contiene a los precursores tempranos y se le denominará como **“proeritroblastos y eritroblastos tempranos”**; y el cuarto grupo, negativo para CD71 y positivo para Ter119, es el grupo de los **“eritroblastos tardíos”**.

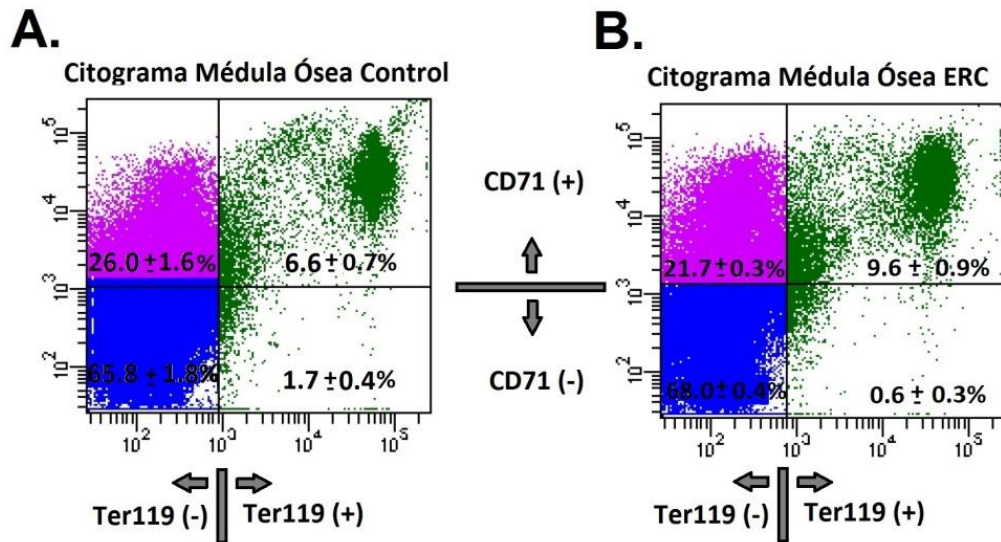


Figura 10. Citogramas representativos de células de la médula ósea. Se aislaron células de la MO de animales CTL y ERC, las que fueron teñidas con los anticuerpos contra Ter119 y CD71, posteriormente se fijaron y se llevaron a un citómetro de flujo. **A.** Citograma representativo animal control. **B.** Citograma representativo animal con ERC. Los porcentajes indicados corresponden a las medias \pm SEM de cada grupo celular.

A continuación se indica la composición de la MO encontrada en el grupo control según los grupos celulares descritos más arriba. El grupo celular “**Otros y BFU-e**” (CD71 (-)/Ter119 (-)) representa el **65.8 \pm 1.8%** del total de las células de la MO, el grupo de “**CFU-e y BFU-e**” (CD71 (+)/Ter119 (-)) corresponde al **26.0 \pm 1.6%** de las células de la MO, el grupo “**proeritroblastos y eritroblastos tempranos**” (CD71 (+)/Ter119 (+)) equivale al **6.6 \pm 0.7%**, finalmente; el grupo “**eritroblastos tardíos**” ocupa el **1.7 \pm 0.4%** de las células de la MO. Se comparó la composición de la MO del grupo ERC vs. el grupo control y no se encontraron diferencias significativas en los grupos celulares “Otros y BFU-e”, “CFU-e y BFU-e” y “eritroblastos tardíos”. El grupo de “proeritroblastos y eritroblastos tempranos” en el grupo ERC fue de **9.6 \pm 0.9%**, significativamente mayor que el grupo control cuyo valor resultó ser un **6.6 \pm 0.7%** (Figura 11, Tabla 2).

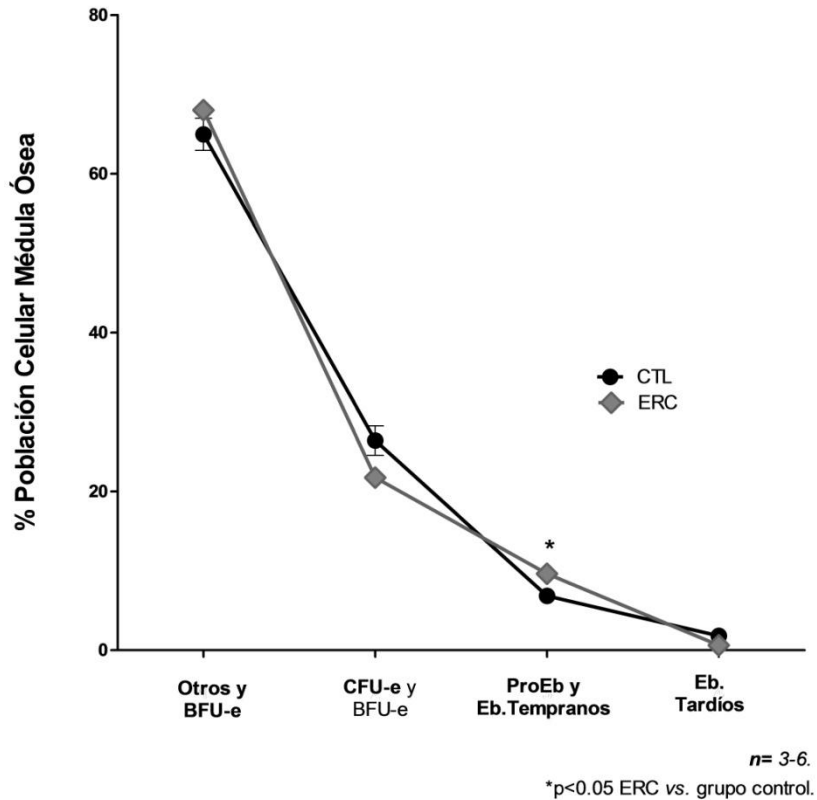


Figura 11. Composición médula ósea grupo control vs. ERC. Se grafican medias y SEM.

En conclusión, se logró implementar un modelo de ERC mediante el depósito de cristales de oxalato de calcio, no usado previamente en el laboratorio, que muestra alteraciones del eje FGF23-Klotho EPO similares a las de los pacientes con ERC. Además, se caracterizó la anemia y se determinó la composición de progenitores y precursores eritrocitarios en MO de ratones control y ERC. En el grupo ERC, encontramos una anemia arregenerativa y un aumento leve del grupo “proeritroblastos y eritroblastos tempranos” vs. el grupo control.

EPOrh tiene un efecto diferencial sobre la eritropoyesis de la MO de ratones sanos y ERC

Para caracterizar el efecto de EPOrh sobre la composición de la línea eritroide de la MO se inyectó EPOrh (5000 UI/Kg s.c, RecormonTM, Roche) a ratones control y ERC. La dosis fue definida en base a trabajos previos donde se evaluó efectos de EPOrh en murinos control y con falla renal aguda⁷⁷, se eligió la vía de administración subcutánea porque es la que se usa en los pacientes ERC.

Tanto en el grupo control como en el grupo ERC, se evaluó el *pool* de precursores y progenitores a través de citometría de flujo de extractos de MO con los marcadores CD71 y Ter119 (como ya se mencionó más arriba) luego de la inyección de EPOrh y además, se evaluaron parámetros sanguíneos hematológicos.

Con respecto a los parámetros sanguíneos hematológicos del grupo control, se vio que la hemoglobina aumentó a las 24 y 48 horas de la inyección de EPOrh (15.0 ± 0.2 g/dL a las 24 horas y 13.8 ± 0.1 g/dL a las 48 horas vs. 13.2 ± 0.3 g/dL al tiempo 0h), el hematocrito del grupo control fue $39.5 \pm 0.7\%$ y aumentó significativamente a las 24 y 48 horas a $44.8 \pm 1.7\%$ y $42.4 \pm 1.0\%$, respectivamente; el IPR aumentó significativamente a las 24 y 48 horas post EPOrh (2.4 ± 0.3 a las 24 horas, 2.9 ± 0.4 a las 48 horas vs. 1.2 ± 0.1 al tiempo 0h) y por último, el porcentaje reticulocitos presentó una tendencia al alza luego del tratamiento con EPOrh a las 24 horas y un aumento significativo a las 48 horas post EPOrh (2.5 ± 0.3 a las 24 horas, 3.0 ± 0.4 a las 48 horas vs. 1.7 ± 0.2 al tiempo 0h) (Figura 12A, 12B, 12C y 12D).

En relación a los parámetros hematológicos en el grupo ERC, observamos que la hemoglobina, el hematocrito y el IPR no presentaron variación significativa posterior a 24 horas del suministro de EPOrh subcutánea. Además, el porcentaje de reticulocitos disminuyó significativamente a las 24 horas, contrariamente a lo ocurrido en el grupo control (2.5 ± 0.3 en ERC 24h vs 1.7 ± 0.2 en el grupo ERC tiempo 0h). (Figura 12A.1, 12B.1, 12C.1 y 12D.1)

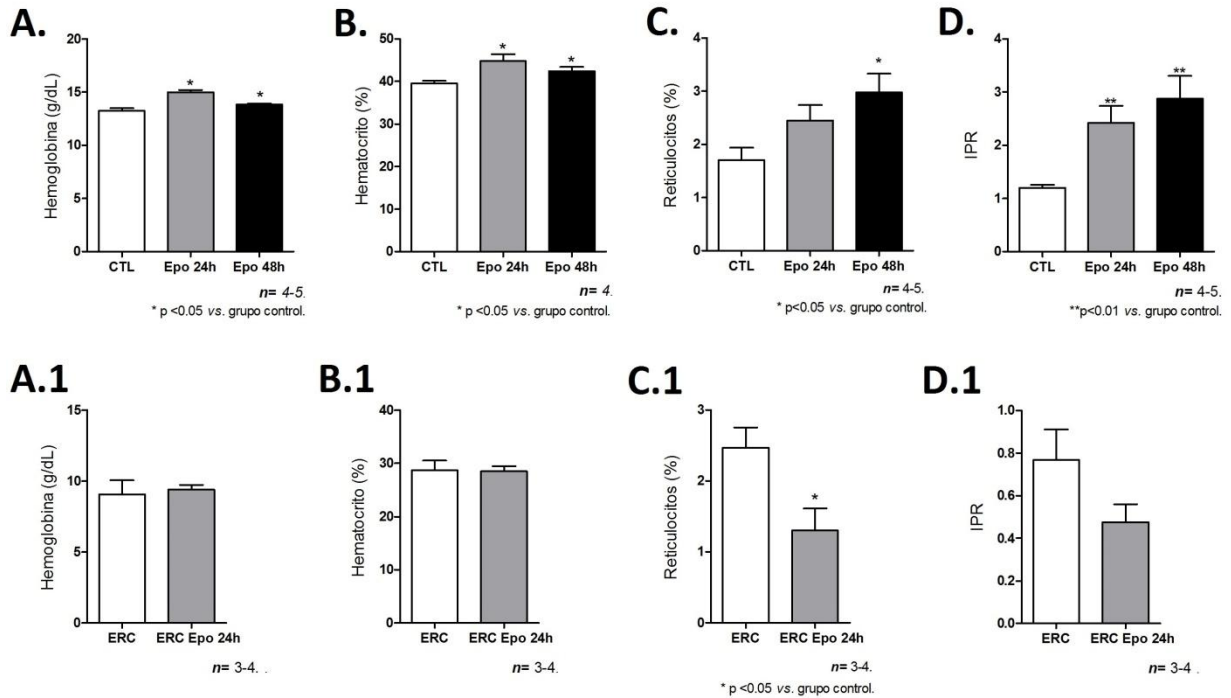
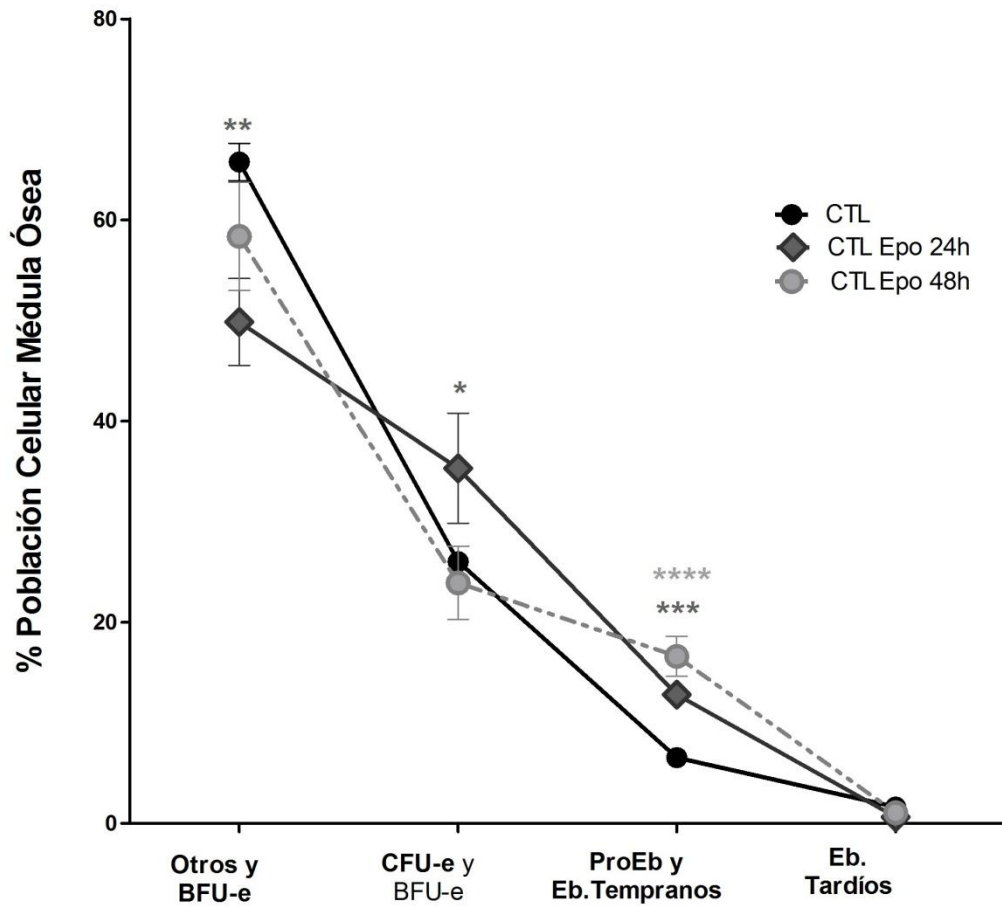


Figura 12. Parámetros hematológicos al tiempo 0h y luego de EPOrh subcutánea, grupo control (A: hemoglobina, B: hematocrito, C: porcentaje de reticulocitos y D: índice de producción reticulocitaria) y grupo ERC (A.1: hemoglobina, B.1: hematocrito, C.1: porcentaje de reticulocitos y D.1: índice de producción reticulocitaria). Se grafican medias + SEM. Barras blancas: grupo control. Barras grises: grupo ERC.

En relación al *pool* de células de la línea eritroide de la MO de ratones control, a las 24 horas post dosis de EPOrh se encontró una disminución del grupo “Otros y BFU-e” y un alza de los grupos “CFU-e y BFU-e” y “proeritroblastos y eritroblastos tempranos” con respecto al grupo control. Además, en este grupo, a las 48 horas post administración de EPOrh hubo un aumento significativo del grupo de “proeritroblastos y eritroblastos tempranos” en relación al tiempo 0h (CTL), la proporción del resto de los grupos no cambió significativamente (Figura 13 y Tabla 2).

Por otra parte, el *pool* de células eritropoyéticas de la MO de ratones ERC no presentó variación significativa en el porcentaje de ninguno de los grupos celulares a las 24 horas de la administración de EPOrh (Figura 14 y Tabla 2).



n= 4-6.

Otros y BFU-e: ***p*<0.01 CTL Epo 24h vs. tiempo 0h (CTL).
 CFU-e y BFU-e: **p*<0.05 CTL Epo 24h vs. tiempo 0h (CTL).
 ProEb. y Eb Tempranos: ****p*<0.001 CTL Epo 24h vs. tiempo 0h (CTL);
 *****p*<0.0001 CTL Epo 48h vs. tiempo 0h (CTL).

Figura 13. Composición médula ósea grupo ratones control y post Epo a las 24 y 48 horas. Se grafican medias ± SEM.

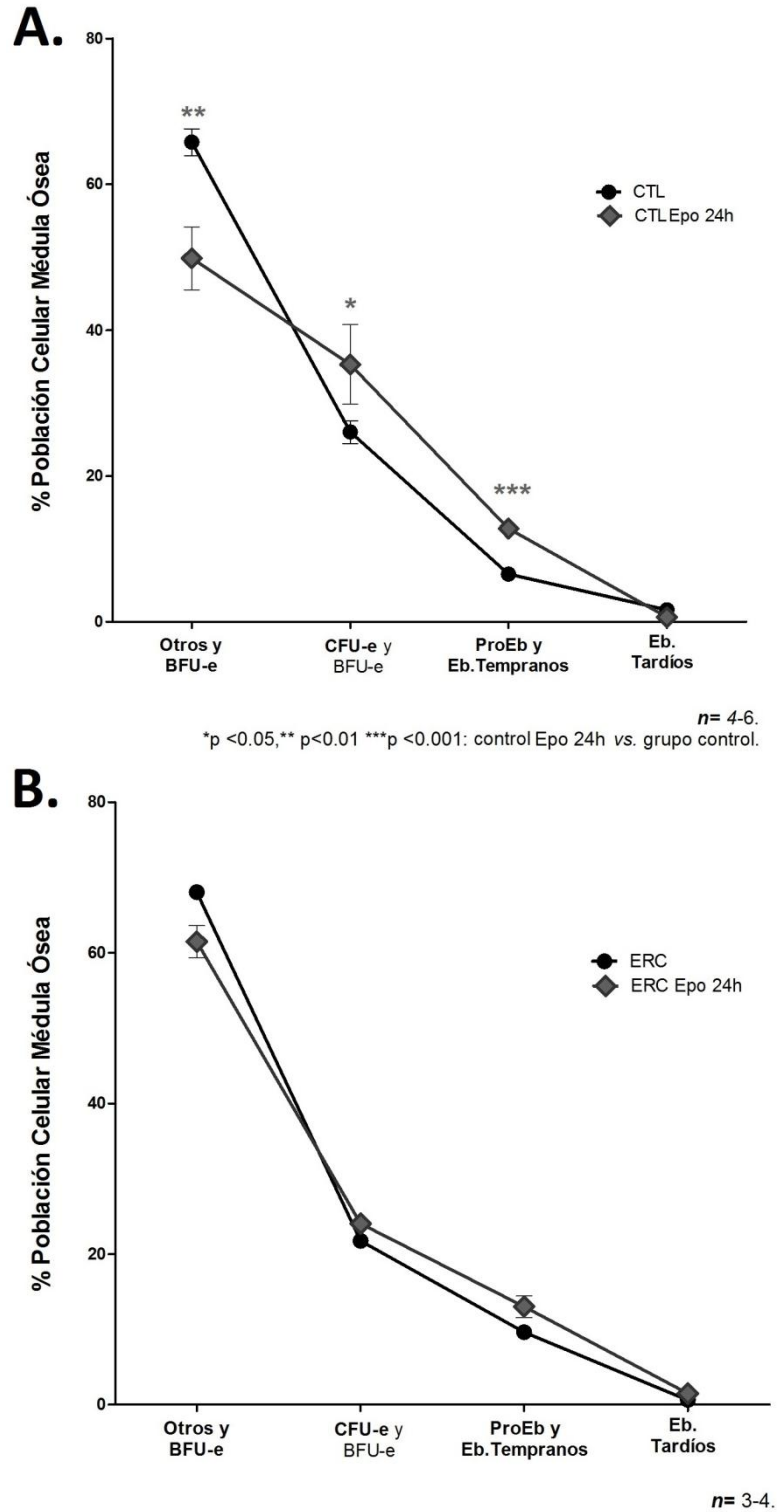


Figura 14. Composición médula ósea a las 0 y 24 horas post administración EPOrh subcutánea. A. Grupo ratones control (Datos grupo control ya mostrados en figura 13, se repiten para facilitar comparación con grupo ERC.) **B.** Grupo ratones ERC. Se grafican medias \pm SEM.

La siguiente tabla resume las medias \pm SEM de los grupos control y ERC a tiempo 0h y 24 horas post EPOrh.

Tabla 2. Medias \pm SEM de porcentajes de las poblaciones celulares eritropoyéticas de la MO (grupo ratones control, control 24 post administración s.c de EPOrh, ERC y ERC 24 horas post administración s.c de EPOrh).

	CTL (%)	CTL EPO 24h (%)	P-value (CTL vs. CTL EPO 24h)	ERC (%)	ERC EPO 24h (%)	P-value (ERC vs. ERC EPO 24h)
“Otros y BFU-e” CD71(-) / Ter119(-)	65.8 \pm 1.8	49.9 \pm 4.3	0.0048	68.0 \pm 0.4	61.5 \pm 2.2	0.0516
“CFU-e y BFU-e” CD71(+) / Ter119(-)	26.0 \pm 1.6	36.6 \pm 4.6	0.0330	21.7 \pm 0.3	24.1 \pm 1.0	0.1131
“Proeritroblastos y Eritroblastos tempranos” CD71(+) / Ter119(+)	6.6 \pm 0.7	12.8 \pm 0.7	0.0002	9.6 \pm 0.9	13.0 \pm 1.4	0.1201
“Eritroblastos Tardíos” (Q4) CD71(-)/Ter119(+)	1.7 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2	0.1221	0.6 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	0.0837
	(n=6)	(n=4)		(n=3)	(n=4)	

En conclusión, estos resultados muestran que el suministro de EPOrh indujo la diferenciación eritropoyética en la MO de ratones control. Esta fue evidente a las 24 horas con una caída porcentual transitoria del grupo celular “Otros y BFU-e” y un aumento porcentual también transitorio del grupo “BFU-e y CFU-e”, asociado a un alza de “proeritroblastos y eritroblastos tardíos” que se mantuvo hasta las 48 horas luego de la inyección de EPOrh. Además, el estímulo de la eritropoyesis en animales control también se reflejó a nivel periférico con un aumento del hematocrito, de la hemoglobina y del IPR a las 24 y 48 horas desde la monodosis de EPOrh. En contraste, en el grupo de animales ERC, EPOrh no indujo estímulo eritropoyético: a las 24 y 48 horas posteriores a EPOrh no se observaron cambios en los parámetros hematológicos medidos en sangre (hematocrito, hemoglobina e IPR), así como

tampoco hubo variación en ninguno de los grupos celulares en MO. Por último, el porcentaje de reticulocitos presentó una caída a las 24 horas de la dosis de EPOrh en el grupo ERC, inversamente a lo ocurrido en el grupo CTL. (Figura 12-14, Tabla 2). Estos datos indican que la ERC por oxalato induce una resistencia a la acción de EPOrh. Además, estos datos sugieren que esta resistencia a EPOrh en ERC estaría dada por una disminución o ausencia de respuesta al estímulo de EPO en las células eritroides de la MO para proliferar (las células de la línea eritroide que más proliferan son las BFU-e, y en menor medida CFU-e) asociado a una respuesta conservada al estímulo de EPO de las células eritroides de la MO que principalmente maduran y no proliferan (proeritroblastos y eritroblastos tempranos).

EPOrh aumenta la expresión de FGF23 en ratones control y ERC

Se buscó medir el efecto de EPOrh (una dosis subcutánea de 5000 UI/Kg, RecormonTM, Roche) sobre la expresión en MO y nivel plasmático de FGF23 en animales control y ERC en función del tiempo, con el fin de correlacionar con la respuesta hematopoyética.

EPOrh y FGF23 en MO de grupo control:

Estudiamos el curso temporal de expresión de FGF23 en la MO de ratones control después de 2, 4, 8, 24 y 48 horas luego de la inyección de EPOrh. Se observó que la abundancia del mRNA de FGF23 en la MO de ratones sanos aumenta en forma rápida, a partir de las 2 horas, y transitoria. El valor máximo fue a las 4 horas y fue de 147.2 veces *vs.* el grupo control (tiempo 0h), mientras que a las 48 horas no encontramos diferencia con respecto al tiempo=0h. (Figura 15A). En relación a la abundancia de proteína FGF23 en extractos de MO de ratones sanos, se midió solamente a las 24 y 48 horas. Como resultado, se encontró que a las 48 horas post inyección de EPOrh hay un aumento significativo (3.3 veces *versus* t=0h (Figura 15B).

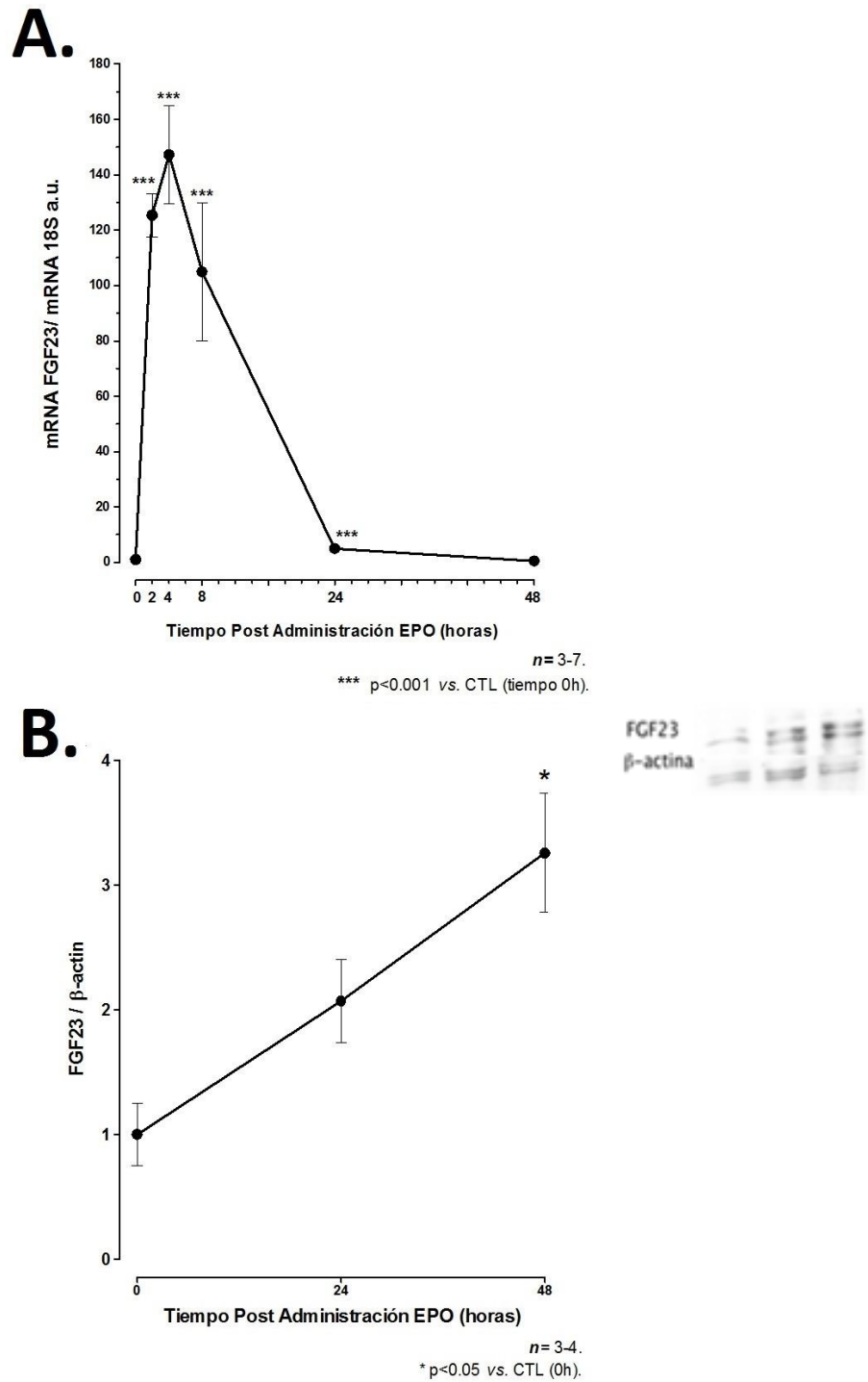


Figura 15. Efecto de la inyección de EPOrh sobre: A) la abundancia del mRNA de FGF23 en MO de ratones control a las 0 (CTL), 2, 4, 8, 24 y 48 horas y B) la cantidad de FGF23 en MO de ratones control en tiempo 0h (CTL), 2, 4, 8, 24 y 48 horas. Se grafican medias \pm SEM.

EPOrh y FGF23 en MO de grupo ERC vs. control:

Se midió la abundancia de FGF23 en extractos de MO de ratones ERC al tiempo 0 y 24 horas luego de EPOrh. Se observó que la abundancia del mRNA de FGF23 en la MO de ratones ERC aumenta significativamente 3.4 veces a las 24 horas desde el suministro de EPOrh vs. el valor basal en ERC (tiempo 0h). (Figura 16). Como ya se indicó más arriba, en el grupo control, también se observó un aumento, de 4.9 veces, a las 24 horas desde la inyección de EPOrh. (Figura 15A y Figura 16).

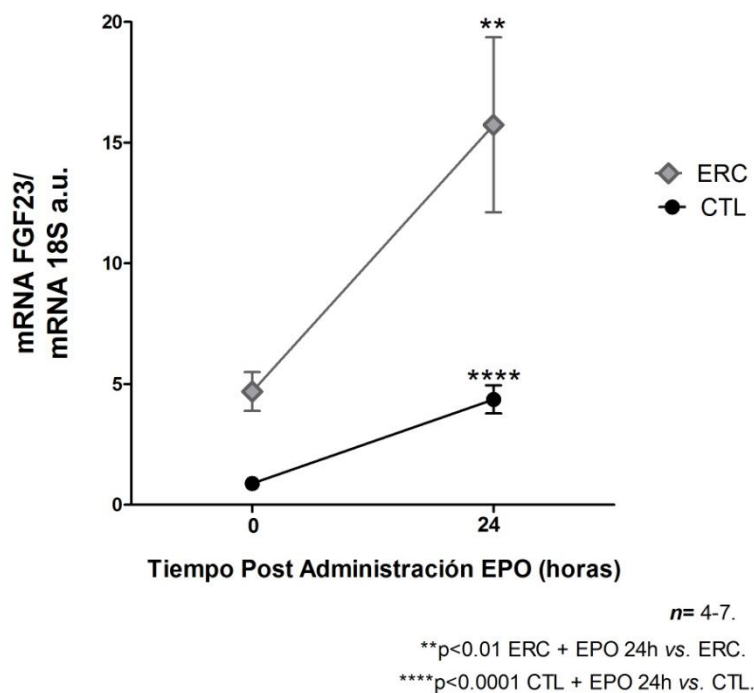


Figura 16. Efecto del suministro de EPOrh sobre la abundancia del mRNA de ratones ERC vs. control: mRNA FGF23 en médula ósea al tiempo 0h y a las 24 horas post inyección EPOrh en ratones control vs. ERC. Se grafican medias \pm SEM. (Valores de grupo control ya fueron representados en la figura 15, se grafican nuevamente para facilitar la comparación con el grupo ERC).

EPOrh y FGF23 en plasma de animales control vs. ERC:

El FGF23 es una proteína de 251 aminoácidos (~32kDa), con una única porción c-terminal (aa180-251) que le da gran afinidad a la unión con el complejo receptor FGFR/Klotho⁷⁹. Existen dos tipos de test de ELISA que miden FGF23. A uno de ellos se le denomina iFGF23 (de “FGF23 intacto”), que mide la proteína completa; el otro se conoce como cFGF23 (de “FGF23 porción c-terminal”) que mide tanto los fragmentos de FGF23 c-terminal (~12kDa) como la porción que va desde el aa180 al aa251 del FGF23 biológicamente activo (iFGF23). Considerando que la inyección de EPOrh causa un aumento rápido de la expresión de FGF23 y que la ERC además podría afectar la metabolización de esta proteína, se midió la [FGF23]p (iFGF23 y cFGF23).

- Animales control: realizamos mediciones a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas desde la dosis de EPOrh. Encontramos un aumento de iFGF23 a las 2, 4, 8 y 24 horas, alcanzando un valor máximo a las 8 horas de 8 veces vs. el tiempo 0h (Figura 17A). Por otra parte, cFGF23 también se encontró elevado en todos los tiempos medidos desde la inyección de EPOrh, con un aumento máximo a las 8 horas de 96 veces vs. el tiempo 0h (Figura 17B).

- Animales ERC: como ya se mencionó más arriba en “metodología” (ver Sección VIII, p.18), para la medición de la concentración de FGF23 plasmático en ERC se realizó un primer y un segundo diseño experimental:

i) El primer método fue inyectar EPOrh a animales ERC (5000 UI/Kg s.c, RecormonTM, Roche), los que fueron sacrificados a las 24 horas para distintas mediciones, entre ellas, iFGF23 (n=4); estas mediciones plasmáticas del grupo ERC a las 24h desde EPOrh se compararon con el iFGF23 de animales ERC control (ERC sin EPOrh) que fueron sacrificados para distintas mediciones (n=5). Como resultado, se obtuvo que a las 24 horas de la dosis de EPOrh en animales ERC, iFGF23 no presentó diferencias significativas. Cabe destacar la variabilidad de los datos del grupo ERC control.

ii) Posteriormente, para la obtención de valores precoces de [FGF23]p en ERC se diseñó un segundo experimento con los animales ERC disponibles (como ya se mencionó en la

metodología en la Sección VIII, p.18): se contó sólo con 3 animales ERC a los que, según protocolo, se les realizaron extracciones seriadas de plasma al tiempo 0h, a las 2, 4, 8 y 24 horas post inyección de EPOrh (por tanto, $n=3$ por cada punto, mismos 3 animales en cada punto). Los resultados de este experimento mostraron aumento de cFGF23 a las 4 y 8 horas post administración de EPOrh en el grupo ERC; sin embargo, iFGF23 no mostró variación a ninguno de los tiempos medidos luego del suministro de EPOrh. (Figura 17 A y B).

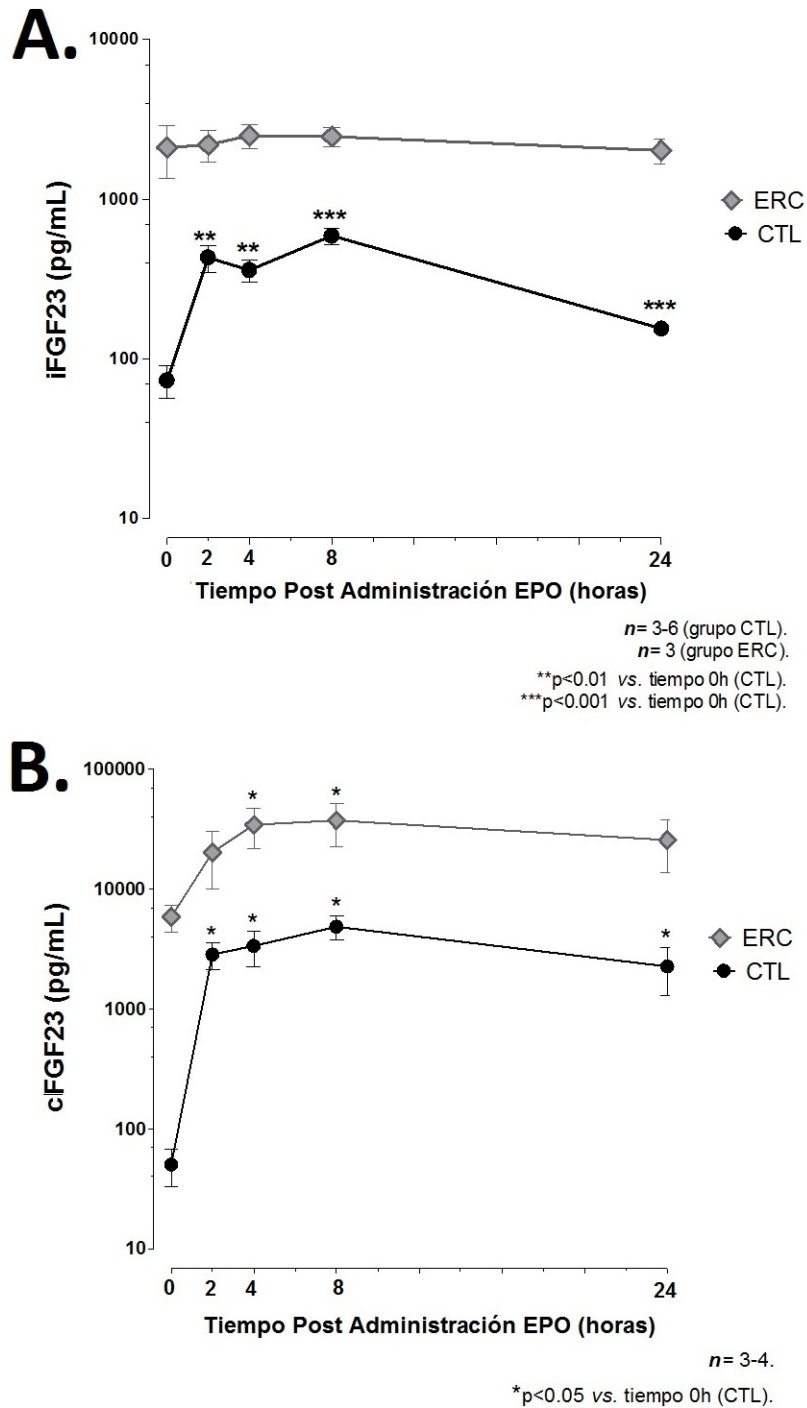


Figura 17. Efecto del suministro de EPOrh sobre la [FGF23]p en ratones control vs. ERC: A) FGF23 intacto plasmático a las 0, 2, 4, 8 y 24 horas post inyección EPOrh en ratones control vs. ERC y B) FGFG23 c-terminal plasmático post EPOrh a las 0, 2, 4, 8 y 24 horas en ratones control vs. ERC. Se grafican medias \pm SEM. (En el grupo de animales control, los animales intra e inter grupo difieren entre sí ($n=3-6$ por cada tiempo)). Para la medición del grupo ERC, se contó sólo con 3 animales en el tiempo 0h a los que, según protocolo, se les extrajo plasma al tiempo 0h para medición de FGF23; luego se les administró EPOrh, y se tomaron muestras de plasma seriadas a las 2, 4, 8 y 24 horas para medición de FGF23, como se muestra en el gráfico).

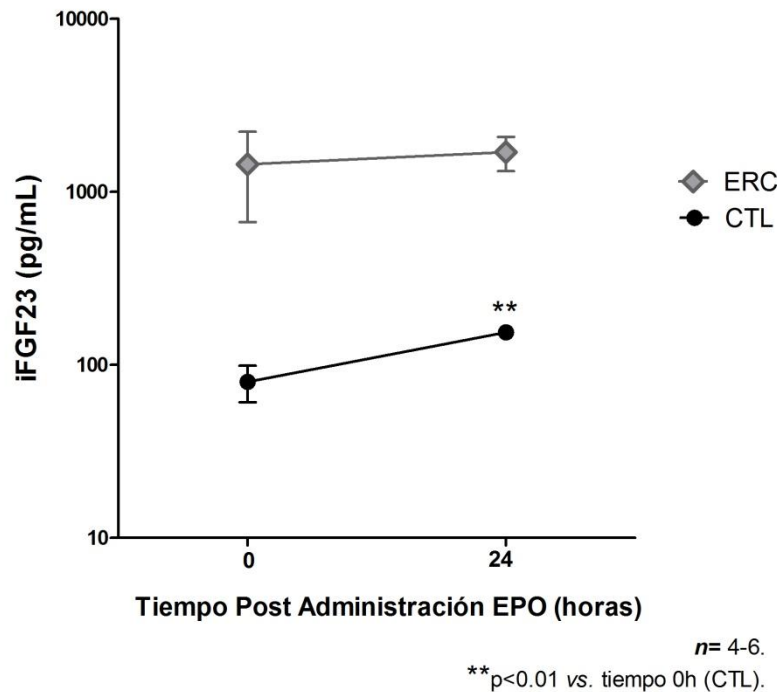


Figura 18. Efecto del suministro de EPOrh sobre la [FGF23]p en ratones control vs. ERC: iFGF23 plasmático a las 0 y 24 horas post inyección EPOrh en ratones control vs. ERC. Se grafican medias \pm SEM. En esta metodología, cada punto corresponde a media de grupos de animales diferentes entre sí (grupo control tiempo 0h (n=5), grupo control 24 horas post EPOrh (n=6), grupo ERC tiempo 0h (n=5), grupo ERC 24 horas post EPOrh (n=4)).

Finalmente, se calculó la fracción entre FGF23 c-terminal y su valor correspondiente de FGF23 intacto en cada animal, ERC y control. Se graficó una curva temporal de esta relación cFGF23/iFGF23 al tiempo 0h y horas después de la inyección de EPOrh (2, 4, 8 y 24 horas. Los datos post 48 horas disponibles sólo para el grupo control) (Figura 19). A las 2 horas de EPOrh la relación cFGF23/iFGF23 aumenta en ambos grupos y en mayor medida en el grupo ERC (Figura 19). Este hallazgo podría explicarse por un probable compromiso en la capacidad de clivaje de los fragmentos c-terminal de FGF23 en el plasma de ERC, como se ha sugerido en la literatura⁷⁹. Aunque se postulan varios factores posiblemente contribuyentes, el mecanismo que explica esta disminución de la tasa de degradación de cFGF23 en ERC es todavía incierto.

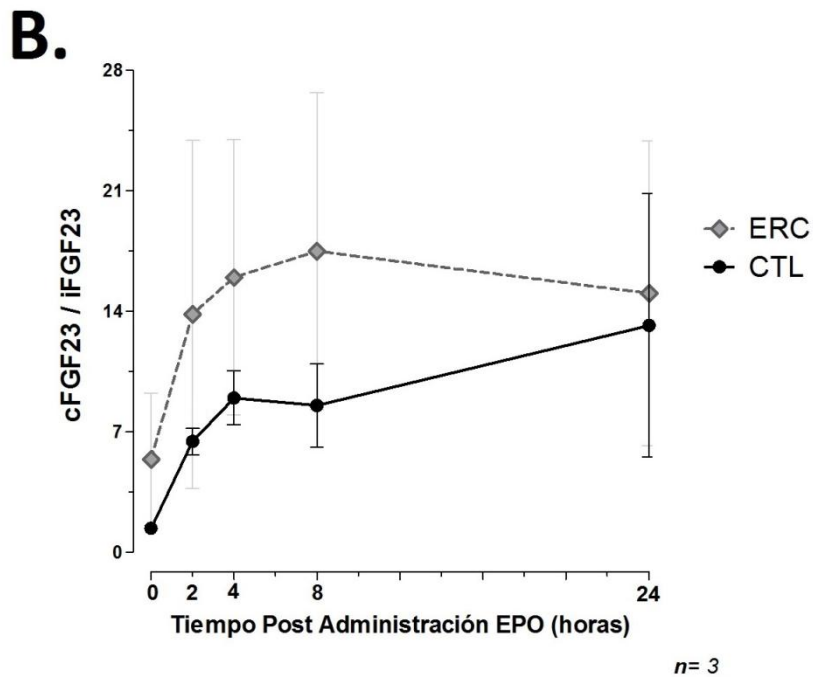
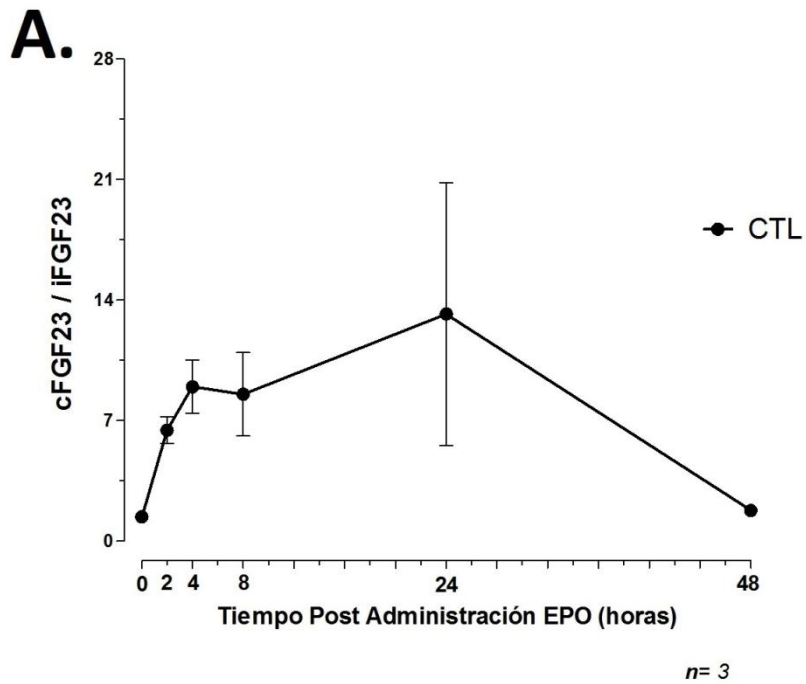


Figura 19. Efecto del suministro de EPO_rh sobre la fracción FGF23 c-terminal/FGF23 intacto en ratones control y ERC. A) cFGF23/iFGF23 a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas luego de una dosis de EPO_rh en el grupo control B) cFGF23/iFGF23 a las 0, 2, 4, 8 y 24 horas luego de una dosis de EPO_rh en grupo control y ERC (se repiten datos grupo control de Figura 19.A). Se grafican medias \pm SEM. Cálculo de relación cFGF23/iFGF23 se realizó a partir de datos de iFGF23 y cFGF23 ya expuestos en la Figura 17.

Resumiremos los puntos más relevantes de los resultados de los gráficos 15 a 18: a) en el grupo control EPOrh estimula la expresión del mRNA de FGF23 en la MO y de [FGF23]p, de forma similar (rápida y transitoriamente), b) EPOrh estimula la expresión del mRNA en MO de ERC y c) en ERC cFGF23 aumenta a las 4 y 8 horas luego de la dosis de EPOrh y presenta una clara tendencia al alza en el resto de los puntos medidos. En conclusión, EPOrh indujo temprana y transitoriamente un aumento en la expresión y secreción de FGF23 en la MO control y ERC.

Finalmente; con respecto a iFGF23 post EPOrh en ERC, cuando se realizó la primera metodología (Figura 18, animales diferentes para cada punto, extracción de sangre vena cava al momento del sacrificio) iFGF23 no presentó variación significativa a las 24 horas post EPOrh, pero sí una tendencia al alza donde cabe mencionar la variabilidad de los datos del grupo ERC al tiempo 0h (Figura 18). Los datos obtenidos a partir de la segunda metodología (Figura 17, mismos 3 animales a los que se les realizó mediciones seriadas luego la dosis de EPOrh, extracción de pequeña muestra de sangre de la cola del animal) vimos que iFGF23 en ERC no muestra cambios luego de EPOrh en ninguno de los tiempo medidos. El no cambio de iFGF23 en ERC podría explicarse por un aumento temprano de la degradación de iFGF23 post EPOrh en el animal ERC; esto es, que FGF23 se secrete inactivo desde las células hematopoyéticas, o que exista mayor clivaje de iFGF23 en el plasma (menor vida media de iFGF23) o también, por un aumento de la degradación de iFGF23 post recolección de plasma, esto último considerando reportes de la literatura de inestabilidad de iFGF23 post recolección de muestras⁸².

X. CONCLUSIÓN

A continuación se detallan los principales hallazgos de este trabajo: **a)** en ERC no hubo cambio del hematocrito, de la hemoglobina, del IPR, ni cambios en la proporción de los progenitores y precursores eritropoyéticos de la MO en respuesta a EPOrh, a diferencia de lo encontrado en el grupo control; **b)** a las 24 horas de EPOrh se observó una caída del porcentaje de reticulocitos en ERC, inversamente a lo encontrado en el grupo control, **c)** en la MO del grupo control se produce un aumento rápido y transitorio de la expresión de FGF23 secundario al estímulo con EPOrh, el que está asociado a un aumento de la [FGF23]_p, **d)** a las 24 horas de EPOrh, en la MO del grupo ERC hay un aumento del mRNA de FGF23 (único tiempo medido para el transcrito) y existe un aumento de cFGF23 a las 4 y 8 horas de EPOrh, **e)** en ERC hay un aumento de la expresión de mRNA de EPO renal y **f)** en la MO de ratones ERC (nefropatía por oxalato) hay un aumento de la abundancia del mRNA de FGF23, EPOR, FGFR1 y Klotho, además de un aumento de la proteína FGF23 *versus* el grupo control.

En resumen, las principales conclusiones y discusiones son: a) La MO en la ERC presenta un aumento de la expresión de FGF23 (mRNA y proteína), b) existe una resistencia a la acción eritropoyética de EPO en la MO de la ERC, la que dependería de un efecto diferencial de EPO sobre las células de la línea eritroide que proliferan (disminución o ausencia de respuesta al estímulo de EPO por parte de las células que más proliferan (BFU-e/CFU-e) y una respuesta conservada al estímulo de EPO de las células eritroides de la MO que principalmente maduran y no proliferan (proeritroblastos y eritroblastos tempranos) y c) EPO estimula la expresión y secreción de FGF23 en la MO del grupo control y en ERC.

Estos resultados sugieren que la MO es una fuente que contribuye al aumento de los niveles circulantes de FGF23, en respuesta al aumento de los niveles circulantes de EPO y en la ERC. Además, los resultados muestran que frente al estímulo de EPOrh la MO de la ERC por un lado mantiene su capacidad de aumentar la expresión de FGF23, a pesar del importante aumento de la expresión basal de FGF23; pero por otro lado, presenta resistencia a la acción eritropoyética de EPOrh. A continuación discutiremos los potenciales mecanismos que podrían explicar las alteraciones de la MO en ratones ERC, y las potenciales consecuencias que podría tener en la ERC el efecto estimulador de FGF23 de EPOrh.

Aumento de la [FGF23]p en ERC.

En la ERC los niveles de [FGF23]p aumentan de forma precoz pudiendo llegar a ser 1000 veces mayor en los pacientes en hemodiálisis que en personas sanas^{49,50}. En la literatura esta alza de [FGF23]p se relaciona a un aumento de la expresión de FGF23 en osteocitos^{69,70} que requiere la expresión de Klotho óseo⁶¹. Además, hay evidencia de diversos factores causales para explicar el aumento de [FGF23]p en los pacientes ERC, entre éstos: 1) el aumento de la fosfemia: la retención de fosfato debido a la disminución de la excreción de fosfato urinario se acepta como la principal causa del aumento de [FGF23]p en ERC⁶⁷; sin embargo, no está claro cómo la fosfemia regula la expresión de FGF23; 2) la acidosis: hay evidencia de que estimula directamente la expresión de FGF23 en osteoblastos de calvaria de ratón⁷¹; 3) la hipoxia tisular secundaria a la anemia: la hipoxia se ha asociado indirectamente con el aumento de [FGF23]p⁷² y directamente al observarse el aumento de la expresión de mRNA FGF23 en cultivo de células de osteosarcoma de rata (*UMR-106*)⁷³; y por último, 4) la deficiencia de hierro^{74,75,76}.

Propuesta de nuevo factor que explicaría el aumento de [FGF23]p en ERC.

Datos previos de nuestro grupo de laboratorio muestran que *in vitro* las células BFU-e/CFU-e expresan elevados niveles de mRNA de FGF23 que se incrementa rápidamente tras la incubación de estas células con EPOrh. El aumento de la expresión de FGF23 en los cultivos de células de la MO, así como también *in vivo* asociado a los aumentos de EPO circulante, puede ser prevenido por un antagonista farmacológico de EPOR. De tal manera se concluye que EPO, vía EPOR estimula la expresión y secreción de FGF23 desde la MO (ver sección “XI. Datos preliminares” p.52). Consistentemente con estos hallazgos, en este trabajo, vimos que en ERC hay un aumento del mRNA de EPOR en MO y del mRNA de EPO renal asociado a un aumento de [FGF23]p (iFGF23 10 veces mayor en ERC *versus* control) y un aumento de la expresión de FGF23 en MO de ERC de forma basal (mRNA de FGF23 es 5 veces mayor en ERC *versus* control, y la proteína FGF23 6.0 veces mayor en ERC *versus* grupo control) y 24 horas luego del estímulo con EPOrh (mRNA de FGF23 está 3.4 veces elevado en ERC 24 horas *vs.* ERC). De acuerdo a datos de la literatura, esperamos encontrar niveles normales o elevados de EPO circulante en ERC⁶⁶, que estarían activando a EPOR en las células

eritropoyéticas de la MO. En base a estos resultados, proponemos que la MO es una fuente importante que contribuye al aumento de los niveles plasmáticos de FGF23 circulante en la ERC, y que además mantiene su respuesta a EPO circulante.

Nuestros estudios en el tejido renal de los animales ERC mostraron un aumento importante de la abundancia del mRNA EPO endógeno (6.5 veces el nivel control). Aunque en el presente estudio no determinamos la [EPO]p de los ratones ERC, el aumento de los niveles del transcrito renal son muy sugerentes de la existencia de niveles de EPO plasmática aumentados. Los estudios en poblaciones de pacientes ERC han mostrado concentración de EPO plasmática normal o elevada^{25,66}; en contraste, estudios recientes en animales ERC por nefrectomía 5/6 muestran disminución de los niveles de mRNA renal asociados a la disminución de los niveles plasmáticos de EPO⁸⁰. Este último dato sugiere que existe una relación directa entre la abundancia del mRNA y de la proteína EPO circulante, y por otra parte sugiere que diferentes modelos experimentales de ERC pueden alterar en forma diferencial la expresión de EPO a nivel renal y consecuentemente sus niveles plasmáticos. Resulta necesario realizar la determinación de los niveles circulantes de EPO en los animales ERC por oxalato, de modo de evaluar si la EPO endógena es un factor que contribuye a la inducción de la expresión de FGF23 en la MO. También sería interesante estudiar si otros factores, tales como la hiperfosfemia y la hipoxia tisular tienen algún rol contribuyente al aumento de la expresión de FGF23 en MO.

FGF23 en MO de ERC y probable acción inhibitoria de la acción de EPOrh sobre los precursores eritropoyéticos en la MO

Nuestros estudios muestran resistencia a la acción eritropoyética de EPO en la MO de animales ERC: no hubo cambio del hematocrito, de la hemoglobina ni de la abundancia relativa de las poblaciones celulares eritroides de la MO a las 24 horas de EPOrh, a diferencia de los hallazgos en el grupo control. Además, en ERC se encontró una caída del porcentaje de reticulocitos a las 24 horas de EPOrh, inversamente a lo observado en el grupo control. De esta última observación se deduce que la resistencia en la ERC estaría dada por un efecto diferencial de EPO sobre las células de la línea eritroide que más proliferan (respuesta alterada al estímulo de EPO en las células que más proliferan (BFU-e/CFU-e) y una respuesta conservada al estímulo de EPO en las células eritroides de la MO que principalmente maduran

y no proliferan (proeritroblastos y eritroblastos tempranos). O sea, al administrar EPORh se acelera la maduración de los proeritroblastos y eritroblastos tardíos, dando salida rápida de reticulocitos a la sangre; entonces, el porcentaje de reticulocitos en sangre a las 24 horas se encuentra disminuido en ERC porque la eventual alza de este porcentaje fue precoz y no existe estímulo de las células más tempranas que dan “sustrato” a nuevos reticulocitos.

Al momento de comparar el *pool* de progenitores y precursores de la MO de ERC y ratones sanos al tiempo 0h, no encontramos una diferencia en la proporción de los grupos celulares “Otros y BFU-e” y “CFU-e y BFU-e”. Si consideramos que la celularidad de la MO en ERC está disminuida a expensas del componente eritroide^{34,68} y el recuento de los progenitores (BFU-e y CFU-e) en MO de pacientes ERC se encuentran en niveles subnormales^{34,35}, una posibilidad es plantear que el alza del mRNA de FGF23 en la MO es resultado del aumento de abundancia en cada célula productora de FGF23 (células BFU-e y CFUe). Estudios futuros deberán esclarecer si la ERC causa un aumento de la transcripción y/o disminución de la degradación de mRNA de FGF23 en las células eritroides.

A pesar del aumento de EPOR en la MO de los ratones ERC y del aumento del mRNA de EPO renal encontrado, los ratones ERC presentaron anemia. Por otro lado, EPORh indujo aumento de la expresión y secreción de FGF23 en MO de ERC, a pesar del importante aumento basal de FGF23 en la MO de ERC. Creemos que la ausencia al estímulo eritropoyético de EPORh en ERC puede resultar del aumento de la expresión local de FGF23 en la MO el que se encontró basalmente aumentado en ERC en relación al grupo control. Es posible que el aumento de la expresión del mRNA y proteína FGF23 en las células BFU-e y CFUe sea uno de los mecanismos implicados en la resistencia a la acción eritropoyética de EPO. De hecho, el bloqueo farmacológico de los receptores de FGF23 acusa un aumento que corrige la anemia en el modelo ERC por nefrectomía 5/6.⁸⁰ Nuestros estudios mostraron además aumento del mRNA de FGFR1 y del mRNA Klotho en MO, sugiriendo acción autocrina/paracrina de FGF23 en las células eritropoyéticas vía FGFRs. Datos en la literatura muestran que la inyección aguda de FGF23 recombinante en ratones causa disminución del porcentaje de proeritroblastos (células Ter119+*medium* y CD71+*high*)⁶³. Por tanto, sería interesante estudiar si la activación de FGFR1 en las células de la MO bloquea la respuesta a EPO. El FGFR1 es un receptor dependiente del cofactor Klotho. Nuestros datos indican

disminución de la producción renal de Klotho, asociado a una inducción de la expresión de Klotho en la MO. Es posible que el aumento de Klotho sea uno de los mecanismos que amplifique las acciones de FGF23 en la MO; sin embargo, desconocemos si esta proteína es expresada por las células blanco de FGF23 en la MO o si esta proteína es secretada por células de la MO. El estudio de los mecanismos de señalización y las células blanco de FGF23 en la MO y su relación con la inhibición de la acción de EPO es relevante para el entendimiento de la anemia de la ERC. Además, estos hallazgos podrían tener un impacto en el tratamiento de la anemia en la ERCT; por ejemplo, en la identificación de pacientes que serán resistentes a la terapia con EPOrh según los niveles de [FGF23]p antes del tratamiento, de tal manera que sean una población blanco de estudios para mejorar la sensibilidad a la terapia con EPOrh (por ejemplo, aplicándoseles algún mecanismo para disminuir la [FGF23]p como el bloqueo de FGF23 en plasma).

La inyección de EPOrh como inductora de FGF23 en ERC: potencial efecto deletéreo.

FGF23 circulante es un factor patogénico en los pacientes ERC dado que se asocia a mayor mortalidad, hipertrofia miocárdica, calcificación vascular, enfermedad coronaria, aumento de la aldosterona plasmática, entre otros⁵⁰⁻⁶⁰. En este contexto, cualquier inductor de aumentos del FGF23 plasmático debe ser considerado. Los resultados del presente trabajo mostraron que EPOrh induce la expresión y secreción temprana y transitoria de FGF23 en la MO que se asocia a un aumento de FGF23 circulante. Por tanto, probar si la activación de EPOR induce la expresión de FGF23 resulta importante. Además, es necesario estudiar si es que estos hallazgos en animales se reproducen en pacientes ERCT. Entonces, si se encontrase un aumento temprano y transitorio de iFGF23 en el plasma de pacientes ERC luego de la administración de EPOrh, sería necesario estudiar los posibles efectos patogénicos asociados, considerando que la terapia con EPOrh es parte del tratamiento estándar de la anemia en ERCT y que se aplica semanalmente a la mayoría de los pacientes en hemodiálisis.^{37,38}. Estudios actuales de nuestro grupo de laboratorio están orientados a determinar FGF23 en plasma de pacientes ERC en hemodiálisis luego de iniciar por primera vez la terapia con EPOrh a distintos tiempos.

XI. DATOS PRELIMINARES

Resultados preliminares del grupo de nuestro laboratorio (manuscrito aceptado para publicación en *Kidney International*).

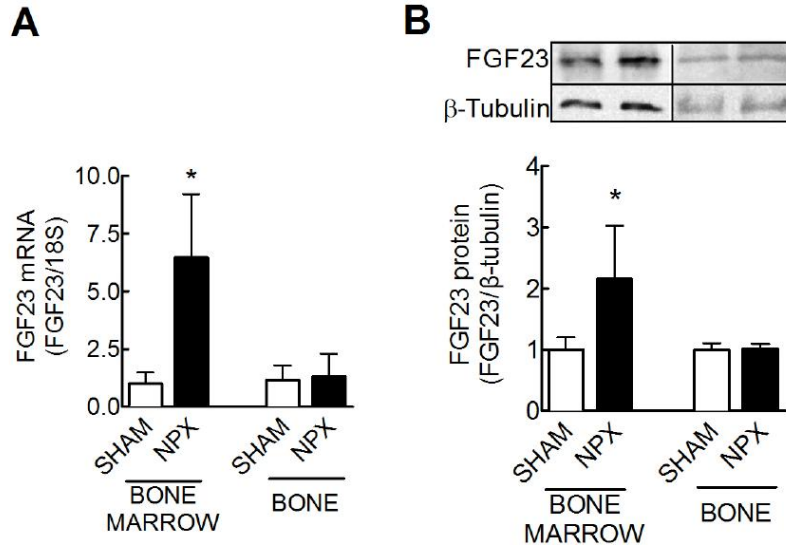


Figura 1: Expresión de FGF23 en tejido óseo. Ratones C57/BL6 fueron sometidos a nefrectomía bilateral o control Sham. Luego de 4 horas se extrajo mRNA(A) y proteínas de hueso y de médula ósea para determinar la expresión de FGF23. La nefrectomía bilateral aumentó la abundancia de mRNA (A) y proteínas (B) de FGF23. La expresión en el hueso no sufrió cambios. (n=4-6;*p<0,05 vs. Sham).

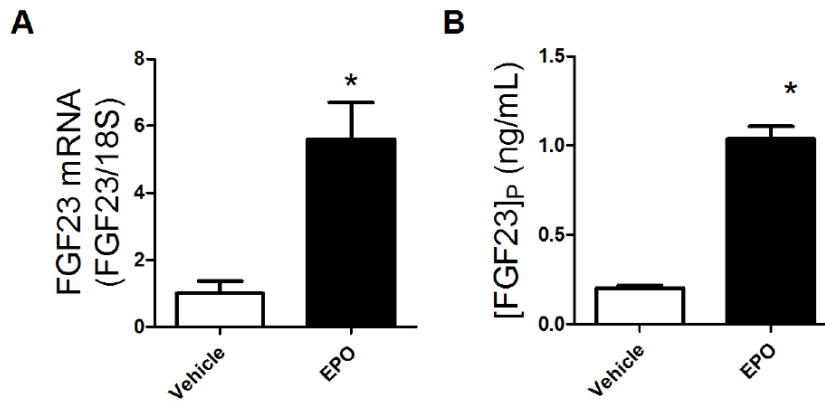


Figura 2: El tratamiento con eritropoyetina aumenta la secreción y expresión de FGF23 en células de médula ósea en ratones sanos. Ratones C57/BL6 sanos recibieron una dosis endovenosa de EPOrh (2UI/g). Luego de 4 horas se extrajo mRNA de médula ósea (A) y plasma (B) para determinar la expresión de FGF23. (n=4-6;*p<0.05 vs vehículo).

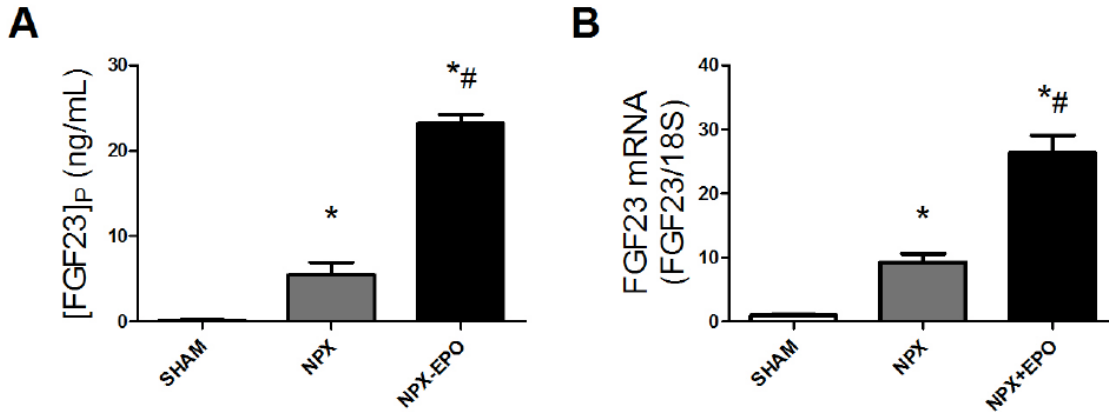


Figura 3: La nefrectomía bilateral y eritropoyetina aumentan la secreción y expresión de FGF23 en células de médula ósea. Ratones C57/BL6 fueron sometidos a nefrectomía bilateral. Las ratas fueron divididas en 2 grupos: con eritropoyetina recombinante (2UI/g) o vehículo. Luego de 4 horas se recolectó plasma (A) y mRNA de médula ósea (B) para determinar expresión de FGF23. Ratas con cirugía ficticia Sham fueron usadas como control. La nefrectomía bilateral aumentó la abundancia del mRNA y la concentración plasmática de FGF23. El tratamiento con EPOrh produjo un mayor aumento del transcrito en la médula ósea y de la concentración plasmática de FGF23 (n= 4-6; *p<0,05 vs. Sham; #p<0,05 vs NPX).

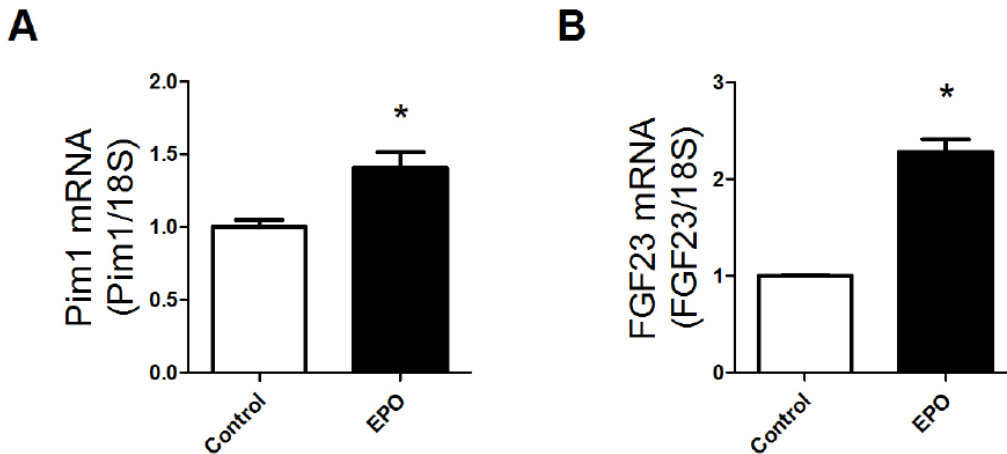


Figura 4: Eritropoyetina recombinante humana aumenta la expresión de FGF23 en células de médula ósea en cultivo. Células de médula ósea de tibia de ratones C57/BL6 sanos fueron sembradas en placas de cultivo (medio RMPI-1640). Se incubaron en presencia de EPOrh (5UI/mL) por 120 minutos después de 30 minutos de estabilización. Finalmente, se extrajo RNA total para determinar la abundancia de los transcritos FGF23 y Pim1 (gen de respuesta temprana a EPO). Como se esperaba, la EPOrh aumentó la expresión del transcrito de Pim1 (A); además, indujo la expresión de FGF23(B). (n= 5; *p<0,05 vs control).

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tanq KL, Tse TF, Wasserman B, Leiserowitz M (2004) The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin.* 20(9):1501-1510.
2. Finkelstein FO, Story K, Firanek C, Mendelssohn D, Barre P, Takano T, Soroka S, Mujais S (2009) Health-related quality of life and hemoglobin levels in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 4(1):33-38.
3. Go AS, Yanq J, Ackerson LM, Lepper K, Robbins S, Massie BM, Shilpak MG (2006) Hemoglobin level, chronic kidney disease, and the risks of death and hospitalization in adults with chronic heart failure: the Anemia in Chronic Heart Failure: Outcomes and Resource Utilization (ANCHOR) Study. *Circulation* 113(23):2713-2723.
4. Kuwahara M, Limori S, Kuyama T, Akita W, Mori Y, Asai T, Tsukamoto Y, Adachi S, Rai T, Uchida S, Sasaki S (2011) Effect of anemia on cardiac disorders in pre-dialysis patients immediately before starting hemodialysis. *Clin Exp Nephrol.* 15:121-125.
5. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M (1996) Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis.* 27(3):347-354.
6. Levin A, Thompson CR, Ethier J, Carlisle EJ, Tobe S, Mendelssohn D, Burgess E, Jindal K, Barrett B, Singer J, Djurdjev O (1999) Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin. *Am J Kidney Dis.* 34(1):125-34.
7. Thorp ML, Johnson ES, Yang X, Petrik AF, Platt R, Smith DH (2009) Effect of anaemia on mortality, cardiovascular hospitalizations and end stage renal disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrology.* 14:240-246.
8. Brain MC (1969) The haemolytic-uremic syndrome. *Semin Hematol.* 6:162.
9. Zanjani ED, Lim Yu M, Perlmutter A, Gordon A (1969) Humoral factors influencing erythropoiesis in the fish (Blue Gourami-*Trichogaster trichopterus*)". *Blood.* 33:573.
10. Kunstmann S. (2015) Manual de Fisiopatología Clínica. Mediterráneo. 194.
11. Berk PD, Blaschke TF, Scharschmidt BF, Waggoner JG, Berlin NI (1976) A new approach to quantitation of the various sources of bilirubin in man. *J Lab Clin Med.* 34:33.
12. Schmidt-Nielsen K, Taylor CR (1968) Red blood cells: why or why not? *Science.* 162:274.
13. Andrew W (1965) Comparative Hematology. Grune & Stratton.
14. Bolliger A (1959) Observations on the blood of a monotreme *Tachyglossus aculeatus*. *Aust J Sci.* 22:257.
15. Jordan HE. (1938) Comparative hematology. In *Handbook of Hematology.* 703.
16. Ioro RJ (1969) Some morphologic and kinetic studies of the developing erythroid cells of the common goldfish. 2:319.
17. Babitt J, Lin H (2012) Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 23(10): 1631-1634.
18. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature.* 179: 633-634.
19. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1988) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 71:524-527.

20. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE (1989) Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood*. 74:645-651.
21. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P (1988) Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest*. 81:620-623.
22. Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU (1993) Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-50-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem*. 41:335-341.
23. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJ, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1993) Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*. 44:1149-1162.
24. Guyton AC, John E (2011) Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica. Elsevier. 32:413-418.
25. Erslev AJ, Besarab A (1995) The rate and control of baseline red cell production in hematologically stable patients with uremia. *J Lab Clin Med*. 126(3):283-286.
26. Erslev AJ, Besarab A. Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal disease (1997). *Kidney Int*. 51:622.
27. Gregory CJ, Eaves AC (1978) Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biological properties. *Blood*. 51:527.
28. Eaves AC, Eaves CJ (1984) Erythropoiesis in culture. *Clin Haematol*. 13:371.
29. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S (1988) Stimulation of B cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. 333:571.
30. Nihof W, Wierenga P, Sahr K, Beru N, Goldwasser E (1987) Induction of globin mRNA transcription by erythropoietin in differentiating erythroid precursor cells. *Exp Hematol*. 15: 779.
31. Donohue DM, Reiff RH, Hanson ML, Betson Y, Finch CA (1977) Quantitation measurement of the erythrocytic and granulocytic cells of marrow and blood. *Blood*. 50: 699.
32. Finch CA, Harker LA, Cook JD (1977) Kinetics of the formed elements of human blood. *Blood*. 50:699.
33. Finch CA, Deubelbeiss K, Cook JD, Eschbach JW, Harker LA, Funk DD, Marsaglia G, Hillman RS, Slichter S, Adamson JW, Ganzoni A, Biblett ER (1970) Ferrokinetics in man. *Medicine (Baltimore)*. 49:17.
34. Sikole A, Stojanovic A, Polenakovic M, Petrusavska G, Sadikario S, Saso R, Jovanovski M (1997) How erythropoietin affects bone marrow of uremic patients. *Am J Nephrol*. 17(2): 128-136.
35. Biljanović-Paunović L, Djukanović L, Stojanović N, Marisavljević D, Pavlović-Kentera V (1998) In vivo effects of recombinant human erythropoietin on bone marrow hematopoiesis in patients with chronic renal failure. *Eur J Med Res*. 3(12):564-70.
36. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease (2013). *Kidney Int Supp*. 3:5-14.
37. DOPPS Annual Report (2012).
38. Sociedad Chilena de Nefrología (2014) XXXIV Cuenta de Hemodiálisis Crónica en Chile.
39. NKF-DOA: Anemia work group: Guidelines (1997) *Am J Kid Dis* 30:8196.

40. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Googkin DA (1998) The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med* 339:584–590.
41. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, Reddan D (2006) Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 355:2085-2098.
42. Phrommintikul A, Haas SJ, Elsik M, Krum H (2007) Mortality and target haemoglobin concentrations in anaemic patients with chronic kidney disease treated with erythropoietin: A meta-analysis. *Lancet* 369:381-388.
43. Goodkin D, Fuller DS, Robinson B, Combe C, Fluck R, Mendelssohn D, Akizawa T, Pisoni R, Port F (2011) Naturally occurring higher hemoglobin concentration does not increase mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 22(2):358-365.
44. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW (2013) Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. *Ann Rev Physiol.* 75:503-533.
45. Gattineni J, Twombly K, Goetz R, Mohammadi M, Baum M (2011) Regulation of serum 1,25(OH)₂ Vitamin D3 levels by fibroblast growth factor 23 is mediated by FGF receptors 3 and 4. *Am J Physiol Renal Physiol.* 301:371-377.
46. Kuro-o M. (2010) Klotho. *Pflugers Arch.* 459(2):333-343.
47. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai Tanne K, Aubin JE, Maeda N (2008) Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res.* 23(6): 939-948.
48. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijma K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2006) Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 444(7120):770-774.
49. Ix JH, Shlipak MG, Wassel CL, Whooley MA (2010) Fibroblast growth factor 23 and early decrements in kidney function: the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant.* 25:993-997.
50. Wolf M (2010) Forging Forward with 10 Burning Questions on FGF23 in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 21:1427-1435.
51. Scialla JJ (2015) Epidemiologic insights on the role of fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 24(3):260-267.
52. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, Li J, Shehadeh LA, Hare JM, David V, Martin A, Fornoni A, Di Marco GS, Kentrup D, Reuter S, Mayer AB, Pavenstädt H, Stypmann J, Kuhn C, Hille S, Frey N, Leifheit-Nestler M, Richter B, Haffner D, Abraham R, Bange J, Sperl B, Ulrich A, Brand M, Wolf M, Faul C (2015) Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab.* 22:1020-1032.
53. Jean G, Bresson E, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C (2009) Peripheral vascular calcification in long-haemodialysis patients: associated factors and survival consequences. *Nephrol Dial Transplant.* 24(3):948-955.
54. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C (2009) High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 24:2792-2796.
55. Liabeuf S, Okazaki H, Desjardins L, Fliser D, Goldsmith D, Covic A, Wiecek A, Ortiz A, Martinez A, Lindholm B, Mallamaci F, Zoccali C, London G, Massy ZA (2014) Vascular

- calcification in chronic kidney disease: are biomarkers useful for probing the pathobiology and the health risks of this process in the clinical scenario?. *Nephrol Dial Transplant*. 29(7): 1275-1284.
56. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Salem MM, Osman NA, El-Sheikh E, Sharaf EI, DIN UA (2010) Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) is independently correlated to aortic calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 25(8):2679-2685.
 57. Tamei N, Ogawa T, Ishida H, Ando Y, Nitta K (2011) Serum fibroblast growth factor-23 levels and progression of aortic arch calcification in non-diabetic patients on chronic hemodialysis. *J Atheroscler Tromb*. 18(3): 217-223.
 58. Ärnlöv J, Carlsson AC, Sundström J, Ingelsson E, Larsson AM, Lind L, Larsson TE (2013) Serum FGF23 and risk of cardiovascular events in relation to mineral metabolism and cardiovascular pathology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 8(5): 781-786.
 59. Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY (2010) Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol*. 160(6):1273-1292.
 60. Zoccali C, Yilmaz MI, Mallamaci F (2013) FGF23: a mature renal and cardiovascular risk factor? *Blood Purif*. 36(1):52-7.
 61. Kaludjerovic J, Komaba H, Sato T, Erben RG, Baron R, Olauson H, Larsson TE, Lanske B (2017) Klotho expression in long bones regulates FGF23 production during renal failure. *FASEB J*.
 62. van Breda F, Emans ME, van der Putten K, Braam B, van Ittersum FJ, Kraaijenhagen RJ, de Borst MH, Vervloet M, Gaillard CA (2015) Relation between red cell distribution width and fibroblast growth factor 23 cleaving in patients with chronic kidney disease and heart failure. *PLoS One*. 10(6): e0128994.
 63. Coe LM, Madathil SV, Casu C, Lanske B, Rivella S, Sitara D (2014) FGF-23 is a negative regulator of prenatal and postnatal erythropoiesis. *J Biol Chem*. 289(14):9795-9810.
 64. Madathil SV, Coe LM, Casu C, Sitara D (2014) Klotho Deficiency Disrupts Hematopoietic Stem Cell Development and Erythropoiesis. *Am J Pathol*. 184:827-841.
 65. Mulay SR, Eberhard JN, Pfann V, Marschner JA, Darisipudi MN, Daniel C, Romoli S, Desai J, Grigorescu M, Kumar SV, Rathkolb B, Wolf E, Hrabe de Angelis M, Bäuerle T, Dietel B, Wagner CA, Amann K, Eckardt KU, Aronson PS, Anders HJ, Knauf F (2016) Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 310:785-795.
 66. Caro J, Brown S, Miller O, Murray T, Erslev AJ (1979) Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J Lab Clin Med*. 93:449-458.
 67. Courbebaisse M, Lanske B (2017) Biology of Fibroblast Growth Factor 23: From Physiology to Pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
 68. Borin-Crivellenti S, Crivellenti LZ, Carvalho MB, Santana AE (2014) Bone marrow cytological evaluation in dogs with chronic kidney disease. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 66:1751-1756.
 69. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K (2009) Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone*. 45:1161-1168.
 70. Shimada T, Urakawa I, Isakova T, Yamazaki Y, Epstein M, Wesseling-Perry K, Wolf M, Salusky IB, Juppner H (2010) Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active. *J Clin Endocrinol Metab*. 95: 578-585.

71. Krieger NS, Culbertson CD, Kyker-Snowman K, Bushinsky DA (2012) Metabolic acidosis increases fibroblast growth factor 23 in neonatal mouse bone. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:431-436.
72. Courbebaisse M, Mehel H, Petit-Hoang C, Ribeil JA, Sabbah L, Tuloup-Minguez V, Bergerat D, Arlet JB, Stanislas A, Souberbielle JC (2017) Carboxy-terminal fragment of fibroblast growth factor 23 induces heart hypertrophy in sickle cell disease. *Haematologica* 102:33-35.
73. Clinkenbeard EL, Farrow EG, Summers LJ, Cass TA, Roberts JL, Bayt CA, Lahm T, Albrecht M, Allen MR, Peacock M (2014) Neonatal iron deficiency causes abnormal phosphate metabolism by elevating FGF23 in normal and ADHR mice. *J Bone Miner Res.* 29:361-369.
74. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC, Allen MR, Robling AG, Stayrook KR, Jideonwo V, Magers MJ (2011) Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 108:1146-1155.
75. Wolf M, Koch TA, Bregman DB (2013) Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res.* 28:1793-1803.
76. Wolf M, White KE (2014) Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: Iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 23:411-419.
77. Toro L, Barrientos V, León P, Rojas M, González M, González-Ibáñez A, Illanes S, Sugikawa K, Abarzúa N, Bascuñán C, Arcos K, Fuentealba C, Tong AM, Elorza AA, Pinto ME, Alzamora R, Romero C, Michea L. (2018) Erythropoietin induces bone marrow and plasma fibroblast growth factor 23 during acute kidney injury. *Kidney Int.* 93(5):1131-1141.
78. Panwar B, Judd SE, Wadley VG, Jenny NS, Howard VJ, Safford MM, Gutiérrez OM (2018) Association of fibroblast growth factor 23 with risk of incident coronary heart disease in community-living adults. *JAMA Cardiol.* 3(4):318-325.
79. Bożentowicz-Wikarek M, Owczarek A, Kocelak P, Olszanecka-Glinianowicz M, Więcek A, Chudek J (2016) C-Terminal to Intact Fibroblast Growth Factor 23 Ratio in Relation to Estimated Glomerular Filtration Rate in Eldery Population. *Kidney Blood Press Res.* 41:519-526.
80. Agoro R, Montagna A, Goets R, Aligbe O, Singh G, Coe LM, Mohammadi M, Rivella S, Sitara, D (2018) Inhibition of fibroblast growth factor 23 (FGF23) signaling rescues renal anemia. *FASEB J.* Marzo.
81. Olauson H, Mencke R, Hillebrands JL, Larsson TE (2017) Tissue expression and source of circulating α Klotho^β. *Bone.* 100:19-35.
82. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Weaving G, Rocks BF, Rajkumar C, Holt SG (2011) Instability of fibroblast growth factor-23 (FGF-23): Implication for clinical studies. *Clin Chim Acta.* 412:1008-1011.