

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Postgrado



PAPEL DE ERITROPOYETINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FGF23 EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.

VICTOR MANUEL BARRIENTOS LABRA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Director de Tesis: Dr. Luis Michea Acevedo
Co-Director: Dr. Rodrigo Alzamora Miranda

2019

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

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

VICTOR MANUEL BARRIENTOS LABRA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 03 de mayo de 2019.

Prof. Dr. Luis Michea

Director de Tesis
Programa de Fisiología y Biofísica,
Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM),
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Prof. Dr. Rodrigo Alzamora

Co-director de Tesis
Programa de Fisiología y Biofísica,
Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM),
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

DR. MARIO CHIONG

DR. RUBEN TORRES

DR. AQUILES JARA

DR. MAURICIO ENRIQUEZ
Presidente Comisión de Examen

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo y su comprensión por todo el tiempo invertido que implicó el desarrollo de esta tesis.

Por otro lado, quiero dar las infinitas gracias a mis tutores de tesis, Dr. Luis Michea y Dr. Rodrigo Alzamora por su apoyo profesional-académico, personal y económico, ellos confiaron en mí y me brindaron su apoyo desde mi ingreso al Programa de Doctorado. Además, muchas gracias al Dr. Luis Toro por su apoyo y consejo.

Agradezco a todas las personas que colaboraron conmigo en el desarrollo de la tesis, en especial a Francisca Ahumada, en su tiempo alumna de magister, con la que trabajamos juntos un gran tiempo y fue una gran compañera de laboratorio. Además, agradezco a Sra. Eliana Pino por su ayuda con el manejo de los animales de experimentación. A Patricio Araos y Jessica Liberona por ayudarme, escucharme y acompañarme dentro y fuera del laboratorio. Y en general a todas las personas del laboratorio del primer piso pabellón B.

Agradecimientos a los proyectos de apoyo para la realización de esta tesis: Proyecto Fondecyt 1171869 y al Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia P-09-016-F (ICM).

A todos aquellos que en algún momento compartí y me ayudaron, son muchas muchas personas y los tengo presentes en mi corazón.

I. ÍNDICE

II. RESUMEN.....	Pág. 4-5
III. ABSTRACT.....	Pág. 5
IV. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 7-10
V. HIPÓTESIS.....	Pág. 11
VI. OBJETIVO GENERAL.....	Pág. 11
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	Pág. 11
VIII. RESULTADOS.....	Pág. 12-42
IX. DISCUSIÓN.....	Pág. 43-53
X. CONCLUSIÓN.....	Pág. 54
XI. METODOLOGÍA.....	Pág. 55-62
XII. REFERENCIAS.....	Pág. 63-70
XIII. ANEXO.....	Pág. 71

II. RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) es la pérdida progresiva de la función renal durante un periodo que va desde meses a años. En estados avanzados, la ERC se presenta con complicaciones como enfermedades cardiovasculares, óseas y anemia. La anemia afecta al 75% de los pacientes con ERC terminal (ERCT) y es un factor de riesgo cardiovascular. Se considera que la disminución de la producción renal de eritropoyetina (EPO) es el principal factor causal, por lo que las guías clínicas actuales recomiendan el tratamiento con EPO recombinante (rEPO) en pacientes con ERCT. EPO regula la eritropoyesis mediante la estimulación de la proliferación y diferenciación de los precursores eritropoyéticos de la médula ósea. La acción de la EPO depende de la unión a su receptor de alta afinidad (EPOR homodimérico) que gatilla la activación de las vías JAK2/STAT5, PI3K/AKT y MAPK/ERK.

El factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) es una hormona peptídica de origen óseo que participa en la regulación del metabolismo mineral. En ERC, los niveles plasmáticos de FGF23 se elevan progresivamente y se ha propuesto que FGF23 es un factor patogénico, que contribuiría al aumento de la mortalidad cardiovascular. Nuestros estudios previos han mostrado que FGF23 es también sintetizado en la médula ósea por precursores eritropoyéticos. La incubación de células de la médula ósea *in vitro* con rEPO causa aumentos rápidos en la expresión y secreción de FGF23, mientras que la inyección de rEPO en ratones sanos aumenta la concentración plasmática de FGF23 ([FGF23]_p). Estos resultados sugieren que rEPO podría contribuir al aumento de FGF23 plasmático en pacientes con ERCT.

La hipótesis de este proyecto plantea: “El tratamiento con rEPO estimula la producción de FGF23 en la médula ósea, aumentando la [FGF23]_P en la ERC”. El objetivo principal de esta tesis es estudiar la acción y los mecanismos de regulación de FGF23 por rEPO en la médula ósea. Para cumplir este objetivo, estudiamos la expresión y secreción de FGF23 en células de la médula ósea incubadas en presencia de rEPO y caracterizamos los mecanismos de transducción. Adicionalmente, realizamos estudios *in vivo*, en ratones con función renal normal y con ERC experimental, para analizar los efectos agudos y crónicos de la administración de rEPO sobre la expresión y secreción de FGF23 desde la médula ósea y la [FGF23]_P.

Los resultados de esta tesis aportan nuevo conocimiento sobre la acción y los mecanismos de regulación de la expresión y secreción de FGF23 por rEPO, tanto en condiciones normales como patológicas. Postulamos que deberían conducir a la re-evaluación del efecto de este tratamiento en pacientes con ERCT y probablemente a la revisión de sus indicaciones.

III. ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is the progressive loss of renal function, with high cardiovascular mortality. Anemia is related to 75% of patients with end stage renal disease (ESRD) and is a cardiovascular risk factor. It is considered that the reduction of the renal production of erythropoietin (EPO) is the main causal factor, so the questions refer to the treatment with recombinant EPO (rEPO). EPO, stimulates erythropoiesis, the proliferation and differentiation of erythropoietic precursors of the bone marrow through binding to its high affinity receptor (homodimeric EPOR) and then activation of the JAK2/STAT5, PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways.

The plasma levels of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23), a peptide hormone of bone origin, rise progressively with the development of CKD. It has been proposed that FGF23 contributes as a pathogenic factor, increase cardiovascular mortality. Our previous studies show that FGF23 is synthesized in the bone marrow by erythropoietic precursors. Incubation of bone marrow cells *in vitro* with rEPO causes fast increases in the expression and secretion of FGF23, and injection of rEPO in mice increases the plasma concentration of FGF23 ([FGF23]_p). These results suggest that rEPO could contribute with plasma FGF23 in CKD.

The hypothesis of this project propose: "Treatment with rEPO stimulates the production of FGF23 in the bone marrow, increases [FGF23]_p in CKD." The objective of this thesis is to study the action and mechanisms of regulation of FGF23 in the bone marrow by rEPO. We studied the expression and secretion of FGF23 in bone marrow cells incubated in the presence of rEPO and characterized the mechanisms of transduction. In addition, we conducted *in vivo* studies, in mice with normal renal function and experimental CKD, to analyze the acute and chronic effects of rEPO administration on the expression and secretion of FGF23 from the bone marrow and [FGF23]_p.

The results of this thesis provide new knowledge about the action and mechanisms of regulation and secretion of FGF23 by rEPO, both in normal and pathological conditions. We postulate that they should lead to the re-evaluation of the effect of this treatment in patients with ESRD and probably to the revision of its indications.

IV. INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) es la pérdida progresiva de la función renal. Tiene una prevalencia cercana al 10% de la población mundial y está en aumento debido al envejecimiento poblacional y a la prevalencia de factores de riesgo¹⁻³. La ERC tiene alta mortalidad, principalmente por la enfermedad cardiovascular, que en los pacientes en hemodiálisis es 40 veces más prevalente que en la población general⁴⁻⁵. La coexistencia de enfermedad coronaria, hipertrofia ventricular izquierda y la calcificación vascular son los factores determinantes de la alta mortalidad de los pacientes ERC terminal (ERCT). Estas patologías se desarrollan a velocidades crecientes a medida que declina la función renal. Más del 40% de los pacientes en diálisis muestran alteraciones moderadas o severas en la perfusión cardíaca⁶, e hipertrofia ventricular izquierda se observa en el 95% de los enfermos con ERCT⁷. En pacientes con ERC en etapa 4 se observa un aumento de 6 veces en el *score* de calcificación a los 24 meses de seguimiento⁴⁸.

Potencial efecto promotor de daño cardiovascular por rEPO en la ERC

La anemia afecta al 75% de los pacientes con ERCT³⁶. Los pacientes ERC presentan niveles plasmáticos de EPO similares a los observados en pacientes sin anemia, de esta forma los niveles de producción de EPO son insuficientes en el contexto de la anemia observada en la ERC¹⁹. EPO es una hormona peptídica sintetizada por las células intersticiales de la corteza renal en respuesta a caídas de la presión de oxígeno tales como las observadas en la hipoxia y la anemia. Los niveles plasmáticos de EPO regulan la eritropoyesis y con ello el hematocrito, al estimular la proliferación y diferenciación de los precursores eritropoyéticos de la médula ósea. En particular, EPO estimula las células BFU-e (*Burst Forming Unit-erythroid*) y CFU-e (*Colony Forming Unit-erythroid*), a través de la unión a su receptor de alta afinidad (EPOR-EPOR), miembro de la familia de receptores de citoquinas tipo I, activando la vía de señalización JAK2/STAT5. Además, se suma la activación de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, promoviendo la expresión de genes de proliferación, anti-apoptóticos y de diferenciación, como Pim1.^{45,47} Adicionalmente, se ha descrito otro receptor de EPO,

el receptor heterodimérico EPOR-CD131, siendo este receptor de baja afinidad y presente en tejidos no eritropoyéticos⁸⁰.

rEPO, se utiliza para el tratamiento de la anemia en los pacientes con ERC y ERCT como un factor estimulante de la eritropoyesis. Sin embargo, los resultados de diversos estudios clínicos aleatorizados y controlados, han demostrado que la normalización de los niveles de hemoglobina con rEPO, en pacientes con ERC en prediálisis y en diálisis, se asocia a un aumento de la mortalidad.³⁷⁻³⁹ Este efecto no es debido al aumento del nivel de hemoglobina (corrección de la anemia) *per se*, sino que se asocia con las mayores dosis de rEPO y/o a la resistencia a la acción de rEPO.⁴⁰⁻⁴⁴ El(los) mecanismo(s) que explica(n) estos efectos adversos es(son) desconocido(s).

FGF23 y ERC

El(los) mecanismo(s) que lleva(n) al desarrollo de la enfermedad coronaria, hipertrofia cardíaca y calcificación vascular en los pacientes ERCT incluyen: hipertensión arterial, trastornos metabólicos y factores de riesgo cardiovascular tradicionales⁷. Sin embargo, nueva evidencia en la literatura sugiere que los niveles plasmáticos del Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23), hormona que se eleva progresivamente con el desarrollo de la ERC y en forma directamente proporcional a la severidad del daño renal, podría ser otro factor causal del desarrollo de enfermedad cardiovascular en la ERC.

Factor de Crecimiento Fibroblástico 23: Mecanismos de acción

FGF23 es una hormona peptídica sintetizada en el hueso, en los osteocitos y osteoblastos⁸. La proteína FGF23 es sintetizada como un péptido de 251 aminoácidos, que intracelularmente es sujeto al corte del péptido señal de 24 aminoácidos, produciendo un péptido de FGF23 con 227 aminoácidos que luego es secretado⁵¹. Por otro lado, una parte de la proteína FGF23 es sustrato de clivaje proteolítico entre Arg¹⁷⁹ y Ser¹⁸⁰, produciendo los fragmentos N-terminal y C-terminal⁵². Es considerado que sólo la proteína completa, con 227 aminoácidos, es biológicamente activa. Por esto, se sugiere que la actividad de FGF23 es regulada no sólo por su producción, si no que también por modificaciones post-traduccionales. Entre ellas existe O-glicosilación en

Thr¹⁷⁸ por N-acetilgalactosamina, producida por la enzima *polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3* codificada por el gen *GalNT3*, esta modificación inhibe el corte proteolítico y, por lo tanto, incrementa la abundancia de proteína biológicamente activa, FGF23 intacto⁵³. Otro mecanismo de regulación está dado por la fosforilación en la Ser180 mediado por la quinasa *family with sequence similarity 20, member C* (Fam20C) la cual inhibe la O-glicosilación por GalNT3 y mejora el procesamiento de la proteína FGF23, produciendo los fragmentos de FGF23 N- y C-terminal⁵⁴.

El principal tejido diana de FGF23 es el riñón, tejido en el cual inhibe la reabsorción de fosfato en el túbulo proximal⁹ y la síntesis de vitamina D activa (1,25-dihidroxi vitamina D). FGF23 actúa a través de una familia de receptores en la membrana plasmática llamados receptores de factores de crecimiento fibroblástico (FGFR) de los cuales se han caracterizado cuatro isoformas. Las principales isoformas que median la acción de FGF23 son los receptores FGFR1 y FGFR3. Estos dos receptores requieren de la presencia del cofactor proteico Klotho, que se sintetiza en el túbulo distal del riñón y que es secretado al plasma. La asociación física de FGF23 a Klotho aumenta la afinidad del heterodímero FGF23-Klotho por sus receptores en 2-3 órdenes de magnitud.^{10,11} Los niveles plasmáticos de Klotho se correlacionan directamente con la velocidad de filtración glomerular, encontrándose disminuido en ERC.¹² Esto sugiere que en la ERC existiría una activación de FGFR1 y FGFR3 independiente de Klotho, cuando las concentraciones plasmáticas de FGF23 se encuentran aumentadas, este mecanismo podría incluir también la activación de receptores de baja afinidad como el FGFR4.

FGF23 en ERC

El aumento de las concentraciones plasmáticas de FGF23 es un factor de riesgo para eventos cardiovasculares en la población general¹³⁻¹⁸, y en los pacientes con ERC.¹⁹⁻²¹ En pacientes con ERC, el alza de [FGF23]_P es un predictor del desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, eventos cardiovasculares y mortalidad cardiovascular.²³⁻²⁵ Estudios en animales han demostrado que FGF23 causaría hipertrofia cardíaca por aumento del tamaño de los cardiomiocitos; en pacientes, el

aumento de la concentración plasmática de FGF23 está asociada con el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda²⁷. La elevación de la [FGF23]_p tendría una acción directa sobre los cardiomiocitos y/o el tejido vascular,²⁶ promoviendo directamente la hipertrofia de cardiomiocitos.²⁷ Más aún, el bloqueo farmacológico de los FGFRs previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca en roedores con ERC²⁸⁻²⁹. En esta línea, se ha propuesto que el déficit de Klotho en la ERC implica que FGF23 deja progresivamente de ser un agonista efectivo de sus receptores fisiológicos, y a medida que su concentración plasmática aumenta comienza a estimular receptores que normalmente no son blancos de esta hormona tal como el FGFR4 (efectos Klotho-independientes)³⁰. Se ha mostrado que la activación de este receptor en cardiomiocitos por FGF23 sería uno de los factores que contribuiría al desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda observada en la ERC.

EPO y FGF23 en ERC

Las causas que llevan al aumento exacerbado de la [FGF23]_p en ERC son desconocidas. Estudios en animales y en pacientes privados de hierro en la dieta, han demostrado que la anemia se asocia a aumentos de la [FGF23]_p.³²⁻³⁴ La asociación entre anemia y aumento de los niveles plasmáticos de FGF23 se ha corroborado en pacientes ERC con insuficiencia cardíaca, en forma independiente del balance de hierro.³⁵ Estos datos sugirieron que FGF23 podría actuar como inhibidor de la eritropoyesis, hipótesis apoyada por la observación de que FGF23 inhibe la acción proliferativa de EPO sobre las células precursoras eritropoyéticas *in vivo*⁴⁶.

Nuestro grupo ha aportado resultados que muestran que EPO es un factor inductor del aumento de los niveles de FGF23 plasmático. El tratamiento con rEPO causa aumentos de la expresión y la liberación rápida de FGF23 desde la médula ósea⁷⁵. Además, la incubación de células de la médula ósea *in vitro* con rEPO causa aumentos rápidos en la expresión de FGF23, los cuales preceden el alza de la expresión de *Pim1*, un gen de respuesta temprana a EPO mediante activación de su receptor clásico⁷⁵. Todos estos datos muestran que EPO es un estimulador de la expresión y secreción de FGF23, e implicarían un mecanismo de retroalimentación negativa entre EPO y FGF23.

La presente tesis determinó los mecanismos celulares mediante los cuales eritropoyetina recombinante induce la expresión y secreción de FGF23 en la médula ósea. Además, comparamos las acciones de rEPO sobre la expresión y secreción de FGF23 desde la médula ósea en animales con función renal normal con los efectos de rEPO en animales con ERC experimental.

V. HIPÓTESIS

La hipótesis de este proyecto plantea: “Eritropoyetina recombinante estimula la producción de FGF23 en la médula ósea, aumentando la concentración plasmática de FGF23 en la enfermedad renal crónica experimental”.

VI. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las acciones moduladoras de rEPO sobre la expresión de FGF23 en células de la médula ósea.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el efecto de rEPO sobre la expresión de FGF23 en células de la médula ósea.
- 2.- Determinar la(s) vía(s) de señalización por el cual rEPO induce la expresión de FGF23 en células de médula ósea.
- 3.- Comparar el efecto del tratamiento agudo con rEPO sobre la $[FGF23]_P$ en ratones sanos *versus* ratones con enfermedad renal crónica (ERC).
- 4.- Determinar el efecto del tratamiento crónico con rEPO en ratones sanos y ERC sobre los parámetros hematológicos y su relación con FGF23.

VIII. RESULTADOS

1.- Caracterizar el efecto de rEPO sobre la expresión de FGF23 en células de la médula ósea.

Para determinar la dosis dependencia de rEPO sobre la expresión de FGF23, explantes de médula ósea de ratones C57BL/6, se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de rEPO por 2 horas. El análisis de expresión del mRNA de FGF23 mostró un alza máxima sobre 2 veces respecto al vehículo. Utilizando los datos de cambio en la abundancia del mRNA de FGF23 respecto a la concentración de rEPO, calculamos un valor de concentración eficaz media (EC_{50}) igual a 0,9 UI/mL ($n=3$; $P<0,05$) (Figura 1). Este valor concuerda con otros valores reportados en líneas celulares hematopoyéticas (0,82 UI/mL).⁵⁰ La respuesta máxima a rEPO se alcanzó a una concentración de rEPO de 25 UI/mL (C_{max}).

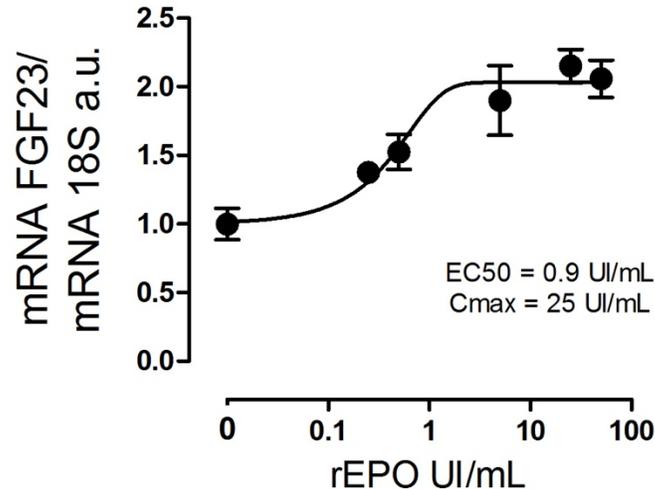


Figura 1: Eritropoyetina recombinante (rEPO) aumenta la expresión de FGF23 en explantes de médula ósea. Células de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron extraídas y mantenidas en medio de cultivo (RMPI-1640, 0,2% BSA). Los explantes fueron incubados en presencia de rEPO (Recormon™, Roche, Basel, Suiza) en pocillos individuales (concentraciones crecientes) por 120 minutos. Se determinó la abundancia del mRNA de FGF23 ($n=3$) mediante qRT-PCR en tiempo real.

Determinada la concentración óptima a utilizar, se determinó el efecto rEPO sobre la expresión y secreción de FGF23 y la dependencia de la activación del receptor de eritropoyetina. Para ello, explantes de médula ósea fueron incubados en presencia de rEPO (5 UI/mL) por 2 horas y se determinó la abundancia del mRNA de FGF23. Los niveles de proteína FGF23 secretados al medio de cultivo a las 4 horas fue determinado mediante un kit de ELISA comercial. La activación del receptor de eritropoyetina se evaluó analizando la expresión de un gen de respuesta temprana a eritropoyetina *Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1* (Pim1) previamente descrito como un gen que se expresa rápidamente en respuesta a la activación del receptor de EPO. rEPO indujo la expresión de FGF23 aumentando la abundancia 2,3 veces respecto al vehículo (Figura 2A). En condiciones control se determinó la presencia de la proteína de FGF23 en el medio de cultivo, los explantes estimulados con rEPO presentaron un aumento de la proteína de FGF23 ($38,2 \pm 9,9$ vs. $19,3 \pm 1,4$ pg/mL, n=4) (Figura 2B). Finalmente, el transcrito de Pim1 fue inducido en respuesta a rEPO indicando activación del receptor de eritropoyetina (Figura 2C).

Estos resultados muestran que rEPO estimula la expresión de FGF23 de manera dosis dependiente. Junto con el aumento del transcrito, rEPO estimula la secreción de FGF23, por medio de la activación de receptores de EPO.

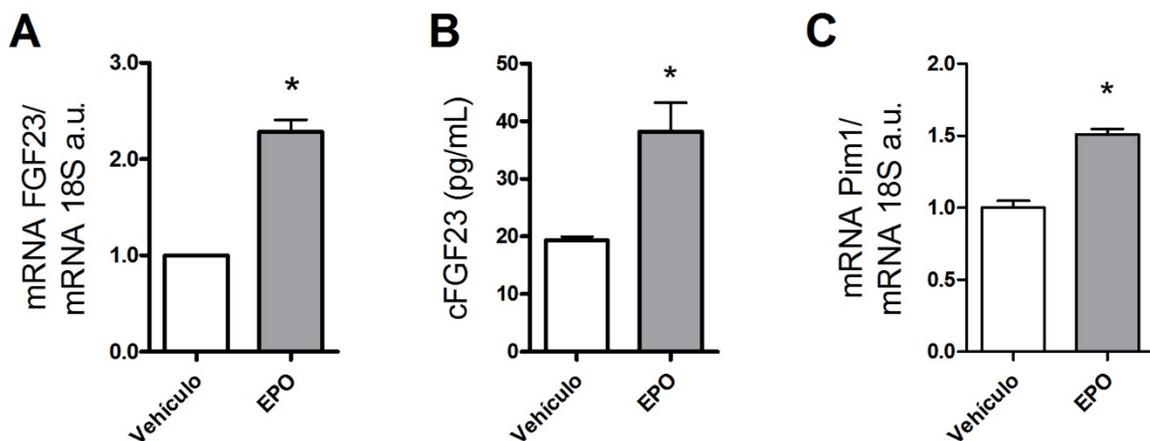


Figura 2: rEPO aumenta la expresión y secreción de FGF23 en explantes de médula ósea. Células de médula ósea fueron estimuladas con rEPO (5 IU/mL) por 120 minutos. Se determinó la abundancia del mRNA de FGF23 y Pim1 (n=4, *P<0,05) mediante qRT-

PCR en tiempo real y la abundancia de la proteína FGF23 en el medio de cultivo por ELISA (n=4, * $P < 0,05$). (A) Abundancia del mRNA de FGF23. (B) Abundancia de la proteína de FGF23 en el medio de cultivo. (C) Abundancia del mRNA de Pim1.

2.- Determinar la(s) vía(s) de señalización por la(s) cuál(es) rEPO induce la expresión de FGF23 en células de médula ósea.

Se han descrito dos tipos de receptores de EPO, la forma homodimérica clásica de alta afinidad (EPOR-EPOR) y una forma heterodimérica (EPOR-CD131) de baja afinidad. Las células hematopoyéticas expresan principalmente EPOR homodimérico.

Para estudiar si el receptor homodimérico media el efecto inductor de rEPO sobre la expresión de FGF23, los explantes de médula ósea de ratón fueron incubados en presencia de rEPO y el bloqueador farmacológico de EPOR-EPOR, EMP9 (500 nM). Adicionalmente, para evaluar si la activación del receptor heterodimérico modificaba la abundancia del mRNA de FGF23, los explantes fueron incubados en presencia del agonista específico del EPOR-CD131, ARA290 (500 nM). Se observó que el bloqueo del receptor homodimérico previno completamente la inducción de la expresión de FGF23 inducida por rEPO. Por el contrario, el agonista ARA290 no produjo cambios significativos sobre la abundancia del mRNA FGF23 en los explantes de médula ósea (Figura 3A). Adicionalmente, se determinó si la secreción de FGF23 depende de la activación del receptor homodimérico, para esto se incubaron explantes de médula ósea en presencia de rEPO y el antagonista homodimérico EMP9 por 4 horas. Consistente con el aumento de expresión del mensajero de FGF23, rEPO indujo la secreción de FGF23 y el antagonismo del receptor homodimérico bloqueó completamente la secreción de FGF23. Para corroborar que en las condiciones experimentales utilizadas se producía activación del receptor de eritropoyetina se determinó la abundancia de Pim1. Pim1 aumentó su abundancia en respuesta a rEPO y el efecto de rEPO fue bloqueado por la presencia de EMP9 en el medio de cultivo. En contraste, ARA290 no modificó la abundancia de Pim1 en células de la médula ósea (Figura 1C).

Estos resultados son consistentes con la hipótesis que la activación del receptor homodimérico media el efecto inductor de rEPO sobre la expresión de FGF23 en células de la médula ósea.

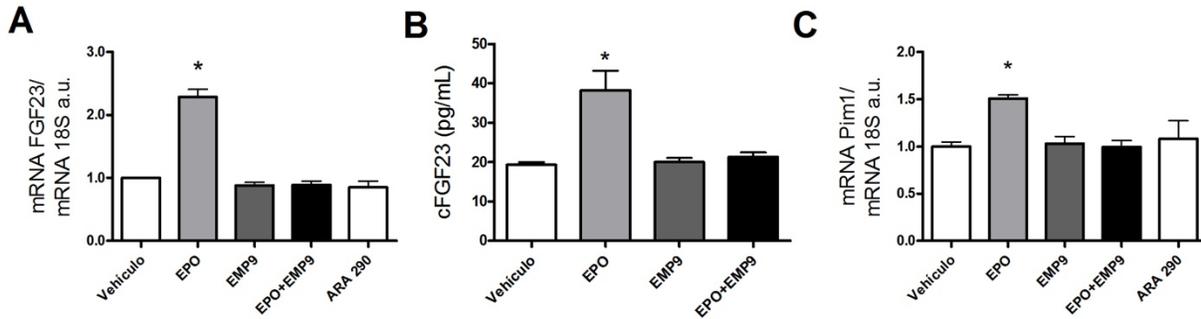


Figura 3: Eritropoyetina recombinante (rEPO) aumenta la expresión de FGF23 en explantes de médula ósea vía la activación de EPOR-EPOR. Células de médula ósea fueron estimuladas con rEPO (5 IU/mL) en presencia o ausencia de EMP9 o con ARA290 (500nM) y se determinó la abundancia de mRNA y proteína de FGF23 y el mRNA de Pim1 (n=4; *P<0,05 vs. vehículo). (A) Abundancia del mRNA de FGF23. (B) Abundancia de la proteína FGF23 en el medio de cultivo. (C) Determinación de la abundancia de mRNA de Pim1.

La unión de EPO a su receptor homodimérico produce dimerización de éste y su activación. Una vez activado el receptor, se activan 3 vías intracelulares que están encargadas de distintas funciones en las células eritropoyéticas, éstas son: STAT5, MAPK (ERK1/2) y AKT, por lo que es probable que la activación de algunas de ellas induzca la expresión de FGF23 en respuesta a rEPO.

Analizamos si en nuestras condiciones experimentales rEPO era un estímulo eficaz para activar las vías principales de señalización intracelular en las células eritropoyéticas: STAT5, ERK1/2 y AKT. Para ello extrajimos explantes de médula ósea de ratones sanos y los incubamos en presencia de rEPO por 15 minutos para luego extraer proteínas y analizar la activación de las distintas vías de señalización mediante el aumento o no de la forma fosforilada de cada una de las vías *versus* proteínas totales.

Nuestros resultados mostraron que la vía STAT5 fue inducida en presencia de rEPO, aumentando a los 15 minutos 2,8 veces por sobre las células sin tratamiento (Figura 4A). Por otro lado, la vía ERK1/2 no mostró activación significativa (Figura 4B). Analizamos expresión de AKT en nuestras preparaciones de células de la médula ósea, pero fue imposible detectar expresión de la forma fosforilada y de la total, a pesar que el anticuerpo usado detecto AKT en otros tejidos de ratón.

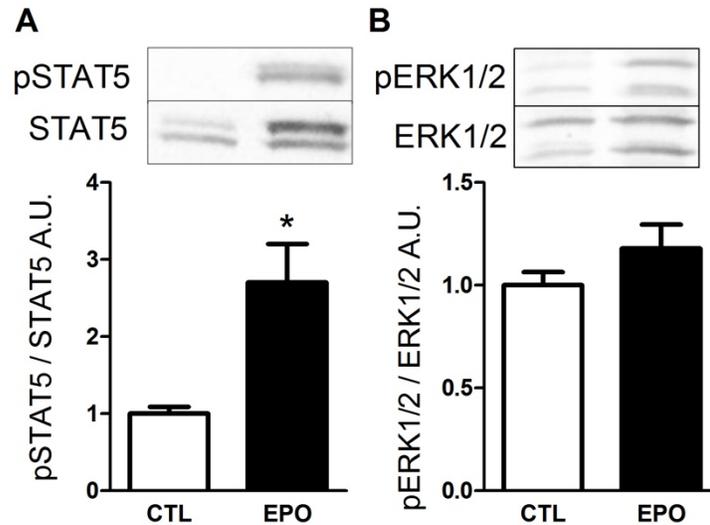


Figura 4: rEPO estimula la fosforilación de STAT5, pero no la fosforilación de ERK1/2 en explantes de médula ósea en cultivo. Los explantes de médula ósea se estimularon con rEPO (5 UI/mL) durante 15 minutos y se analizó la fosforilación de STAT5 (pSTAT) y STAT total y la fosforilación de ERK1/2 (pERK1/2) y ERK1/2 total. (A) Activación de la vía STAT5. (B) Activación de la vía ERK1/2. n=4-5, *P<0,05.

Para estudiar cuál vía intracelular regula la expresión de FGF23 en la médula ósea se incubaron explantes de médula ósea de ratones sanos en presencia de rEPO y un inhibidor farmacológico específico para cada una de las vías descritas que se activan luego de la activación del receptor de EPO. Sólo el inhibidor de STAT5 bloqueó completamente la expresión del mRNA de FGF23 inducida por rEPO (Figura 5A). La inhibición farmacológica de las vías ERK1/2 (PD0325901) no bloqueó la expresión de FGF23 *in vitro* (Figura 5B), lo que concuerda con que por lo menos la vía ERK1/2 no es activada en nuestras condiciones. Por otro lado, el bloqueo de la vía AKT (afuresertib) tampoco inhibió el efecto de rEPO sobre la expresión de FGF23 (Figura 5C).

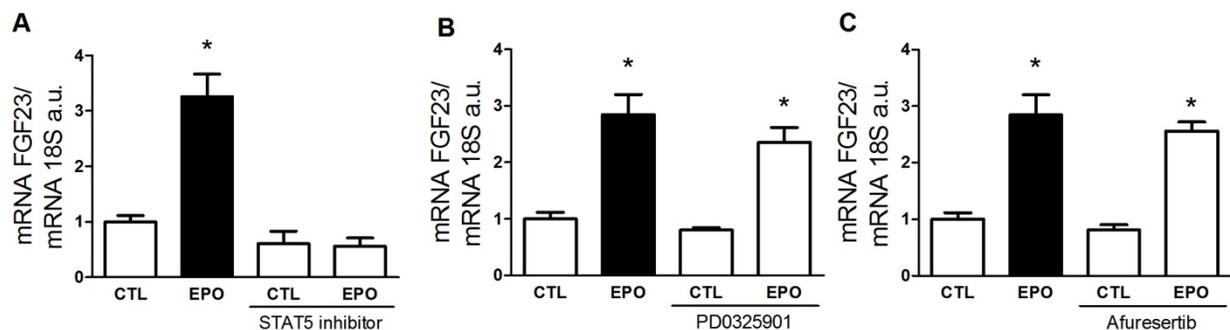


Figura 5: Eritropoyetina recombinante (rEPO) aumenta la expresión de FGF23 vía STAT5 en explantes de médula ósea. Células de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron extraídas y mantenidas en medio de cultivo (RMPI-1640, 0,2% BSA). Se incubaron en presencia de rEPO (Recormon™, Roche, Basel, Suiza) por 2 horas en presencia o ausencia de un inhibidor específico para cada una de las vías activadas por EPO y se determinó la abundancia del mRNA de FGF23 (n=4) mediante qRT-PCR en tiempo real. (A) Células de médula ósea fueron estimuladas con rEPO (5 IU/mL) y STAT5 inhibitor 573108 (200 μ M, EMD Chemicals, Inc., San Diego CA, USA) y se determinó la abundancia de mRNA FGF23 (n=4; $P<0,05$). (B) Células de médula ósea fueron estimuladas con rEPO (5 IU/mL) y PD0325901 (100 nM) se determinó la abundancia de mRNA FGF23 (n=4; $P<0,05$). (C) Células de médula ósea fueron estimuladas con rEPO (5 IU/mL) y Afuresertib (10 μ M) se determinó la abundancia de mRNA FGF23 (n=4; $*P<0,05$).

Como control se analizó si el inhibidor de STAT5 bloqueó efectivamente la activación de STAT5, para ello incubamos explantes de médula ósea en presencia de rEPO con y sin inhibidor y analizamos la activación de la vía STAT5 por medio de la abundancia de la forma fosforilada de este factor de transcripción. Nuestros resultados mostraron que la presencia del inhibidor bloqueó completamente la activación de STAT5 (Figura 6). Por lo que, en nuestros experimentos este inhibidor fue efectivo en bloquear la activación de STAT5.

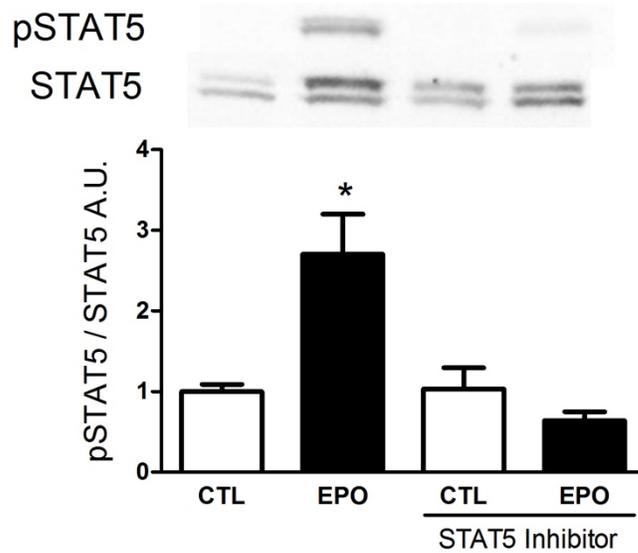


Figura 6: El inhibidor de STAT5 bloquea la fosforilación de STAT5 en explantes de médula ósea. (A) La médula ósea se estimuló con rEPO (5 UI/mL) y con el inhibidor de STAT5, luego se midió la abundancia de STAT5 fosforilado (pSTAT5) y STAT5 total (n=4-5, * $P < 0,05$). Panel superior, *Western blot* representativo.

A partir de estos resultados se puede concluir que rEPO estimula la expresión de FGF23 vía la activación de EPOR-EPOR y la activación río abajo del factor de transcripción STAT5. En nuestras condiciones experimentales, las otras vías de señalización no estarían involucradas en la regulación de la expresión de FGF23 en las células de la médula ósea (Figura 7).

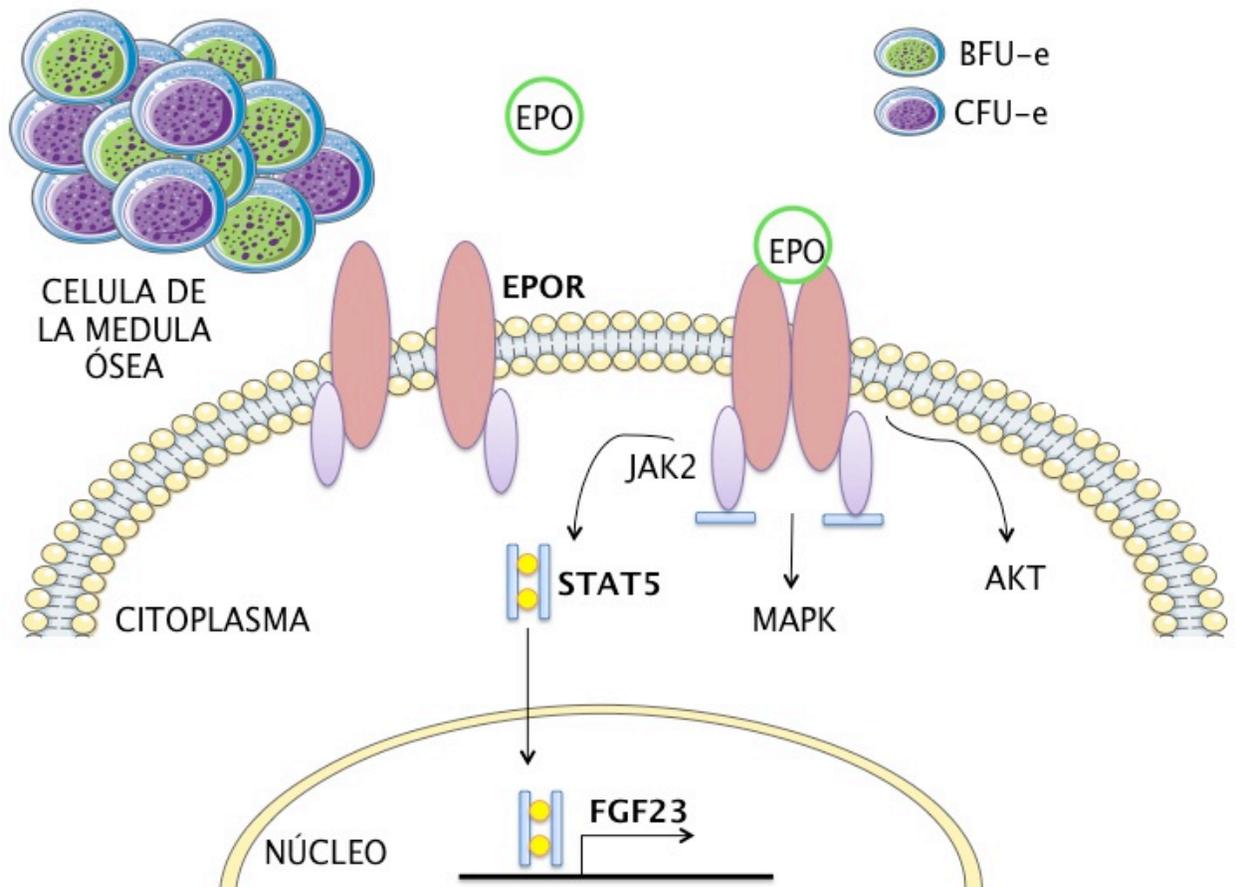


Figura 7: Esquema de la expresión de FGF23 en las células de la médula ósea. Las células de la médula ósea que expresan el receptor de EPO son las BFU-e y CFU-e, una vez que reciben el estímulo con EPO el receptor forma un dímero homodimérico, esto produce activación de tres vías intracelulares: AKT, MAPK y STAT5. La activación del factor de transcripción STAT5 induce la expresión del transcrito de FGF23.

3.- Comparar efecto el agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea de ratones sanos *versus* ratones con enfermedad renal crónica (ERC).

Previamente, implementamos el modelo de nefropatía crónica por acumulación de cristales de oxalato. De acuerdo a los datos de la literatura (Mulay *et al.*, 2016), este modelo produce un rápido y reproducible deterioro de la función renal, con aumentos significativos de la concentración plasmática de FGF23, hiperfosfemia y anemia. Se realizó el protocolo de ERC inducida por oxalato en donde ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta sin calcio y con oxalato (50 $\mu\text{mol/g}$ de alimento) por 14 días, luego de mantuvieron 7 días con dieta normal antes de iniciar cualquier tratamiento. A los animales se les monitorearon los cambios del hematocrito y el nitrógeno ureico (BUN) semanalmente. Los animales que recibieron dieta alta en oxalato progresivamente disminuyeron su hematocrito (Figura 8A) y aumentaron el nitrógeno ureico plasmático (Figura 8B), finalizada la dieta con oxalato los animales mantuvieron el BUN elevado.

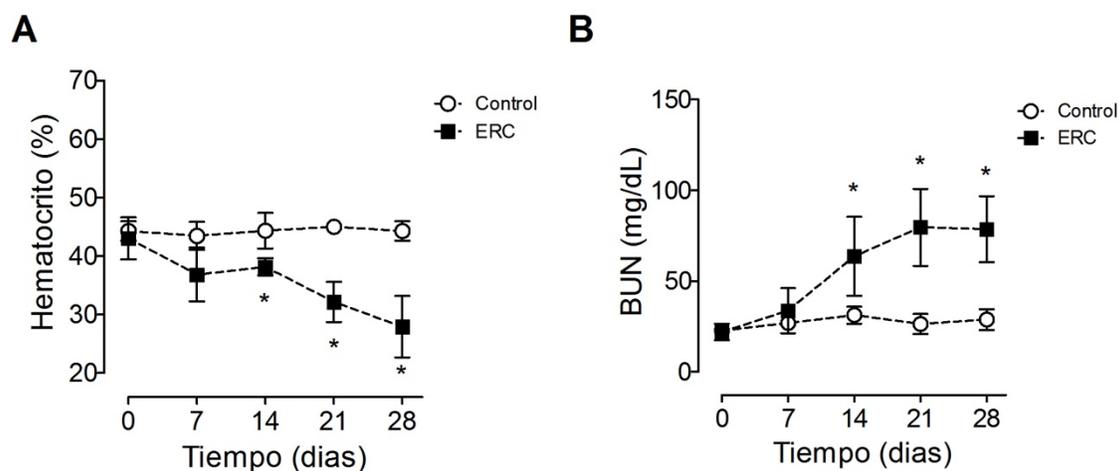


Figura 8. Desarrollo de enfermedad renal crónica inducida por dieta alta en oxalato. Ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta con alto oxalato (50 $\mu\text{mol/g}$) por 14 días y luego fueron mantenidos 7 días con dieta estandar. Se monitorizó el hematocrito (A) y el nitrógeno ureico (BUN) (B) cada semana. $n=5-6$, $*P<0,05$ vs. control.

La enfermedad renal crónica se caracteriza por presentar anemia normocítica y normocrómica, para evaluar si nuestros animales replicaban lo observado en pacientes

con ERC se caracterizaron los parámetros hematológicos. Los animales que recibieron dieta alta en oxalato presentaron un hematocrito (Figura 9A) y una hemoglobina plasmática disminuida (Figura 9B) (30% y 9,8 g/dL, respectivamente) respecto a los animales sanos. Para evaluar la función medular se analizó el porcentaje de reticulocitos y el índice de producción reticulocitaria (IPR). Los animales con ERC presentaron un porcentaje de reticulocitos elevado respecto al control, alrededor del 3% (Figura 9C), sin embargo, el IPR, no presentó diferencias respecto a los animales control (Figura 9F), indicando que existe una escasa función médular para el grado de anemia presente en la ERC.

Adicionalmente, se determinó el número total de eritrocitos y reticulocitos en sangre. El número de eritrocitos se encontró disminuido (Figura 9E) mientras que los reticulocitos no presentaron diferencias significativas respecto al grupo control sano. Estos datos sugieren que en los animales ERC los eritrocitos presentarían una vida media menor y la tasa de recambio estaría disminuida para el contexto de anemia. Finalmente, se caracterizó la diferenciación y funcionalidad de los eritrocitos mediante los parámetros: volumen corpuscular medio (V.C.M.) y hemoglobina corpuscular media (H.C.M.), que son indicativos del tamaño y la cantidad hemoglobina presente en cada eritrocito capaz de transportar oxígeno. El V.C.M. presentó parámetros dentro de los rangos normales y sin diferencias respecto a los animales control (Figura 9G), indicando una anemia normocítica. La H.C.M. en los animales ERC se encontró en los rangos normales, pero significativamente disminuida respecto a los animales sanos (Figura 9H), indicando en una anemia normocrómica.

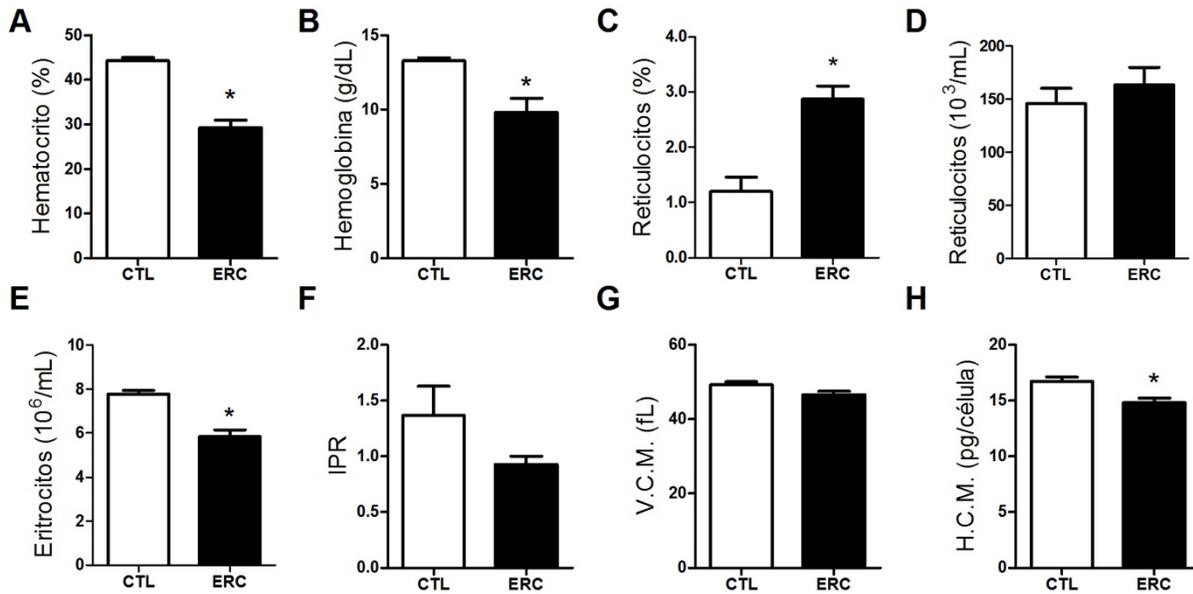
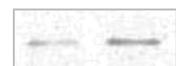


Figura 9: Efecto de la ERC sobre los parámetros hematológicos. Ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta con alto oxalato por 14 días, luego fueron mantenidos 7 días con dieta estandar y determinaron los parámetros hematológicos. (A) Hematocrito. (B) hemoglobina plasmática. (C) Porcentaje de reticulocitos en sangre. (D) Número total de reticulocitos en sangre. (E) Número total de eritrocitos en sangre. (F) Índice de producción reticulocitaria (IPR) (hematocrito/promedio de hematocrito animales sanos*% de reticulocitos). (G) Volumen corpuscular medio (V.C.M.). (H) Hemoglobina corpuscular media (H.C.M.) n=5-6, * $P < 0,05$ vs. control.

Finalmente, se determinó si nuestro modelo de ERC replica el alza de los niveles plasmáticos de FGF23 observados en los pacientes con ERC y en otros modelos animales de ERC experimental. Además, determinamos si la médula ósea contribuye a los niveles plasmáticos de FGF23 observados en la ERC. Se determinaron los niveles plasmáticos de FGF23 en su forma intacta (iFGF23) o activa y el total FGF23 en su forma C-terminal (cFGF23). Los niveles plasmáticos tanto de iFGF23 (64,8 vs. 669,9 pg/mL) (Figura 10A) como de cFGF23 (50,3 vs. 1.624,3 pg/mL) (Figura 10B) se encontraron aumentados respecto a los animales control. Los animales con ERC presentaron un aumento de la abundancia en la médula ósea del transcrito de 4,7 veces (Figura 10C) y 5,8 veces de la proteína de FGF23 (Figura 10D) respecto a los animales sanos.



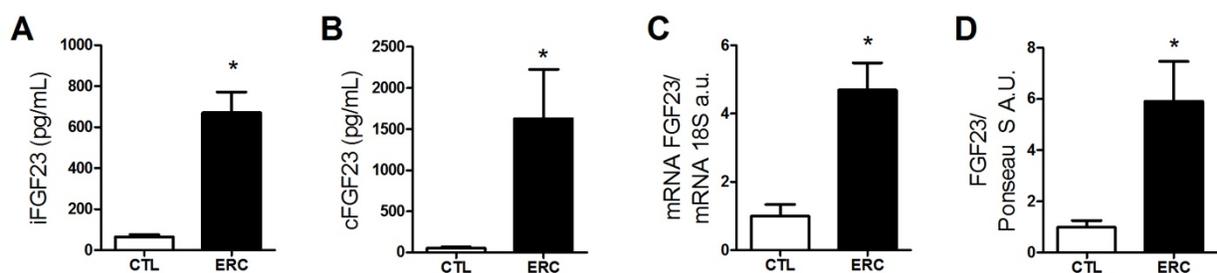


Figura 10: Efecto de la ERC sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea y su abundancia plasmática. Ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta con alto oxalato por 14 días, luego fueron mantenidos 7 días con dieta estandar. (A) Niveles plasmáticos de iFGF23. (B) Niveles plasmáticos de cFGF23. (C) Abundancia de mRNA de FGF23 en médula ósea. (D) Abundancia de la proteína de FGF23 en médula ósea. n=5-6, * $P < 0,05$ vs. control.

Posteriormente, analizamos si el aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea de los animales ERC con nefropatía inducida por oxalato se observaba en otro modelo animal de ERC experimental. Para ello utilizamos el modelo de ERC por nefrectomía 5/6 en ratones (NPX 5/6), que consiste en la pérdida de 5/6 de la masa renal de forma quirúrgica. Nuestros resultados mostraron que consistente con el modelo anterior, los animales NPX 5/6 mostraron un aumento de los niveles plasmáticos de iFGF23 *versus* los animales con cirugía ficticia sham (121,8 vs. 668,9 pg/mL) (Figura 11A). Los niveles plasmáticos de cFGF23 también se encontraron aumentados en los animales NPX 5/6 respecto a los animales sham (201,8 vs. 5.495,3 pg/mL) (Figura 11B). La expresión del transcrito de FGF23 en la médula ósea también se vió aumentada 6,5 veces respecto a los animales sham (Figura 11C).

Estos resultados muestran consistentemente que la médula ósea de los animales con enfermedad renal crónica tiene inducida la expresión de FGF23, por lo que, estos datos sugieren que la médula es un tejido que contribuye al alza de los niveles plasmáticos de FGF23 observados en la ERC.

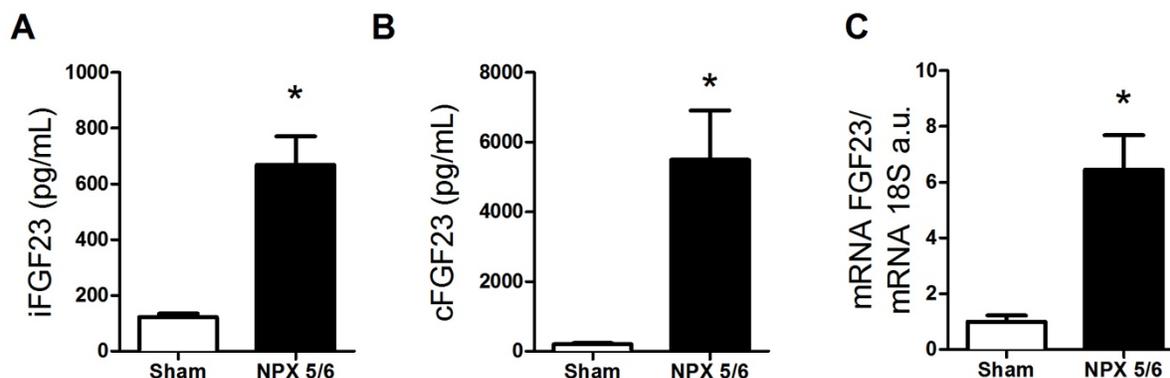


Figura 11: Efecto de la ERC sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea y su abundancia plasmática. Ratones con remoción parcial de la masa renal (NPX 5/6) fueron mantenidos por 5 semanas, tras lo cual se analizó la expresión de FGF23 en la médula ósea por RT-qPCR y los niveles plasmáticos de FGF23 por ELISA. (A) Niveles plasmáticos de iFGF23. (B) Niveles plasmáticos de cFGF23. (C) Abundancia de mRNA de FGF23 en la médula ósea. n=6-8, * $P < 0,05$ vs. sham.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que rEPO induce la expresión del mRNA de FGF23 en la médula ósea y aumenta la abundancia plasmática de FGF23 en animales sanos. Por lo que analizamos si la producción de EPO endógena o la expresión de su receptor estarían aumentados en la ERC y si esto se asociaría al alza de expresión observada en nuestros modelos de ERC. Para ello analizamos la expresión del transcrito de EPO y EPOR en nuestros animales controles y ERC inducida por oxalato, además determinamos los niveles plasmáticos de EPO mediante ELISA. Los niveles de expresión del mRNA de EPO renal no presentaron diferencias significativas entre el grupo control y ERC (Figura 12A), esto correlacionó con los niveles plasmáticos de EPO donde tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 12B). Finalmente, analizamos la expresión del mRNA del receptor de EPO en la médula ósea y encontramos un aumento de 3,4 veces en el grupo ERC *versus* el control (Figura 12C). Estos resultados sugieren que el alza de la expresión de FGF23 en la ERC se podría deber a un aumento de la actividad de la vía de señalización en la médula ósea por aumento del receptor de EPO.

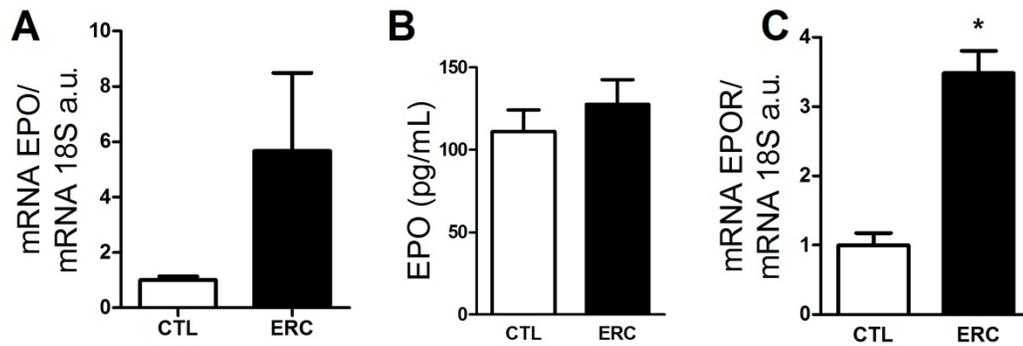


Figura 12: Efecto de la ERC experimental sobre la expresión de eritropoyetina renal y el receptor de eritropoyetina en médula ósea. Ratones con ERC inducida por dieta con alto exalato se les analizó la expresión de EPO renal y la expresión del receptor de EPO en la médula ósea por RT-qPCR y los niveles plasmáticos de EPO por ELISA. (A) Abundancia de mRNA de EPO renal. (B) Niveles plasmáticos de EPO. (C) Abundancia de mRNA de EPOR en la médula ósea. n=5-7, * $P < 0,05$ vs. control.

El procesamiento de FGF23 está determinado por la expresión y actividad de las enzimas GalNT3 y Fam20C que modulan los niveles plasmáticos de FGF23 en su forma iFGF23 y cFGF23. GalNT3 promueve la secreción de FGF23 y además lo protege del corte proteolítico, por lo tanto, esta enzima promueve la secreción de la forma iFGF23. Fam20C es una quinasa intracelular específica del Golgi, sin embargo, se ha encontrado enzima activa secretada, su función es fosforilar proteínas secretadas, en particular, la fosforilación de FGF23 promueve el corte proteolítico, secretándose así la forma clivada o cFGF23. Nuestros animales ERC presentaron un aumento de la abundancia de GalNT3 cerca de 2,5 veces respecto a los animales sanos (Figura 13A), sugiriendo una regulación en la ERC para la secreción y la producción de FGF23 intacto. Por otro lado, los animales con ERC presentaron un aumento de la abundancia de Fam20C sobre 5 veces respecto a los animales sanos (Figura 13B), sugiriendo además un aumento del procesamiento hacia la forma clivada de FGF23.

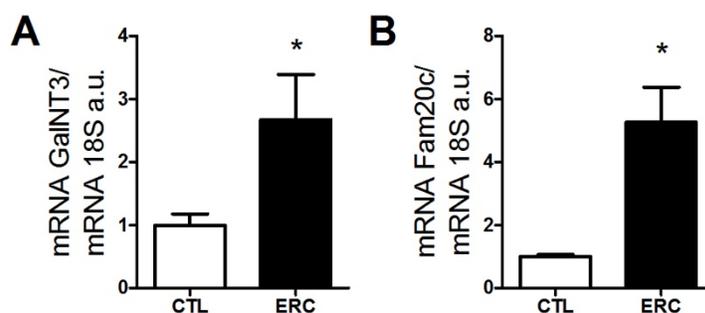


Figura 13: Efecto de la ERC sobre la expresión de GalNT3 y Fam20C. (A) Abundancia de mRNA de GalNT3 en médula ósea. (B) Abundancia del mRNA de Fam20C en médula ósea. n=5-6, * $P < 0,05$ vs. control

Nuestro grupo determinó que las células de la médula ósea que expresan FGF23 son las células BFU-e y CFU-e⁷⁵, entonces con el objetivo de caracterizar la composición relativa de los precursores y progenitores eritropoyéticos de la médula ósea en animales sanos y con ERC, en forma paralela, se extrajo médula ósea y se determinó su composición celular mediante los marcadores de superficie celular CD71 (receptor de transferrina) y Ter119 (glicoforina A). La proporción de estos marcadores varía en las células eritropoyéticas de acuerdo al estadio de diferenciación. CD71 es un marcador temprano (BFU-e y CFU-e) y Ter119 es un marcador de diferenciación tardía: pro-eritroblastos, eritroblastos tempranos y eritroblastos tardíos (Figura 14).

Mediante análisis de proteínas de superficie caracterizamos la composición de médula de animales sanos y con ERC, y así determinar si el alza en los niveles plasmáticos de FGF23 observados en nuestros animales con ERC se podría deber a cambios en la composición relativa de los componentes de la médula ósea. Nuestro análisis determinó que no existen diferencias en la composición relativa de todos los componentes de la médula ósea entre los animales sanos *versus* ERC (Figura 14) y particularmente en las células BFU-e y CFU-e (CD71⁺/Ter119⁻) que serían las células encargadas de la producción de FGF23 en la médula ósea.

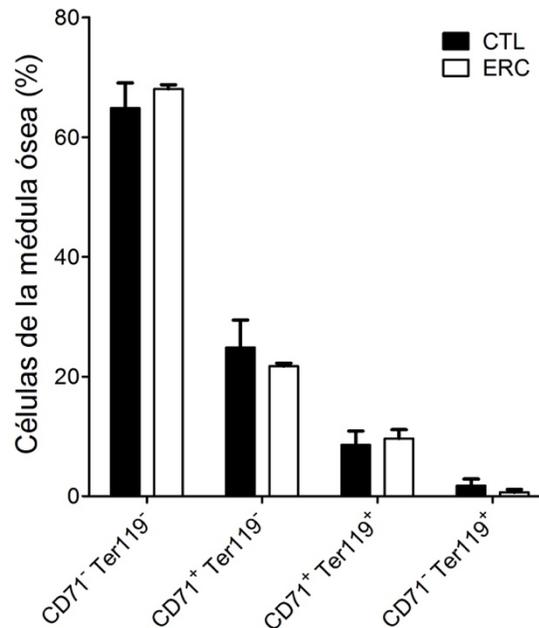


Figura 14: Composición relativa de los componentes celulares de la médula ósea de animales sanos y con ERC. (A) Representación de los porcentajes relativos de células de la médula ósea de animales sanos *versus* ERC. Células progenitoras, BFU-e y CFU-e, Pro-eritroblastos y eritroblastos tardíos.

En resumen, los animales con ERC presentaron una disminución progresiva de la función renal observado como un aumento y junto con esto un desarrollo progresivo de la anemia. Los animales presentaron una anemia normocítica y normocrómica de acuerdo a lo observado en los pacientes con ERC. Además, los animales con ERC mostraron un aumento de la expresión del transcrito de FGF23 en la médula ósea y un aumento de los niveles plasmáticos de iFGF23 y en mayor magnitud de cFGF23. El análisis de composición de la médula ósea por citometría de flujo no mostró cambios diferencias entre los animales sanos y los ERC. El aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea se asocia a un aumento de la expresión del receptor de eritropoyetina (EPOR), sin cambios en los niveles plasmáticos de EPO.

Efecto agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en animales sanos.

Una vez caracterizado nuestro modelo, primero se determinó el efecto agudo de la administración de rEPO sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea de ratones

C57BL/6 sanos. rEPO (5.000 UI/Kg, Recormon™, Roche, Basel, Suiza) fue suministrada vía subcutánea y se realizó un curso temporal de expresión de FGF23. Después de 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas de la inyección de rEPO los animales fueron sometidos a eutanasia y se extrajo la médula ósea de tibias y fémures, para análisis de expresión del transcrito de FGF23 por RT-qPCR y de proteína de FGF23 por *Western blot*. Adicionalmente, se obtuvo muestras de plasma para la determinación de los cambios de la concentración de FGF23 circulante mediante test de ELISA. Se evaluó el efecto de rEPO sobre la hematopoyesis 24 y 48 post suministro de rEPO, se determinaron parámetros hematológicos, tales como, hematocrito, hemoglobina, reticulocitos, índice de producción reticulocitaria (IPR), volumen corpuscular medio (V.C.M.), hemoglobina corpuscular media (H.C.M) y los cambios en la abundancia relativa de los progenitores y precursores hematopoyéticos de la médula ósea mediante citometría de flujo usando marcadores de superficie para el linaje eritropoyético.

Se observó que el transcrito de FGF23 es inducido en la médula ósea por rEPO de manera tiempo dependiente, el transcrito se indujo de forma temprana observándose inducción a las 2 horas post administración de rEPO (111 veces vs. control sin rEPO), a las 4 horas se observó el pick de expresión en la médula ósea (130 veces), a las 8 horas se observó un decaimiento de la inducción, a las 24 horas la inducción fue 4 veces con respecto al control sin rEPO y a las 48 horas se normalizó la expresión en la médula ósea a los valores basales (Figura 15A). Por otro lado, el análisis de expresión de la proteína por *Western blot* no mostró diferencias dentro de las primeras 24 horas post rEPO y sólo a las 48 horas se observó un aumento de la proteína de 2,5 veces con respecto al control (Figura 15B), sugiriendo que la mayor parte de la proteína sintetizada durante las primeras 24 horas fue secretada. Los niveles plasmáticos de FGF23 en su forma intacta (iFGF23) aumentaron rápidamente llegando a su pick a las 8 horas post rEPO (basal 41 ± 19 vs. 590 ± 122 pg/mL), decayendo a las 24 horas y a las 48 horas se recuperaron los niveles basales sin rEPO (Figura 15C). Además, se analizaron los valores plasmáticos de FGF23 C-terminal (cFGF23), la determinación plasmática de éste fragmento mediante ELISA, detecta tanto la forma intacta y el producto de la degradación de la forma intacta. Se observó que al igual que la forma intacta, cFGF23 aumentó rápidamente con un pick a las 8 horas (basal 60 ± 34 vs.

4.843 ± 1.882 pg/mL) un alza de 50 veces sobre los niveles sin rEPO. A las 24 horas se mantuvo elevado 20 veces y a las 48 horas se recuperaron los valores basales (Figura 15D).

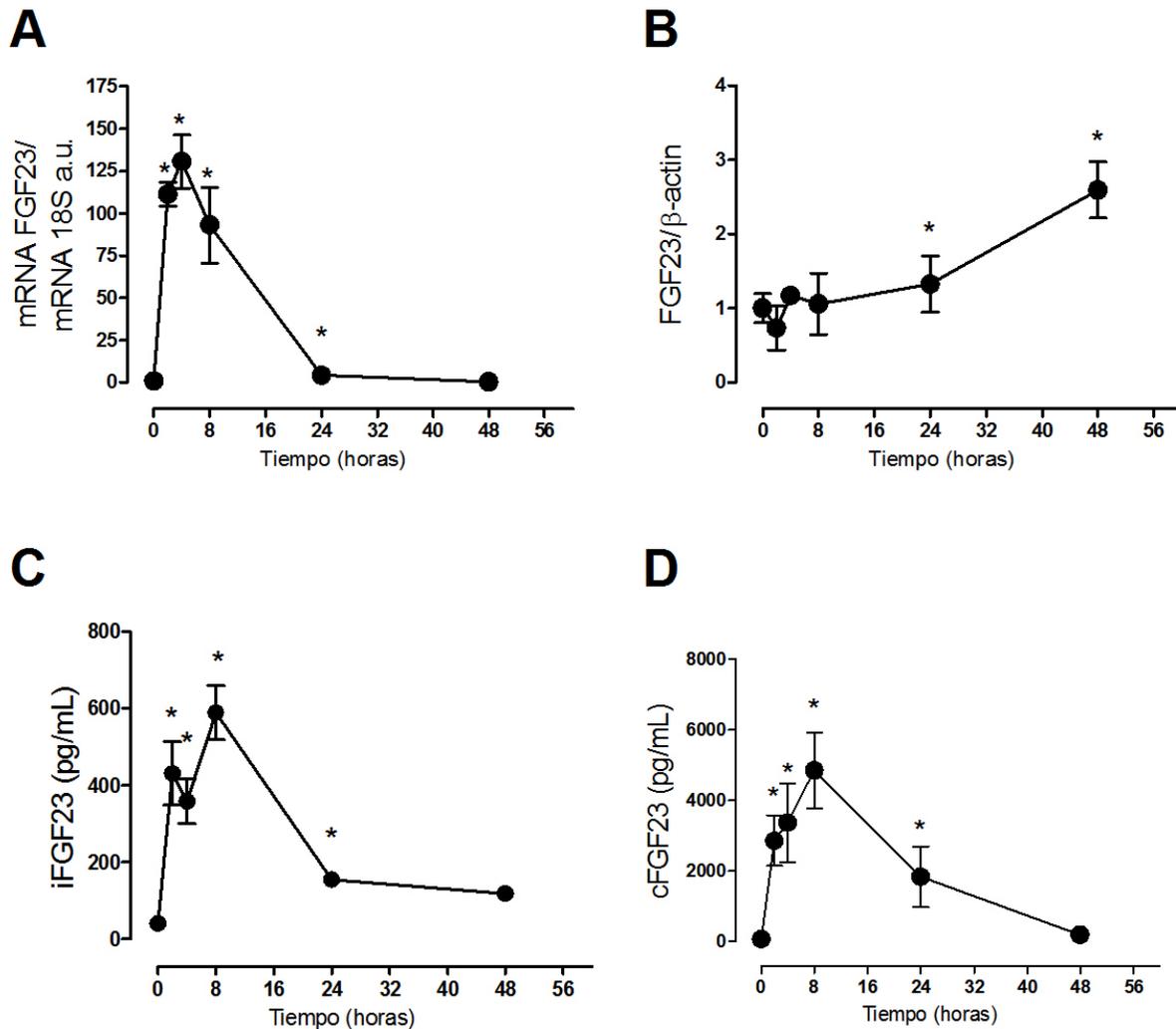


Figura 15: Efecto del suministro agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en ratones sanos. A ratones C57BL/6 se le inyectó una dosis de rEPO (Recormon™, Roche; 5.000 UI/Kg, s.c.). Después de un curso temporal en horas se determinó la expresión de FGF23. (A) Abundancia del mRNA de FGF23 en médula ósea. (B) Abundancia de la proteína de FGF23 en médula ósea. (C) Concentración de iFGF23 plasmático, determinado por ELISA. n=4-5. (D) Concentración de cFGF23 plasmático, determinado por ELISA. n=5-6 por tiempo, * $P < 0,05$ vs. control sin rEPO.

Se analizó la expresión de GalNT3 y Fam20C ya que la regulación de la secreción de FGF23 tanto para su forma intacta como C-terminal dependen de la expresión de estas proteínas. El transcrito de GalNT3 fue inducido 2,5 veces por rEPO a las 4 horas post suministro, en los otros tiempos analizados no se observaron diferencias significativas (Figura 16A). El transcrito de Fam20C aumentó rápidamente, a las 2 horas post rEPO llegando a 22 veces sobre los niveles sin rEPO, Fam20C se mantuvo elevado a las 4 y 8 horas, pero en menor magnitud. A las 24 horas nuevamente recuperó la expresión basal sin rEPO (Figura 16B). Estos resultados correlacionan con los niveles plasmáticos observados de iFGF23 y cFGF23, un alza en la expresión de GalNT3 está asociado a un aumento de la secreción de FGF23 y en particular de su forma iFGF23. Por otro lado, un alza de la expresión de Fam20C se relaciona a un aumento del corte proteolítico de FGF23, y con ello, un alza de cFGF23. Las magnitudes de aumento mayor observados en la forma cFGF23 correlacionan con los mayores niveles de expresión de Fam20C inducidos por rEPO en la médula ósea.

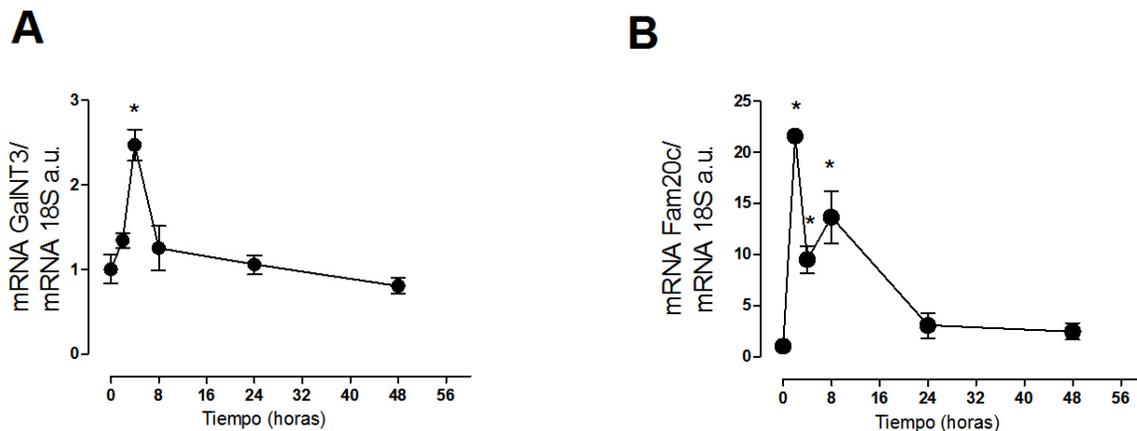


Figura 16: Efecto del suministro agudo de rEPO sobre la expresión de las enzimas de la biosíntesis de FGF23 en ratones sanos. A ratones C57BL/6 se inyectó una dosis de rEPO (RecormonTM, Roche; 5000 UI/Kg, s.c.). Después de un curso temporal en horas se determinó la expresión de GalNT3 y Fam20C. A. Abundancia del mRNA de GalNT3 en médula ósea. B. Abundancia de mRNA de Fam20C en médula ósea. n=5-6, *P<0,05 vs. control.

Con el objetivo de analizar el efecto de rEPO sobre las células de la médula ósea, a animales sanos de les suministró rEPO y luego de 24 y 48 horas las células

fueron aisladas y posteriormente teñidas para citometría, donde los parámetros de “*Gating*” fueron ajustados a la autofluorescencia sin marcaje. En primer lugar, se observó que en ratones sanos el tratamiento con rEPO produjo una disminución a las 24 horas en el porcentaje de células CD71⁻/Ter119⁻ (progenitores hematopoyéticos). Las células CD71⁺/Ter119⁻ (BFU-e y CFU-e) no presentaron cambios significativos a las 24 ó 48 horas. En cambio, las células CD71⁺/Ter119⁺ (pro-eritroblastos) aumentaron su proporción respecto al control, concordante con el efecto proliferador y diferenciador de EPO. Los eritroblastos tardíos (células CD71⁻/Ter119⁺) no mostraron diferencias respecto al control, probablemente, debido a su salida a la sangre, aumentada por efecto del suministro de rEPO (Figura 17). Estos resultados sugieren que el aumento de expresión de FGF23 no está relacionado con un aumento en la proporción de las células productoras de FGF23 (BFU-e y CFU-e).

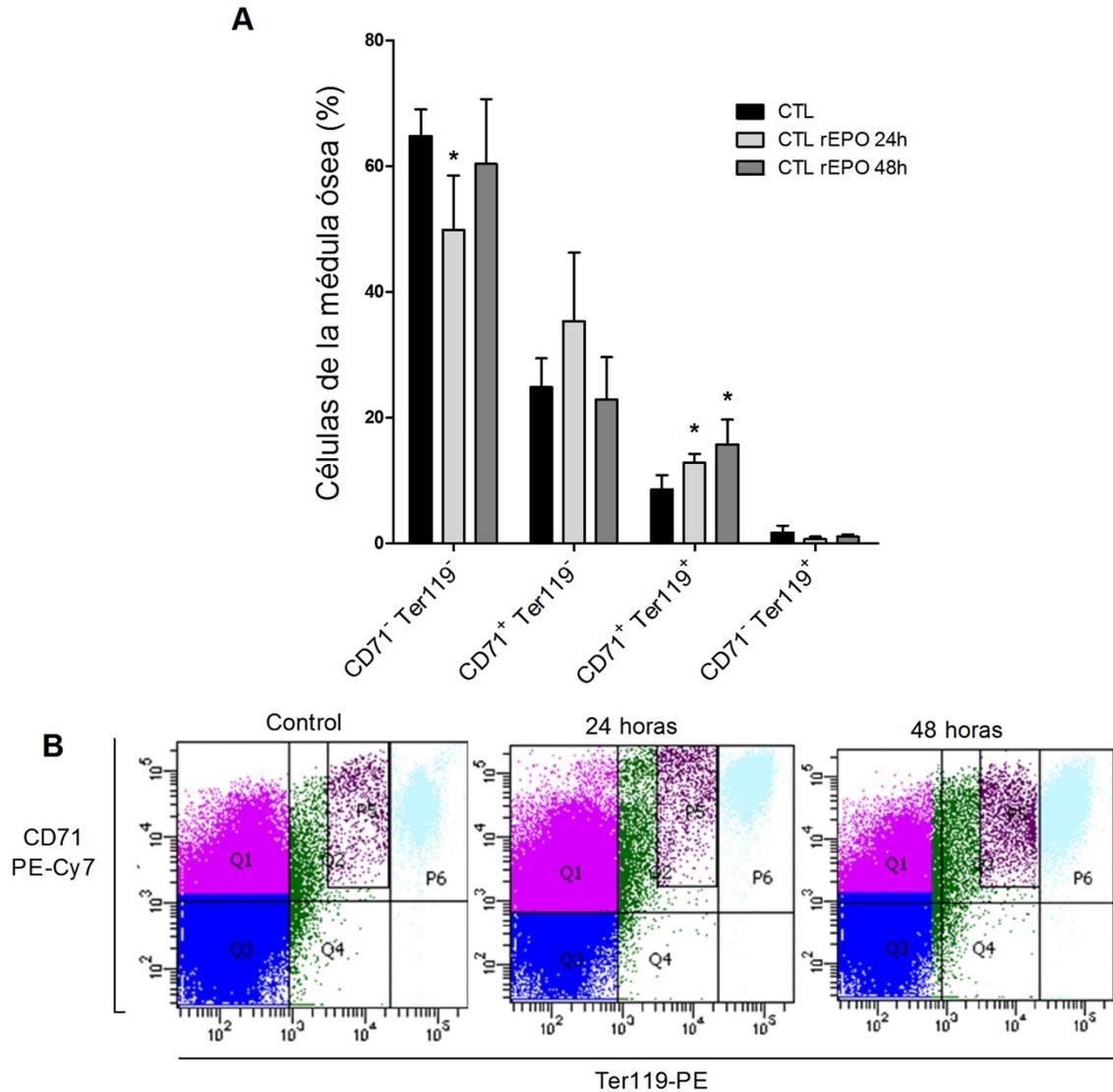


Figura 17: Efecto del suministro agudo de rEPO sobre la composición de la médula ósea en ratones sanos. Células de médula ósea de ratones sanos control o con una dosis de rEPO (Recormon™, Roche, 5.000 UI/Kg, s.c.). Después de 24 ó 48 horas fueron aisladas y teñidas con los marcadores anti-CD71-PE-Cy7 y anti-Ter119-PE, para análisis por citometría de flujo. A. Representación de los porcentajes relativos de células progenitoras (CD71⁻/Ter119⁻), BFU-e y CFU-e (CD71⁺/Ter119⁻), Pro-eritroblastos (CD71⁺/Ter119⁺) y eritroblastos tardíos (CD71⁻/Ter119⁺). B. *Dot plot* representativos de cada tiempo. n=5-6, *P<0,05 vs. control.

Finalmente, analizamos la respuesta eritropoyética de la médula ósea mediante los parámetros hematológicos. Después del tratamiento con rEPO los animales mostraron un aumento en el hematocrito (Figura 18A) y hemoglobina (Figura 18B) a las 24 y 48 horas con respecto al basal. El porcentaje de reticulocitos aumentó sólo a las

48 horas post rEPO (Figura 18C), el IPR aumentó significativamente a las 24 y 48 horas (Figura 18D), indicando que la médula ósea responde a rEPO. El V.C.M. aumentó a las 48 horas (Figura 18E) y la H.C.M. no presentó cambios (Figura 18F), indicando que los eritrocitos producidos poseen un tamaño ligeramente mayor al control a las 48 horas y sin cambios en los niveles de hemoglobina total. Estos datos indican efectividad de rEPO sobre en la diferenciación y proliferación de las células de la médula ósea.

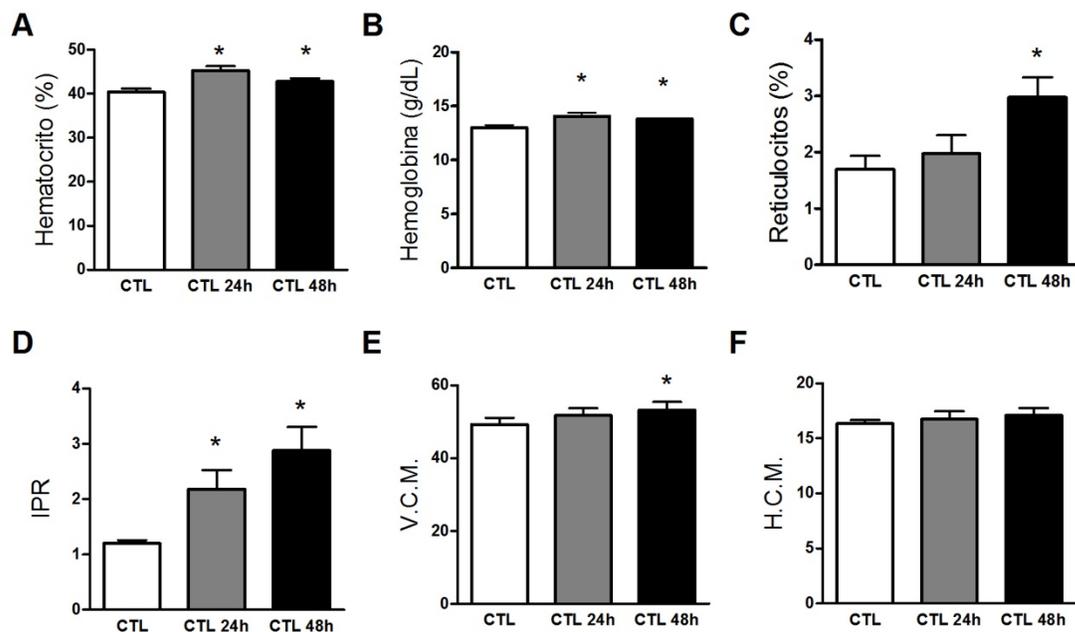


Figura 18: Parámetros hematológicos después del tratamiento agudo con rEPO. A ratones C57BL/6 sanos se les suministró una dosis de rEPO (Recormon™, Roche; 5.000 UI/Kg, s.c.) y después de 24 ó 48 horas se determinaron los parámetros hematológicos. A. Hematocrito. B. Hemoglobina plasmática. C. Reticulocitos. D. Índice de producción reticulocitaria (IPR). E. Volumen corpuscular medio (V.C.M.). F. Hemoglobina corpuscular media (H.C.M.). n=5-6; * $P < 0,05$ vs. el control.

Efecto agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en animales con ERC.

Posteriormente, se analizó el efecto agudo de rEPO en animales con enfermedad renal crónica (ERC). Se determinó el efecto agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea de ratones C57BL/6 con enfermedad renal crónica inducida

por dieta con alto oxalato. rEPO fue suministrada vía subcutánea (5.000 UI/kg) y se realizó un curso temporal de la expresión de FGF23. Al igual que en los animales sanos, se extrajo plasma para determinar los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23. Se extrajo médula ósea para extracción de mRNA y proteínas para analizar la expresión de FGF23 y los genes relacionados con la secreción de FGF23.

La abundancia del transcrito de FGF23 en la médula ósea fue inducido de forma temprana por rEPO a las 4 horas post suministro, en la médula ósea de los animales con ERC se llegó a un aumento de 11 veces respecto a los animales con ERC sin rEPO (Figura 19A). A las 24 horas post administración de rEPO, los animales mantuvieron el aumento de expresión del transcrito de FGF23 en la médula ósea, pero sólo 3,3 veces sobre los animales con ERC sin rEPO (Figura 19A). Estos datos indicarían que en la ERC también se observaría la temporalidad de la expresión de FGF23 post suministro de rEPO.

Adicionalmente, a otro grupo de animales con ERC se les suministró una dosis de rEPO y se tomaron muestras de plasma seriadas (0, 2, 4, 8 y 24 horas) para realizar un curso temporal del efecto de rEPO sobre los niveles plasmáticos de FGF23. Los niveles plasmáticos de iFGF23 no sufrieron cambios post suministro de rEPO en ningún tiempo observado (basal 1.637 pg/mL) (Figura 19B). Por otro lado, los niveles plasmáticos de cFGF23 presentaron una elevación temprana a las 2 horas (basal 2.706 \pm 1.177 vs. 7.394 \pm 1.737 pg/mL a las 2 horas). A las 4 y 8 horas continuaron en alza con el pick a las 8 horas post suministro de rEPO (16.148 \pm 4.189 pg/mL). A las 24 horas post rEPO los niveles plasmáticos de cFGF23 disminuyeron respecto a las 8 horas, pero no llegaron a los niveles basales (8.176 \pm 1.359 pg/mL) (Figura 19C).

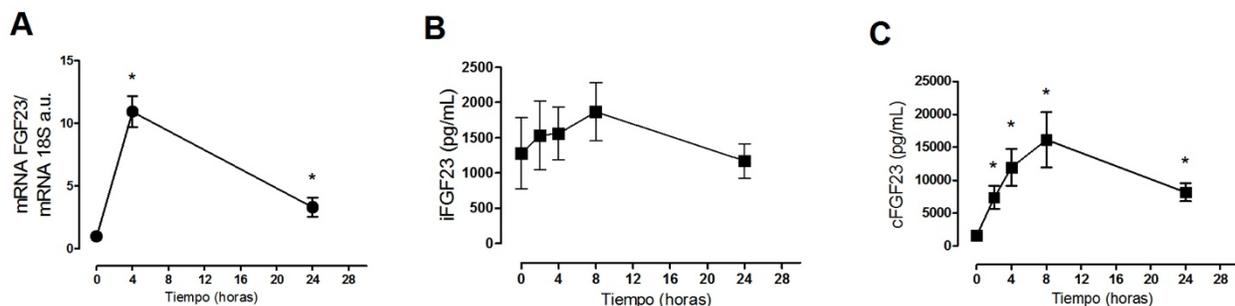


Figura 19. Efecto del suministro agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en ratones ERC. A ratones C57BL/6 se inyectó una dosis de rEPO (Recormon™, Roche; 5.000 UI/Kg, s.c.). Después de 0, 2, 4, 8 y 24 horas se determinó la expresión de FGF23. A. Abundancia del mRNA de FGF23 en médula ósea. B. Niveles plasmáticos de iFGF23 determinado por ELISA. C. Niveles plasmáticos de cFGF23 plasmáticos, determinado por ELISA. n=4-5, * $P < 0,05$ vs. ERC.

Con el objetivo de analizar si los cambios en los niveles plasmáticos de ambas formas de FGF23 se relacionan con las proteínas que modulan su secreción, se analizó la abundancia del transcrito de GalNT3 y Fam20C en la médula ósea de los animales ERC post suministro de rEPO. En forma basal el mRNA de GalNT3 se encontró elevado 2,8 veces en los animales ERC y la abundancia Fam20C se encontró elevada 5 veces en los animales ERC. Post suministro de rEPO se observó una disminución de la abundancia de GalNT3 llegando a niveles de expresión similares a los animales sanos sin rEPO (Figura 20A), contrario a lo observado en los animales sanos. Por otra parte, en respuesta a rEPO se observó una disminución de la expresión de Fam20C, sin embargo, los niveles permanecieron elevados 2 veces sobre un animal sano sin rEPO (Figura 20B).

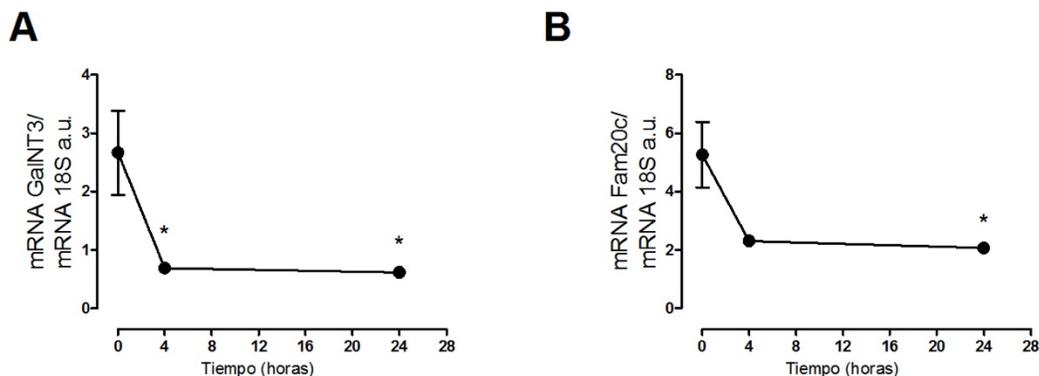


Figura 20: Efecto del suministro agudo de rEPO sobre la expresión de las enzimas de la biosíntesis de FGF23 en ratones con ERC. A ratones C57BL/6 se inyectó una dosis de rEPO (Recormon™, Roche; 5.000 UI/Kg, s.c.) y después de un periodo de 4 y 24 horas se determinó la expresión de GalNT3 y Fam20C. A. Abundancia del mRNA de GalNT3 en médula ósea. B. Abundancia de mRNA de Fam20C en médula ósea. n=4-5, * $P < 0,05$ vs. ERC.

Sorprendentemente, rEPO moduló de manera inversa la expresión de las enzimas que regulan la secreción y el procesamiento de FGF23 en la médula ósea en los animales sanos *versus* los animales con ERC. En los animales sanos se observó que rEPO produjo un incremento en la abundancia de ambas enzimas, al contrario, en los animales con ERC rEPO produjo una disminución en la expresión. Junto con las diferencias en la expresión de las enzimas que regulan la secreción, se observó que los niveles plasmáticos de FGF23 post rEPO en ambos tipos de animales no fueron iguales. En vista de esa regulación diferencial sería probable que la relación de niveles plasmáticos de FGF23 en su forma intacta y procesada (cFGF23) se encuentren diferentes en los animales sanos *versus* los con ERC. Para evaluar la relación que existe entre ambos tipos de FGF23 hicimos la relación entre iFGF23/cFGF23 en animales control y animales con ERC post suministro de rEPO. Valores sobre 1 nos indicaría que síntesis y secreción de su forma activa sería mayor a la degradación o corte proteolítico de FGF23; valores cercanos a 1 nos indicaría que la tanto la degradación cómo la síntesis estarían en equilibrio; valores menores a 1 nos indicaría que la degradación es mayor a la síntesis y secreción de la forma activa.

Nuestros resultados mostraron que en condiciones basales existe más FGF23 clivado que intacto en ambas condiciones (razón menor a 1). En respuesta a rEPO se induce en mayor medida el clivaje de FGF23, ya que la razón entre iFGF23/cFGF23 se hace aún menor, llegando rápidamente a las 2 horas a la mínima razón, condición que se mantiene hasta las 24 horas post rEPO (Figura 21). Sorprendentemente, a pesar de que los niveles plasmáticos de i/cFGF23 en los animales sanos y con ERC son distintos, en respuesta a rEPO la razón se mantiene igual para ambas condiciones indicando una posible regulación mediada por rEPO para mantener los niveles de iFGF23 en menor proporción respecto al cFGF23. Es probable que esta regulación sea controlada en parte por los cambios en los niveles de expresión de las enzimas que regulan la secreción y el procesamiento de FGF23: GaINT3 y Fam20C.

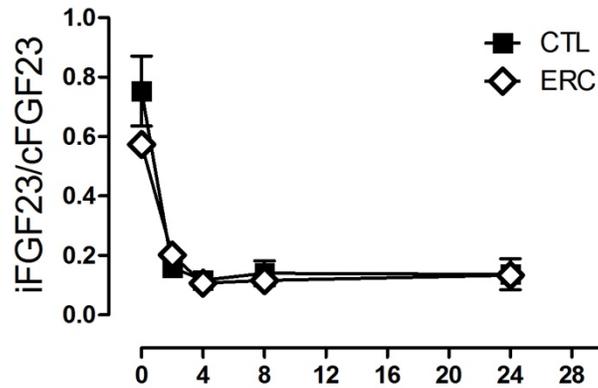


Figura 21. Efecto del suministro agudo de rEPO sobre la razón iFGF23/cFGF23 en ratones sanos y con ERC. n= 5-6.

Con el objetivo de determinar si la modulación de rEPO sobre la expresión y secreción de FGF23 no está asociado al modelo utilizado de ERC, evaluamos el efecto agudo de rEPO en ratones sanos y con ERC con el modelo de nefrectomía 5/6. Observamos que tanto en los ratones sanos (Figura 22A) como en los con ERC 5/6 (Figura 22B) que recibieron rEPO los niveles de cFGF23 aumentaron a las 2 horas después del suministro de rEPO. Luego de estos resultados, podemos decir que el efecto de rEPO es independiente del modelo de enfermedad renal crónica.

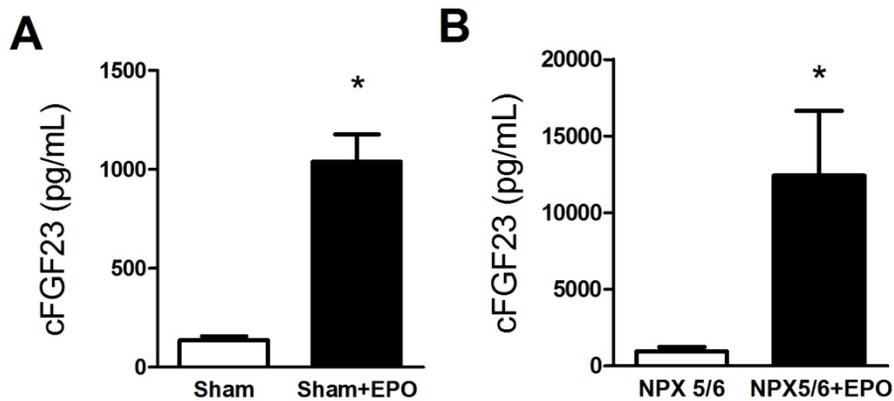


Figura 22. Efecto del suministro agudo de rEPO sobre los niveles plasmáticos de FGF23 en ratones sanos y con ERC por nefrectomía 5/6 (NPX 5/6). Ratones con cirugía ficticia Sham o con ERC por nefrectomía 5/6 fueron estimuladas con rEPO (Recormon™, Roche; 5.000 UI/Kg, s.c.), luego de 2 horas fue analizada la abundancia plasmática de cFGF23 por ELISA. A. Abundancia de cFGF23 por ELISA en ratones

sanos. B. Abundancia plasmática de cFGF23 por ELISA en ratones con nefrectomía 5/6. n=4-5, * $P < 0,05$ vs. ERC.

Finalmente, al igual que en los animales sanos analizamos el efecto de rEPO sobre la composición de la médula ósea para determinar si existen cambios en la distribución celular de la médula. Las células que expresan FGF23 en la médula ósea son las BFU-e y CFU-e⁷⁵, por lo que, un aumento en la proporción de estas células podrían incidir en el alza de los niveles plasmáticos de FGF23 en la ERC y en la respuesta de la médula ósea al suministro de rEPO. Analizamos la composición relativa de los precursores y progenitores eritropoyéticos de la médula ósea mediante citometría con los marcadores de superficie CD71 y Ter119. Como observamos anteriormente, los animales sanos y con ERC no mostraron diferencias en la composición celular de la médula ósea (Figura 12A). Como en los animales sanos observamos efecto de rEPO en la composición de la médula ósea a las 24 horas post suministro, elegimos ese mismo tiempo para el análisis en los animales ERC. A diferencia de lo observado en los animales sanos, el suministro de rEPO en los animales con ERC no produjo cambios en ningún componente de la médula ósea (Figura 23B). Por lo que, el cambio observado en los niveles de expresión de FGF23 y el alza de los niveles plasmáticos de cFGF23 se debería a un efecto inductor dado por la rEPO y no por un aumento de la masa de células productoras de FGF23.

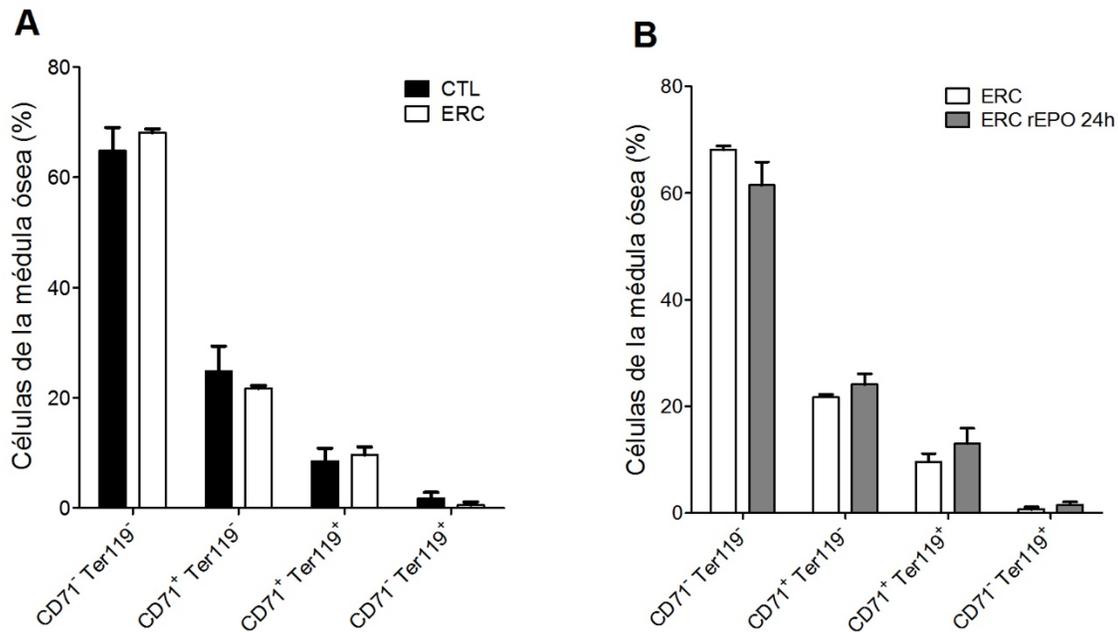


Figura 23: Efecto de la ERC y del suministro agudo de rEPO sobre la composición de la médula ósea. Células de médula ósea de ratones sanos, con ERC o ERC con una dosis de rEPO (Recormon™, Roche, 5.000 UI/Kg, s.c.). Después de 24 fueron aisladas y teñidas con los marcadores anti-CD71-PE-Cy7 y anti-Ter119-PE, para análisis por citometría de flujo. (A) Porcentajes relativos de células progenitoras, BFU-e y CFU-e, Pro-eritroblastos y eritroblastos tardíos de animales control y con ERC. (B) porcentajes relativos de células progenitoras, BFU-e y CFU-e, Pro-eritroblastos y eritroblastos tardíos de animales ERC y ERC con rEPO post 24 horas. n=4-5.

4.- Determinar el efecto del tratamiento crónico con rEPO en ratones sanos y ERC sobre las variables hematológicas y su relación con FGF23.

Nuevamente utilizamos el modelo de nefropatía crónica por cristales de oxalato. De acuerdo a los datos de la literatura este modelo produce un rápido y reproducible deterioro de la función renal, aumentos muy importantes de la concentración plasmática de FGF23, hiperfosfemia y anemia. Se realizó el protocolo de ERC inducida por oxalato donde ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta sin calcio y con oxalato (50 µM/g de alimento) por 14 días, luego de mantuvieron 7 días con dieta normal (21 días después del inicio de la dieta con oxalato). Al día 21 los animales fueron divididos en dos grupos: ERC y ERC más rEPO (5.000 UI/kg, Recormon™, Roche, s.c.) con

tratamiento crónico (3 veces a la semana por 2 semanas). A los animales se les monitorearon los cambios del hematocrito y el nitrógeno ureico semanalmente. Los animales que recibieron dieta alta en oxalato progresivamente disminuyeron el hematocrito (Figura 24B) y aumentaron el nitrógeno ureico plasmático (Figura 25A), finalizada la dieta con oxalato los animales mantuvieron el BUN elevado (Figura 25B).

Los animales del grupo control y los animales ERC, que recibieron la misma dosis de rEPO, presentaron un alza progresiva del hematocrito. Sorprendentemente, el tratamiento con rEPO tuvo un efecto similar con respecto al valor máximo de hematocrito alcanzado al comparar ratones control (Figura 24A) con los ratones ERC (Figura 24B), llegando a un máximo de aproximadamente 60%. Sin embargo, el cálculo de la variación, es decir, tasa de cambio con respecto al día de inicio del tratamiento con rEPO mostró ser significativamente mayor en los ratones ERC (de 30% a 60% en 14 días vs. 45% a 60% en 14 días para ratones sanos).

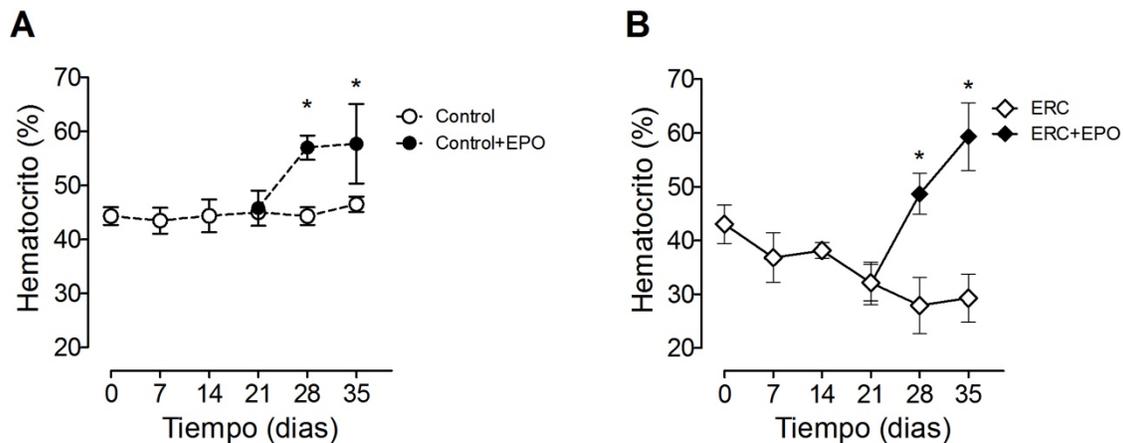


Figura 24: Efecto de la ERC y el suministro crónico de eritropoyetina sobre el hematocrito. Ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta con alto oxalato por 14 días, luego fueron mantenidos 7 días con dieta estandar, y después los animales fueron divididos en grupo con y sin tratamiento con rEPO (Recormon™, Roche, 5.000 UI/Kg, s.c.) 3 veces a la semana por 2 semanas). (A) Hematocrito de animales sanos con y sin suministro de rEPO. (B) Hematocrito de animales con ERC con y sin suministro de rEPO. n=5-6, * $P < 0,05$ vs. control o ERC.

Se analizaron los parámetros funcionales renales para caracterizar la ERC y si el tratamiento con rEPO crónico tendría un efecto sobre ellos. Los animales ERC

mantuvieron el BUN elevado durante las semanas de tratamiento con EPO (Figura 25A y 25B). Se analizaron además los niveles plasmáticos de potasio, también elevados en la ERC, ambos grupos de animales con ERC presentaron hiperkalemia (Figura 25C). Analizamos los niveles plasmáticos de fosfato, ya que su elevación es característica en la ERC, los animales con ERC y ERC más rEPO crónico presentaron hiperfosfatemia (12,86 mg/dL para ERC y 12,83 mg/dL para ERC más rEPO vs. 8,5 mg/dL control) (Figura 25D).

Para estimar la producción de EPO renal, se determinó la abundancia del mRNA de EPO en los diferentes grupos al fin del periodo experimental. La administración crónica de rEPO en ratones sanos y con ERC produjo una disminución significativa del transcrito de EPO con respecto a los valores control sin rEPO, observándose nula expresión de EPO renal (Figura 25E). La abundancia del transcrito de EPO renal entre ratones controles y ERC sin rEPO no presentó diferencias significativas (Figura 25E). Previamente analizamos los niveles plasmáticos de EPO en los animales sanos y con ERC y ambos grupos mostraron valores plasmáticos similares (Figura 12B). Finalmente, analizamos la expresión del receptor de eritropoyetina (EPOR) en la médula ósea luego del tratamiento crónico con rEPO y observamos que rEPO indujo sobre 4 veces la expresión del receptor tanto en animales sanos como en los con ERC.

La acción de FGF23 está determinada por la unión de su co-factor (Klotho) a su receptor, la producción de Klotho está principalmente localizada en el riñón, en particular en el túbulo distal, y su abundancia está relacionada con el daño renal, donde a mayor daño menor abundancia de Klotho, debido principalmente a la disminución de las células productoras de Klotho. Se estimó el efecto de la ERC sobre la producción de Klotho mediante la abundancia de mRNA de Klotho. Como se esperaba, se observó que los ratones con ERC presentaron una disminución significativa respecto a los ratones sanos control. El tratamiento con rEPO no produjo cambios en la abundancia de Klotho a los ratones sanos (Figura 23F). Sin embargo, el tratamiento con rEPO en los animales con ERC indujo la recuperación de los niveles normales de expresión de Klotho renal (Figura 23F).

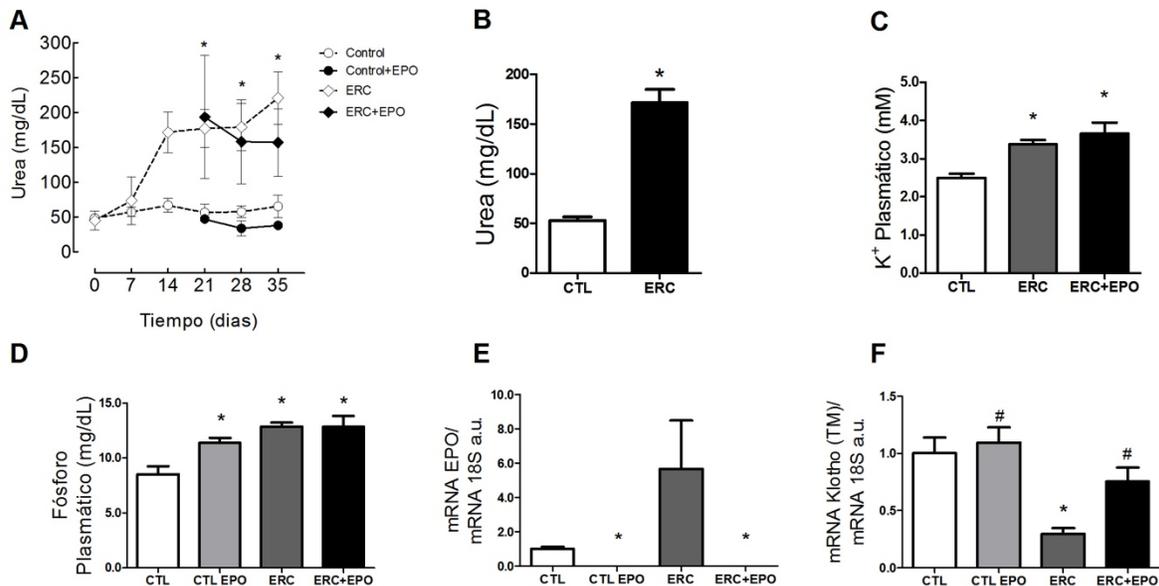


Figura 25: Efecto de la ERC y del suministro crónico de eritropoyetina sobre la función renal. Ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta con alto oxalato por 14 días, luego fueron mantenidos con dieta estandar y después de 1 semana post oxalato, los animales fueron divididos en grupo con y sin tratamiento con rEPO (Recormon™, Roche, 5.000 UI/mL/Kg, s.c.) 3 veces a la semana por 2 semanas. (A) Urea plasmática semanal. (B) Niveles plasmáticos de urea final del tratamiento. (C) Niveles plasmáticos de postasio. (D) Fosforo plasmático. (E) Expresión del mRNA de EPO renal. (F) Expresión del mRNA de Klotho renal en su forma transmembra (TM). n=4-6, * $P < 0,05$ vs. control, # $P < 0,05$ vs. ERC.

En los mismos animales se determinó el efecto de la administración crónica de rEPO sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea. En primer lugar, se analizó el efecto de rEPO sobre los animales sanos. El transcrito de FGF23 en la médula ósea aumentó 2,3 veces en relación al grupo control sin rEPO (Figura 26A). La proteína FGF23 en la médula ósea correlacionó con el alza del transcrito, aumentando 2,9 veces sobre los animales sanos sin rEPO (Figura 26B). Sin embargo, los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23 no presentaron diferencias significativas (Figura 26C y Figura 26D).

Los animales con ERC presentaron un alza en la expresión de mRNA de FGF23 de 4,7 veces en relación al grupo control (sanos) que recibió vehículo (Figura 26E). En contraste con lo que observamos en el grupo control, la administración de rEPO crónica en animales ERC no produjo cambios significativos en la abundancia del transcrito al

comparar con el grupo ERC que no recibió rEPO (Figura 26E). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la abundancia de la proteína de FGF23 presente en la médula ósea al comparar los animales ERC con los animales ERC+rEPO crónico (Figura 26F).

Además, se determinaron los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23 mediante ELISA. Los animales ERC mostraron un alza ≈ 6 veces en los niveles de iFGF23 plasmático comparados con el grupo control (Figura 26G). El suministro de rEPO no causó diferencias significativas al comparar la concentración de iFGF23 del plasma de los animales ERC (Figura 26G). De la misma forma se analizó la abundancia de cFGF23 en el plasma de los mismos animales, los animales con ERC presentaron niveles plasmáticos elevados comparados con los controles sanos, en tanto que los animales ERC+rEPO no mostraron diferencias respecto al grupo ERC sin rEPO (Figura 26H).

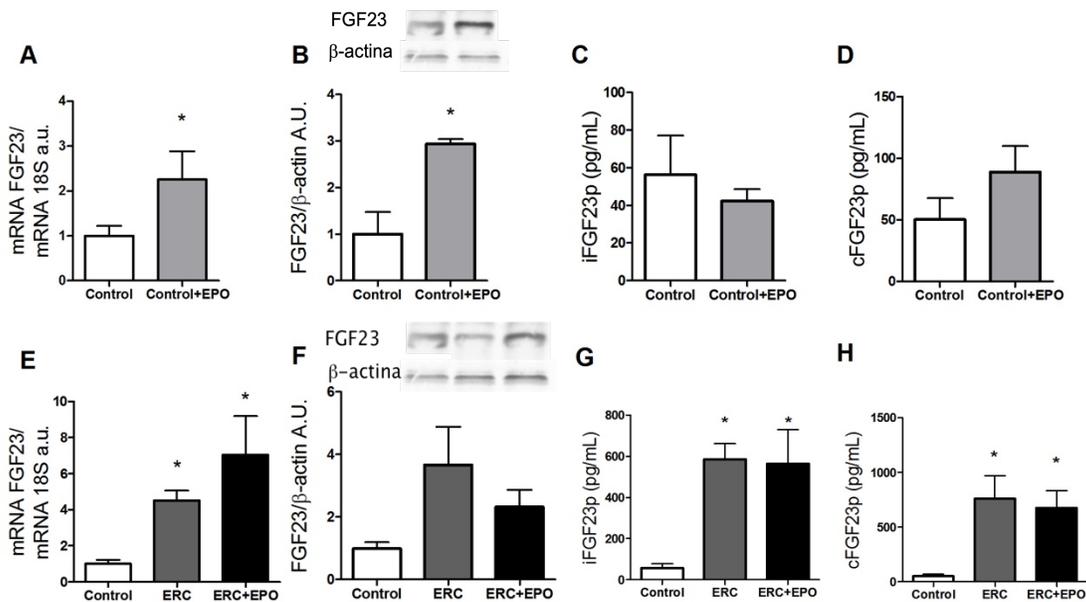


Figura 26: Efecto de la administración crónica de rEPO sobre la expresión de FGF23 en la médula ósea y en la concentración plasmática de FGF23 en ratones sanos y ERC con y sin tratamiento crónico de rEPO. (A) mRNA de FGF23 en médula ósea de animales sanos y sanos con rEPO. (B) Proteína de FGF23 en médula ósea de animales sanos y sanos con rEPO. (C) Concentración plasmática de iFGF23 de animales sanos y sanos con rEPO. (D) Concentración plasmática de cFGF23 de animales sanos y sanos

con rEPO. (E) Abundancia del mRNA de FGF23 en médula ósea de animales control, ERC y ERC con rEPO. (F) Abundancia de la proteína de FGF23 en médula ósea de animales sanos, ERC y ERC con rEPO. (G) Concentración plasmática de iFGF23 de animales sanos, ERC y ERC con rEPO. (H) Concentración plasmática de cFGF23 de animales sanos, ERC y ERC con rEPO n=4-5, * $P < 0,05$ vs. control.

En resumen, todos estos resultados muestran que el tratamiento con rEPO causa aumentos significativos en la expresión en la médula ósea de FGF23 en los animales sanos. Los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23 en ratones controles sanos y con ERC no mostraron diferencias respecto a su par sin rEPO. En particular, la ERC experimental causa una importante inducción de FGF23 en la médula ósea y el plasma, el suministro de rEPO crónica no causó mayores aumentos.

Finalmente, con el objetivo de analizar si los cambios en la expresión de FGF23 en la médula ósea se asocian a cambios en la composición de los tipos celulares, se analizó si la administración crónica de rEPO en ratones sanos y enfermos produce cambios en la composición de la médula ósea. Se determinaron las poblaciones celulares eritropoyéticas mediante marcadores de superficie CD71 y Ter119. Los análisis citográficos mostraron que la administración crónica de rEPO en los animales sanos y con ERC produjo una disminución de la proporción de células progenitoras comunes CD71⁻/Ter119⁻, consecuentemente se observó un aumento de los BFU-e y CFU-e (CD71⁺/Ter119⁻), y de pro-eritroblastos y eritroblastos tempranos (CD71⁺/Ter119⁺), los eritroblastos tardíos no mostraron diferencias (CD71⁻/Ter119⁺) (Figura 27A y 27B). Estos resultados concuerdan con la acción proliferativa de rEPO, en particular en las células BFU-e y CFU-e y la acción diferenciadora al aumentar los eritroblastos tempranos. Los eritroblastos tardíos probablemente disminuyeron ya que está acelerada su diferenciación y salida de la médula ósea como reticulocitos a la circulación. Al comparar el efecto crónico de rEPO entre ratones sanos y con ERC, se observó que los animales sanos aumentan en mayor medida las células tipo BFU-e y CFU-e que los animales con ERC (45,4% vs. 32,2%).

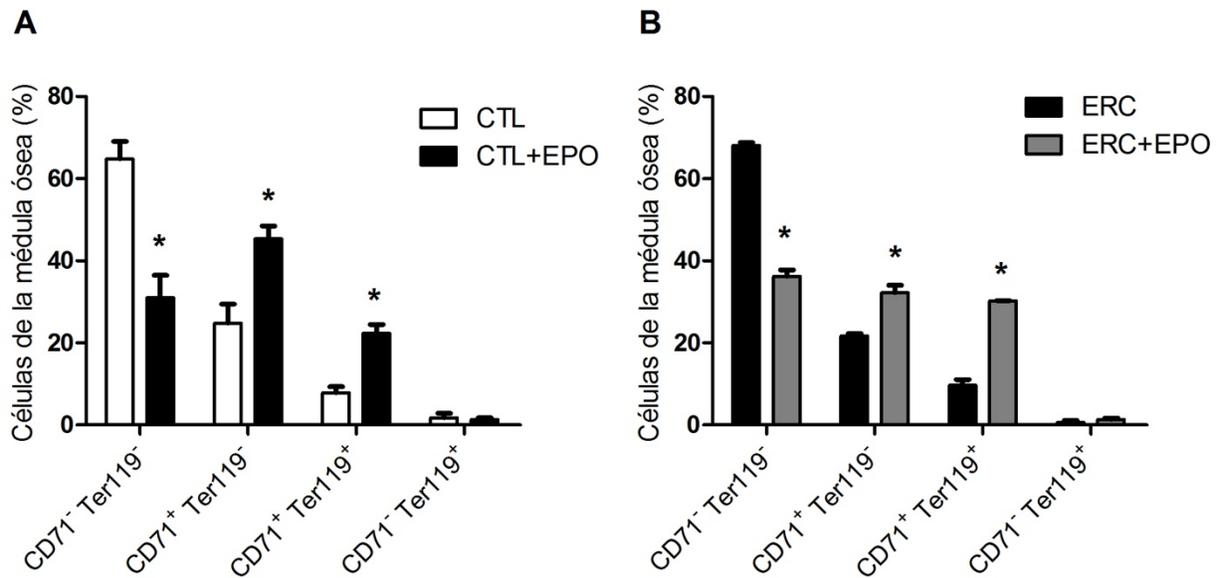


Figura 27: Efecto de la administración crónica de rEPO sobre la composición de células eritropoyéticas de la médula ósea en ratones control y con ERC. Células de la médula ósea de ratones sanos y con ERC y con administración crónica de rEPO (5.000 UI/Kg 3 veces a la semana por 2 semanas) fueron aisladas y teñidas con los marcadores anti-CD71-PE-Cy7 y anti-Ter119-PE para análisis por citometría de flujo. (A) Porcentaje de tipos celulares de la médula ósea en ratones sanos y ratones sanos con tratamiento crónico de rEPO. (B) Porcentaje de tipos celulares de la médula ósea en ratones con ERC y ratones ERC con tratamiento crónico de rEPO. n=4-5, * $P < 0,05$ vs. control o ERC sin rEPO.

IX. DISCUSIÓN

Los resultados más relevantes de esta tesis son que *in vitro* rEPO induce la expresión de FGF23 directamente desde las células de médula ósea vía activación del receptor homodimérico de eritropoyetina (EPOR-EPOR) y en forma dependiente de la vía de señalización intracelular que lleva a la activación del factor de transcripción STAT5. El suministro de rEPO a ratones sanos o ERC produce el aumento en la expresión y secreción de FGF23 desde la médula ósea, junto con modular la expresión de las enzimas que procesan la proteína FGF23 a nivel intracelular, GalNT3 y Fam20C. Además, dos modelos experimentales de ERC mostraron un aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea, mostrando que éste tejido también contribuye al aumento de los niveles de FGF23 plasmáticos observados en esta enfermedad. Finalmente, el suministro crónico de rEPO fue efectivo, en cuanto a lograr aumento del hematocrito y hemoglobinemia tanto en ratones sanos como en ratones ERC. Sin embargo, aunque esta respuesta general se observa con función renal normal o disminuida, el patrón y la magnitud de la respuesta muestran características diferenciales, asociadas a cambios también diferenciales en la composición de los grupos de células progenitoras y precursoras eritropoyéticas de la médula ósea.

Vía de señalización que rEPO induce la expresión de FGF23 en la médula ósea.

FGF23 es una hormona peptídica clásicamente sintetizada por osteocitos y osteoblastos. Se han identificados potenciales reguladores de la expresión de FGF23 entre ellos vitamina D, dieta alta en fosfato, deficiencia de hierro, factores inflamatorios y hormona paratiroidea (PTH), recientemente nuestro grupo reportó otro regulador de la expresión de FGF23: eritropoyetina (EPO)⁷⁵. El mecanismo celular por el cual rEPO induce la expresión de FGF23 es desconocido, por lo que, en esta tesis se estudiaron los mecanismos celulares involucrados en el aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea.

Nuestros resultados muestran que rEPO estimula directamente la expresión de FGF23 en las células de la médula ósea. Estos resultados correlacionan con las

publicaciones de Rabadi *et al*, 2018⁵⁵ y Clinkenbeard *et al.*, 2017⁵⁶, donde ambos grupos determinaron el efecto de EPO sobre la expresión de FGF23, pero sin dilucidar el tipo de receptor o la vía intracelular involucrada. Nuestros resultados también mostraron que el antagonismo del receptor homodimérico bloqueó por completo la expresión y la secreción de FGF23 en cultivo, indicando que rEPO utiliza el receptor clásico de alta afinidad homodimérico (EPOR-EPOR). Este receptor está presente en las células de la médula ósea⁵⁷, con expresión exclusiva en células eritroides⁵⁸. Además del receptor homodimérico existe un receptor de baja afinidad para eritropoyetina formado por el heterodímero EPOR-CD131. A diferencia del dímero EPOR-EPOR, la expresión de EPOR-CD131 no se limita a la médula ósea y es expresado en diversos tejidos. Nuestros resultados mostraron que el aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea no está determinado por EPOR-CD131, ya que la presencia de un agonista específico no indujo cambios en la expresión de FGF23.

Los resultados de los estudios de explantes de la médula ósea mostraron que la incubación en presencia de rEPO y la consecuente activación del receptor homodimérico de EPO induce fosforilación de STAT5, pero no produce cambios significativos de la actividad ERK1/2. Estudios en células Ba/F3 con sobreexpresión del receptor de EPO observaron inducción de la vía STAT5 al ser incubadas con 5 UI/mL de EPO mientras que la vía ERK1/2 solo presentó una leve inducción. En éstas mismas células se observó activación de ERK1/2 solamente a una dosis máxima de 40 UI/mL⁵⁹. Nuestros resultados fueron obtenidos utilizando concentraciones de rEPO 5 UI/mL, en que sólo logramos activación de la vía STAT5, lo que fue suficiente para que se indujera además la expresión de FGF23. Es importante considerar que los explantes utilizados en nuestros estudios son una mezcla de células medulares. Sin embargo, nuestros estudios previos utilizando cultivos de células madre de cordón umbilical humano (CD34⁺) y un protocolo de diferenciación eritropoyética *in vitro*, mostró que los tipos celulares que expresan FGF23 en la médula ósea son las células BFU-e y CFU-e⁷⁵. EPOR se expresa principalmente las células del tipo BFU-e, CFU-e, que representan cerca del 20% de la médula ósea, y en los eritroblastos en forma decreciente a medida que avanza la diferenciación eritroide. Por ende, la ausencia de activación significativa de la vía ERK1/2 en nuestros estudios puede reflejar la baja

razón señal/ruido^{60, 61}. Además, en nuestra preparación fue imposible detectar expresión de AKT. Otros estudios han mostrado la activación de la vía AKT por EPO; sin embargo, estos estudios han usado líneas celulares, tales como SKT6 y UT-7 con sobreexpresión del receptor de EPO, o preparaciones de médula ósea enriquecidas de células BFU-e y CFU-e a partir de selección usando marcadores específicos^{62, 63}. Estos factores podrían también explicar la aparente discordancia de nuestros resultados con los estudios mencionados.

Para determinar cuál vía de señalización era la implicada en la inducción de la expresión de FGF23 en la médula ósea utilizamos inhibidores farmacológicos específicos para cada una de las vías. Consistente con los resultados de estudios de señalización, observamos que la expresión de FGF23 en respuesta a rEPO era dependiente sólo de la activación de la vía STAT5. En precursores eritroides, la activación de STAT5 es necesaria para la inhibición de la apoptosis y la mantención de una población estable de precursores⁶⁴. Actualmente se están estudiando fármacos inhibidores de STAT5 como tratamiento para leucemia⁶⁵, por lo que estudios adicionales podrían utilizar estos mismos inhibidores para evaluar si rEPO es capaz de causar el alza aguda de la expresión y secreción de FGF23 desde la médula ósea, y su relación con la abundancia de los grupos de células eritropoyéticas medulares.

Efecto de la administración aguda de rEPO en animales sanos y con ERC.

Es bien sabido que en ERC los niveles plasmáticos de FGF23 aumentan en forma exponencial a medida que progresa esta enfermedad. Los niveles plasmáticos de FGF23 se elevan de forma temprana y son proporcionales a la caída de la velocidad de filtración glomerular. Previamente, nuestro laboratorio determino que el FGF23 presentaba depuración renal, medida como una gradiente del 20% arterio-venosa renal⁷⁵. Sin embargo, en la ERCT los niveles plasmáticos de FGF23 se elevan exponencialmente alcanzando hasta 5 órdenes de magnitud con respecto a individuos con función renal normal. Por lo tanto, los niveles plasmáticos de FGF23 en ERCT no se explicarían solamente por la pérdida de depuración renal. FGF23 es también regulado por los niveles plasmáticos de PTH, 1,25-dihidroxitamina D3, fosfato y calcio,

sin embargo, los cambios de estos factores se producen posterior al alza de FGF23, por lo cual no explicarían el alza temprana observada en la ERC. Por otro lado, en etapas avanzadas de la ERC se ha postulado que la deficiencia de hierro y procesos inflamatorios podrían actuar como posibles reguladores de la expresión de FGF23. La ERC es una enfermedad con un importante componente inflamatorio, en el que citoquinas tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α se encuentran elevados⁷⁸. Estudios en ERC experimental han mostrado que la administración aguda de IL-1 β indujo una disminución del hierro plasmático y junto con esto un aumento de los niveles plasmáticos de FGF23⁷⁹, sin embargo, las magnitudes de cambio observadas no explicar satisfactoriamente el alza observada en la ERC, sugiriendo así que existirían otros reguladores. Por lo tanto, en base a nuestros estudios previos, en los que rEPO indujo la expresión de FGF23 en animales sanos y datos clínicos en que los pacientes que presentan ERCT presentan anemia y se les administra rEPO, nosotros sugerimos la hipótesis de que rEPO contribuiría al alza de FGF23 observada en la ERCT.

Previamente otros artículos han demostrado que el alza de los niveles plasmáticos de FGF23 en la ERC estaban asociados al aumento de su expresión en el hueso, específicamente en osteocitos y osteoblastos⁷⁶. En esta tesis demostramos que la médula ósea contribuye también al aumento de los niveles plasmáticos de FGF23 descritos en ERC. En el presente estudio, hemos demostrado el aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea en dos modelos experimentales de ERC: el modelo por nefropatía inducida por oxalato de calcio que se caracteriza por una disminución progresiva de la función renal al depositarse cristales de oxalato de calcio en el riñón, y el modelo de nefrectomía parcial 5/6 con pérdida de la función renal por pérdida de masa renal. La posibilidad de la existencia de otro tejido productor de FGF23 fue planteada en un estudio reciente que mostró que la deleción tejido específica de FGF23 en osteocitos y osteoblastos disminuye los niveles plasmáticos de FGF23, pero no logra normalizar los niveles de FGF23 a los de un animal sano⁷⁷, por lo que nuestros estudios harían una contribución en esta área. A modo de poder explicar el aumento de expresión de FGF23 en la médula ósea y debido a que nuestros estudios demostraron que EPO induce la expresión de FGF23, analizamos si la EPO endógena o su receptor (EPOR) de nuestros animales con ERC estaban aumentados. Encontramos que los

niveles plasmáticos de EPO en la ERC son iguales a los encontrados en los animales sanos, sin embargo, existe un aumento de la expresión del EPOR en la médula ósea, lo que se asociaría a una mayor expresión de FGF23. En resumen, encontramos expresión de FGF23 en la médula ósea de animales sanos y con ERC. En esta última condición encontramos un aumento de los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23, que es característico de la ERC, nuestros estudios demostraron por primera vez que la médula ósea es un tejido que contribuye al alza de los niveles plasmáticos de FGF23 en la ERC y además en éste tejido se encuentra la maquinaria enzimática para procesar y secretar FGF23, que son las enzimas GalNT3 y Fam20C (Figura 28).

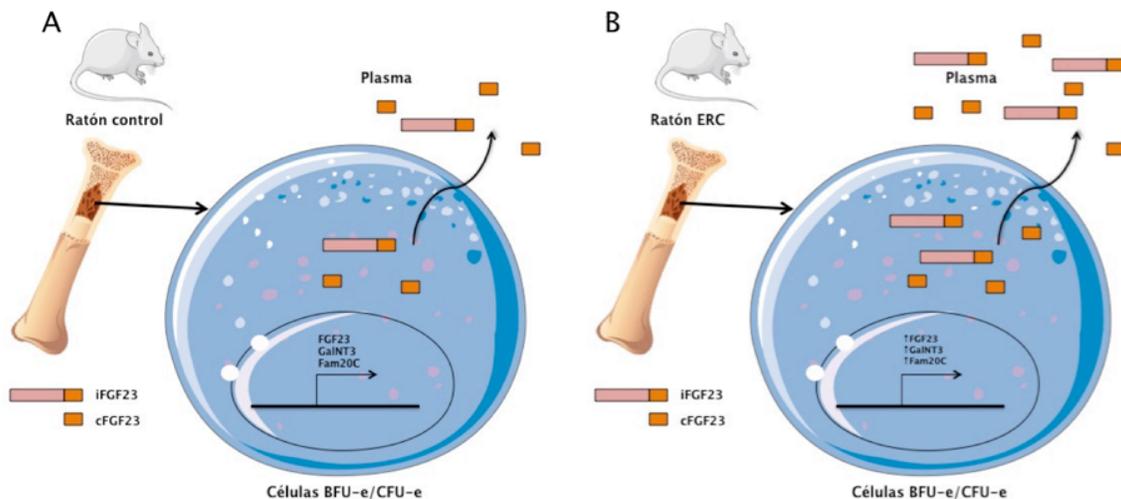


Figura 28. Esquema representativo de la expresión de FGF23 en animales sanos y con ERC. A. Los animales sanos expresan FGF23 en las células de la médula ósea (BFU-e y CFU-e) y además las enzimas GalNT3 y Fam20C. B. En la ERC existe un aumento de expresión del transcrito de FGF23 y de las enzimas GalNT3 y Fam20C en las células de la médula ósea produciendo un aumento de los niveles circulante de iFGF23 y cFGF23.

Posteriormente, analizamos la administración aguda de rEPO. En animales sanos rEPO produjo un aumento rápido de la abundancia del mRNA de FGF23 en la

médula ósea. Junto con ello, se observó un aumento de los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23 (Figura 29). Estos cambios fueron transitorios, donde se normalizaron a las condiciones basales de niveles de expresión del transcrito y abundancia plasmática a las 48 horas post administración de rEPO. El aumento de la [FGF23]_P que observamos en este trabajo concuerda con nuestros estudios previos⁷⁵. Además, resultados de estudios recientes en pacientes con función renal normal y con anemia muestran el efecto rápido de la inyección de rEPO, estos estudios también concuerdan con lo observado en esta tesis, donde en respuesta a rEPO se observó un aumento rápido de los niveles plasmáticos de iFGF23 y cFGF23 entre las 12-18 horas post administración⁵⁶.

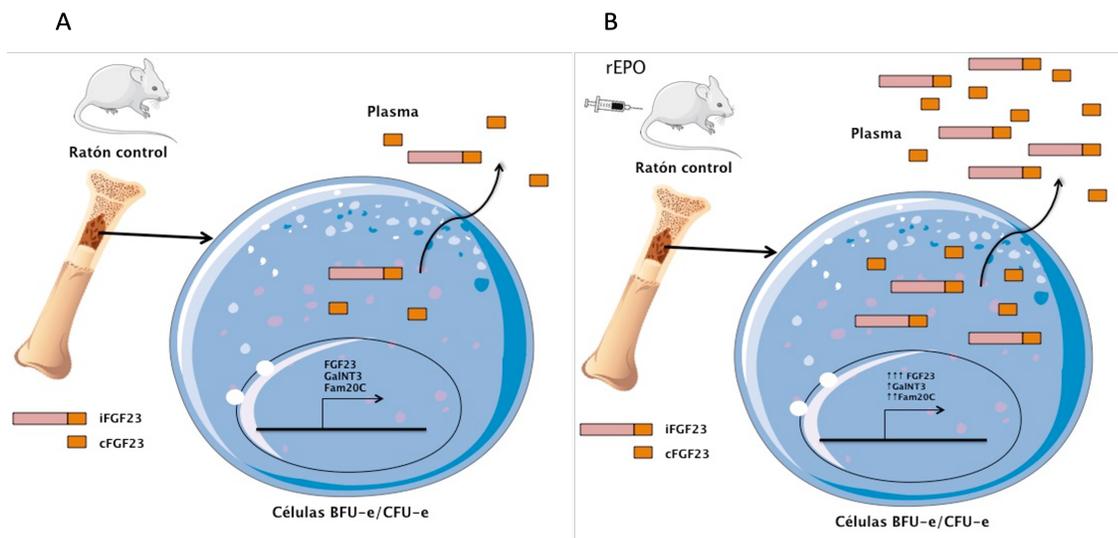


Figura 29. Esquema representativo del efecto agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en animales sanos. A. Los animales sanos expresan FGF23 en las células de la médula ósea (BFU-e y CFU-e) y además las enzimas GalNT3 y Fam20C. B. Luego del suministro de rEPO existe un aumento de expresión del transcrito de FGF23 y de las enzimas GalNT3 y Fam20C en las células de la médula ósea aumentando los niveles circulantes de iFGF23 y cFGF23.

Una vez analizado el efecto de rEPO en animales con función renal normal, comparamos el efecto agudo de rEPO en ratones ERC. En nuestro estudio, rEPO

aumentó la expresión del mRNA de FGF23 en la médula ósea de animales con ERC, de forma transiente. A diferencia de los animales sanos, rEPO indujo sólo un aumento de la expresión de FGF23 en la médula ósea a las 4 horas de sólo 11 veces con respecto al basal, observándose una respuesta medular disminuida respecto un animal con función renal normal. Por otro lado, al analizar los niveles plasmáticos de FGF23 en respuesta a rEPO en la ERC, observamos sólo aumento de los niveles plasmáticos de cFGF23. Por lo que a continuación analizamos el procesamiento de FGF23 (Figura 30).

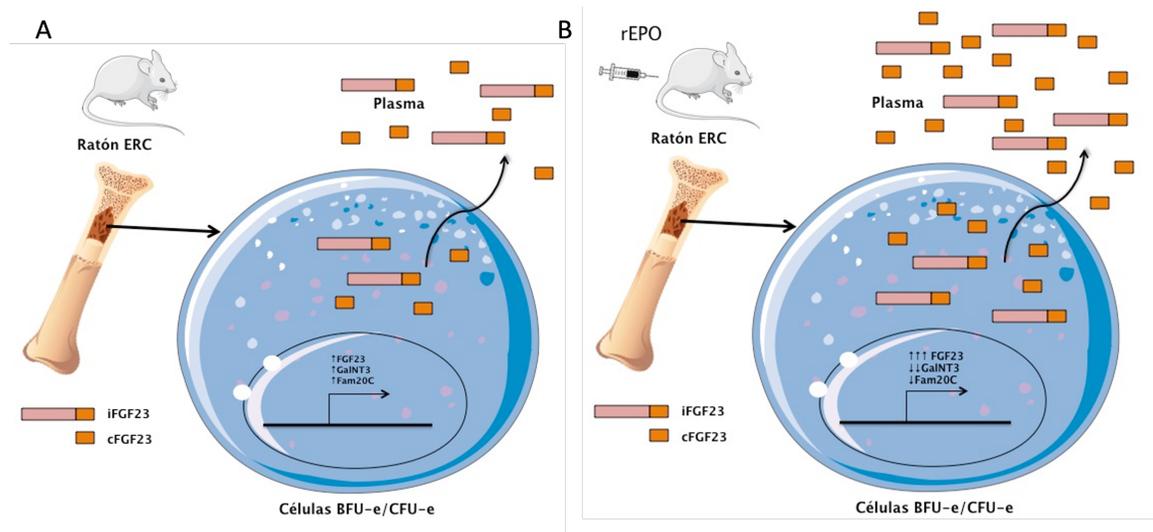


Figura 30. Esquema representativo del efecto agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en animales con ERC. A. Los animales sanos expresan FGF23 en las células de la médula ósea (BFU-e y CFU-e) y además las enzimas GalNT3 y Fam20C. B. Luego del suministro de rEPO existe un aumento de expresión del transcrito de FGF23 y de las enzimas GalNT3 y Fam20C en las células de la médula ósea, produciendo un aumento de los niveles circulante de iFGF23 y cFGF23.

A luz de las diferencias en los niveles plasmáticos de FGF23 observadas entre los animales sanos y ERC, analizamos las proteínas que regulan la secreción y el corte proteolítico de FGF23. Durante la maduración, FGF23 es O-glicosilado por GalNT3 en varios sitios cercanos a Ser180⁶⁶, esta glicosilación protege a la proteína de FGF23 de la proteólisis y facilita su secreción, por lo tanto, un aumento de la expresión/actividad de esta enzima se correlacionaría con un aumento de los niveles plasmáticos de iFGF23. Esto es evidente en la calcinosis tumoral familiar hiperfosfatemica, donde la pérdida de función de ésta proteína se relaciona con una disminución de iFGF23, aumento de la reabsorción renal de fosfato y presencia de hiperfosfemia⁶⁷. Además de la O-

glicosilación existe fosforilación en Ser180 por la proteína quinasa *family with sequence similarity 20, member C* (Fam20C), que es una enzima constitutiva en el Golgi y puede ser secretada al plasma. Esta quinasa fosforila proteínas secretas en los motivos Ser-X-Glu/pSer. Esta fosforilación induce el corte proteolítico de FGF23 por furina tanto citoplasmáticas y extracelulares y por lo tanto, un aumento de los niveles plasmáticos de cFGF23. La pérdida de función de esta quinasa causa el síndrome de Raine, que se caracteriza por hipofosfatemia asociada a aumentos plasmáticos de iFGF23⁶⁸. Por lo tanto, la regulación de la expresión/actividad de ambas enzimas regularía los niveles plasmáticos de FGF23 y la forma predominante que aparecen en el plasma.

Expresión de ambas enzimas fue detectada en la médula ósea en donde los animales ERC mostraron mayores niveles de expresión con respecto a los animales sanos (Figura 28). El aumento de expresión de estas enzimas en la médula ósea de animales ERC, se correlaciona con el aumento de la expresión y secreción de ambos tipos de FGF23 en la ERC. Esto implica que en el contexto de esta enfermedad el aumento de la expresión de FGF23 se induciría en forma paralela a un aumento en la maquinaria de procesamiento de la proteína. Estudios posteriores deberán analizar la causa de la inducción de FGF23 en la médula ósea, su efecto hematológico e implicancias para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.

Además, describimos que al igual que FGF23, las enzimas que determinan su procesamiento son reguladas por rEPO. En los animales sanos en respuesta a una dosis aguda de rEPO se observó un aumento rápido de Fam20C, lo que se relaciona con un aumento rápido de los niveles plasmáticos de la forma cFGF23 y de mayor magnitud que la forma iFGF23. Esta observación entrega por primera vez un mecanismo de regulación de la expresión de Fam20C en algún tejido. Desde el punto de vista de GalNT3, también se observó un aumento de la expresión en la médula ósea en respuesta a rEPO, pero con un cambio relativo menor a lo observado con Fam20C. La relación de expresión de ambas enzimas explicarían el alza menor de la forma iFGF23 en el plasma en los animales sanos (Figura 29).

El aumento de expresión de Fam20C podría afectar no sólo la fosforilación de FGF23 sino que de otras proteínas fosforiladas que son secretadas y que tienen acción

biológica, como por ejemplo, osteopontina (OPN), una proteína secretada que es fosforilada directamente por Fam20C y que ha sido ampliamente estudiada en la calcificación vascular asociada a la ERC⁶⁹. Los niveles de fosforilación de OPN determinan su actividad, donde a mayor grado de fosforilación sería inhibitorio de la calcificación en los sitios de las placas arterioscleróticas⁷⁰. Por otro lado, la activación de FGFR1, principal receptor de FGF23, estimula la expresión de OPN directamente en las células de músculo liso vascular⁷¹. Esto sugiere que la administración de rEPO en la ERC, a través de su efecto en la médula ósea, podría contribuir a la calcificación vascular.

En animales con ERC también observamos que la administración de rEPO regula la expresión de ambas enzimas, pero de forma antagónica a lo observado en los animales sanos. Basalmente los animales con ERC tienen mayor expresión de ambas enzimas *versus* un animal sano. Luego post administración de rEPO se observó una inhibición de la expresión de ambas enzimas, donde la expresión relativa de GalNT3 fue igual a los animales sanos. Por otro lado, Fam20c también tuvo una regulación negativa de su expresión que se mantuvo aún así más alta que los animales sanos. Estos cambios en los niveles de expresión de ambas enzimas explicarían un aumento de sólo la forma cFGF23 en la ERC en respuesta a rEPO, ya que estaría presente el efecto de Fam20C por sobre el de GalNT3 y con el ello el corte proteolítico estaría favorecido. Los cambios de expresión de ambas enzimas que regulan el procesamiento de FGF23 en respuesta a rEPO nos entregan una aproximación que debe ser comprobada con ensayos *in vitro* de actividad de ambas enzimas y análisis de expresión de la proteína FGF23 intacta o clivada.

Nuestros resultados muestran que existe una regulación de los niveles de FGF23 en respuesta a rEPO, en ambos animales. Tanto animales sanos como con ERC se observaron que en respuesta a rEPO ocurre un aumento mayor de los niveles de cFGF23 respecto a iFGF23. Al realizar la razón iFGF23/cFGF23 se observó que la razón disminuyó rápidamente en respuesta a rEPO, llegando a un cuarto de los valores iniciales a las 2 horas y estos valores se mantuvieron hasta las 24 horas. De esta forma, el aumento mayor de los niveles de cFGF23 podría asociarse un mecanismo de auto-inhibición de los receptores FGFR1 y FGFR3 que requieren como cofactor Klotho,

ya que ha sido reportado que la administración del fragmento C-terminal de FGF23 (180-205) actúa con antagonista de los receptores que requieren Klotho ya que inhibe la formación del complejo FGF23-FGFR-Klotho⁷². De esta forma, el aumento de iFGF23 en respuesta a rEPO en animales sanos o su mayor abundancia en la ERC podría estar asociado a un aumento de la actividad de receptores independientes de Klotho como el FGFR4 y con ello presentarse algunos efectos patológicos como la hipertrofia cardíaca.

Efecto de la administración crónica de rEPO en animales sanos y con ERC.

Los niveles plasmáticos de FGF23 se incrementan exponencialmente a medida que disminuye la función renal y su mayor alza se observa en la etapa 5, cuando los pacientes comienzan con la terapia de reemplazo renal (dialisis). Junto a esto, los pacientes ERC presentan anemia. La administración de rEPO en pacientes con enfermedad renal crónica adultos se sugiere a partir de una concentración de Hb menor a 10 g/dL, y en ERC etapa 5 se debe evitar caídas de Hb menor a 9 g/dL. El blanco terapéutico de la terapia de mantenimiento es de valores que no superen los 11,5 g/dL⁷³. Por ello y en base a los resultados de este trabajo, nos pareció esperable que el tratamiento crónico con rEPO pudiera causar un aumento de la [FGF23]_P debido a su mayor expresión y secreción desde la médula ósea.

Para evaluar esta hipótesis, en el presente estudio analizamos el efecto de la administración crónica de rEPO en animales con función renal normal y con ERC. En animales sanos encontramos que rEPO indujo un aumento de la expresión del transcrito y proteína de FGF23 en la médula ósea. Sin embargo, los niveles plasmáticos tanto de la forma iFGF23 como cFGF23 se encontraron similares a los animales control (inyección de vehículo) después de 2 semanas de tratamiento (Figura 31). Este resultado confirma que, en animales con función renal conservada, el efecto de rEPO es agudo y transiente. La posible discondancia entre el alza del transcrito y proteína en la médula ósea, pero no plasmática se puede explicar en parte por el aumento de células productoras de FGF23, BFU-e y CFU-e observados en los análisis de citometría. Entonces, hay una mayor masa o proporción de células que producen

FGF23 que los animales sin rEPO. Considerando que en nuestro estudio para evitar el posible efecto agudo, la última dosis de rEPO fue suministrada 72 horas antes del sacrificio de los animales, queda por analizar si el FGF23 secretado frente a dosis crónicas de rEPO muestra aumentos transitorios, y si el tratamiento con rEPO modifica la vida media de FGF23 en el plasma. Es de esperar que al existir un aumento de las células productoras de FGF23 en la médula ósea luego del tratamiento crónico de rEPO, una dosis aguda en esta situación induzca un alza aún mayor en la expresión del transcrito y los niveles plasmáticos de FGF23.

Consistente con los resultados que observamos en los ratones con función renal normal, la administración crónica de rEPO en ratones ERC tampoco produjo un aumento de los niveles plasmáticos de FGF23 ni de la forma iFGF23 o cFGF23. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los animales sanos, en la ERC no se observó una elevación del transcrito y proteína después del tratamiento con rEPO en forma crónica. Además, si bien ocurrió un aumento de la proporción de células BFU-e y CFU-e en los animales ERC tratados con rEPO respecto al grupo ERC control, este cambio fue menor a lo observado en los animales con función renal normal (Figura 31). Especulamos que la falta de aumento significativo de $[FGF23]_P$ en los animales ERC se puede explicar por una resistencia a la acción de rEPO como inductora de FGF23, que no fue suficiente para aumentar el transcrito y la proteína.

Los resultados de esta tesis mostraron que rEPO sí aumenta la expresión y secreción de FGF23 desde la médula ósea, pero sólo en forma aguda. Por esto es relevante el curso temporal post suministro de rEPO en que son analizados los experimentos en modelos animales e incluso en seres humanos. Por ahora en ratones, sabemos que el estímulo con rEPO indujo en pocas horas la expresión y secreción de FGF23, estudios en humanos también muestran un efecto agudo de rEPO sobre la expresión de FGF23 en forma temprana (12-18 horas)⁵⁶. Por lo que es relevante en este contexto el tiempo de tomas de muestras post rEPO. Estudios en paciente con ERC etapa 5 (dialisis) muestran gran variabilidad de los niveles plasmáticos⁷⁴, es posible que factores como la administración de rEPO a estos pacientes y la toma de muestra hayan influido en esa variabilidad. Por otro lado, observamos que rEPO si indujo un aumento de la población de células BFU-e y CFU-e en los animales con ERC

(Figura 31), entonces es necesario evaluar si este aumento de células productoras de FGF23 puede inducir cambios agudos mayores de FGF23 luego del suministro de rEPO. Además, estudios futuros deberán evaluar si la vía de señalización de rEPO se ve alterada en la ERC.

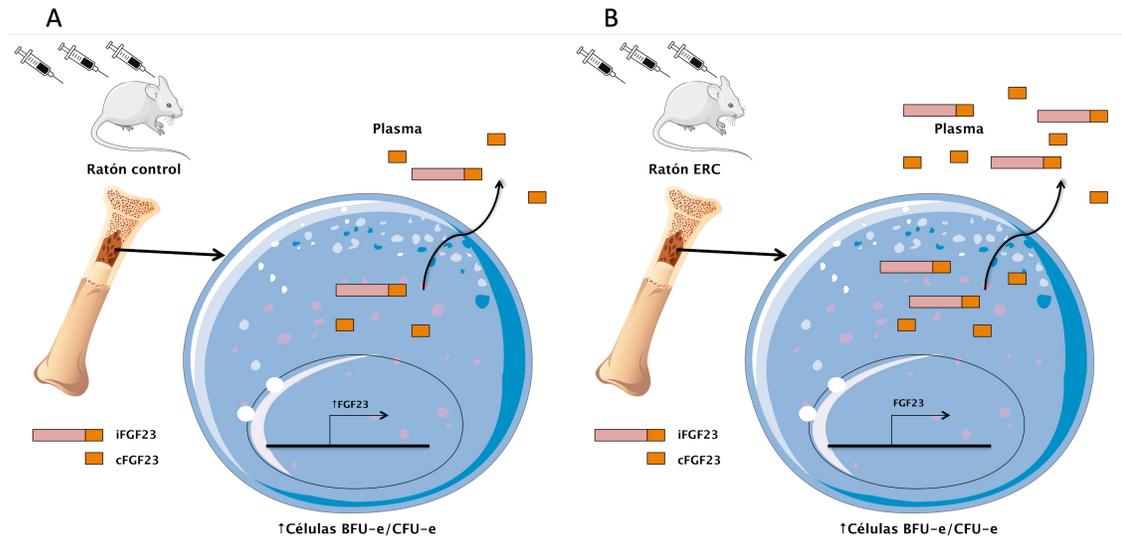


Figura 31. Esquema representativo del efecto crónico de rEPO sobre la expresión de FGF23 en animales con función renal normal y con ERC. Animales con función renal normal y con ERC recibieron rEPO por dos semanas, 3 veces a la semana. A. Los animales sanos expresan FGF23 en las células de la médula ósea (BFU-e y CFU-e), el tratamiento crónico indujo un leve aumento de la expresión de FGF23, pero sin cambios en los niveles plasmáticos respecto a un animal sano sin rEPO. B. Los animales con ERC expresan FGF23 en las células de la médula ósea (BFU-e y CFU-e), el tratamiento crónico no produjo cambios en la expresión de FGF23, ni cambios en los niveles plasmáticos respecto a un animal con ERC sin rEPO. Ambos tipos de animales aumentaron la proporción de células BFU-e y CFU-e luego del tratamiento con rEPO.

X. CONCLUSIONES

Esta tesis describió el mecanismo celular por el cual rEPO induce la expresión de FGF23 en las células de la médula ósea. Se determinó que los progenitores eritroides BFU-e y CFU-e son los que expresan FGF23 en respuesta a rEPO. La activación del receptor homodimérico de EPO induce la expresión del transcrito de FGF23 en forma dependiente de la activación de la vía de señalización intracelular STAT5. Además, se determinó que rEPO regula la expresión de enzimas que son parte de la maquinaria de biosíntesis y secreción de FGF23.

In vivo, la médula ósea contribuye a los niveles plasmáticos de FGF23 en la ERC. Además, rEPO indujo la expresión de FGF23 en las células de la médula ósea tanto en animales sanos como con ERC. Esta inducción fue transitoria luego de una inyección aguda de rEPO. De forma crónica la administración de rEPO no indujo cambio en los niveles plasmáticos de FGF23 en animales sanos o con ERC.

XI. METODOLOGÍA

Aislamiento de las células de la médula ósea.

Los fémures y tibias de ratón fueron cosechados en condiciones estériles y se cortaron las epífisis de cada hueso. La médula ósea se enjuagó usando una jeringa de 1 mL con una aguja de calibre G26 rellena con medio RPMI-1640 suplementado con 0,2% albumina de suero bovino. Las resuspensiones de células se hicieron pipeteando repetidamente y pasando a través de un colador de células de 70 μm . Las células se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se lavó con medio RPMI-1640. Los glóbulos rojos se lisaron resuspendiendo el pellet de células en 1 mL de buffer de lisis ACK durante 1 minuto, luego se lavaron con medio de cultivo dos veces, centrifugando y resuspendiendo en medio.

Cultivo de explantes de médula ósea.

Se resuspendieron células de médula ósea recién aisladas en medio RPMI-1640 a una concentración de 10^7 células/mL y se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (1 mL/pocillo). Las células se dejaron reposar durante 30 minutos antes de iniciar los diferentes tratamientos con fármacos. El antagonista de EPOR-EPOR, EMP9 (GGTYSCHFAPLWVCKPQGG-Amidado puente disulfuro, PepMic Co., Ltd. Suzhou, PR China) se añadió 15 minutos antes de administrar rEPO para permitir el bloqueo del receptor. Se añadió rEPO 5 UI/mL a las células en presencia o ausencia de EMP9 500 nM y se incubaron durante un período de 2 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%/O₂ al 95%. Después del tratamiento, el RNA total se aisló para el análisis de expresión génica. Con el objetivo de evaluar un posible papel del receptor heterodimérico EPOR/CD131 en la regulación de FGF23 se usó el agonista específico de este receptor, ARA290 500 nM (Ácido piroglutamico-EQLERALNSS, PepMic Co., Ltd. Suzhou, PR China). Para determinar las vías de señalización involucradas en la regulación de FGF23 por rEPO se usaron inhibidores farmacológicos específicos (detallados en la Tabla 1) contra proteínas de cada una de las vías de señalización conocidas para el receptor de EPO (PI3K/Akt, MAPK y STAT5).

Tabla 1: Inhibidores farmacológicos de las vías de señalización.

Proteína Blanco	Inhibidor	IC ₅₀	Concentración usada	Referencia
STAT5	N'-((4-Oxo-4H-chromen-3yl)methylene)nicotinohydrazide	47 µM	200 µM	Merck Millipore
MEK	PD0325901	0,33 nM	100 nM	Selleckchem
AKT	Afuresertib	2,6 nM	10 µM	Selleckchem

Animales

Se utilizaron ratones machos C57BL/6, de peso inicial de 20-25 grs., que fueron 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 aprobado al Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile CBA FMUCH # 0988 (adjunto).

Modelos experimentales de enfermedad renal crónica (ERC) en ratones.

ERC por Nefrectomía 5/6.

Se realizó nefrectomía 5/6 (NPX5/6) en 2 etapas, como hemos descrito previamente (Michea et al., 2008). Los ratones fueron anestesiados con anestesia inhalatoria

(isofluorano 2%/oxígeno) durante toda la intervención. Se realizó nefrectomía 2/3 del riñón izquierdo mediante decapsulación cefálica y caudal, ligadura de los polos y extracción quirúrgica. Después de 7 días se extrajo el riñón derecho mediante ligadura del pedículo renal (arteria y vena renal) y nefrectomía teniendo cuidado de no lesionar la glándula adrenal.

ERC inducida por oxalato

Se preparó una dieta de oxalato añadiendo 50 μmol de oxalato sódico por gramo de dieta estándar libre de calcio (Dyets Inc. Calcium Free AIN-76 #200150). La eliminación del calcio de la dieta aumenta la cantidad de oxalato soluble disponible para la absorción. Se administró una dieta libre de oxalato y calcio (dieta control) durante 3 días para eliminar cualquier calcio intestinal residual antes de cambiar a una dieta de alto oxalato soluble. La dieta con alto oxalato se mantuvo por 14-21 días con extracción de plasma cada 7 días de tratamiento para determinar hematocrito y parámetros de función renal. Los animales que presentaron un BUN elevado fueron cambiados a dieta de mantención normal (LabDiet, 5P00, Prolab RMH 3000) durante 7 días adicionales luego del periodo de alimentación con dieta con alto oxalato, donde se determinó hematocrito y parámetros de función para asegurar un fenotipo ERC. Los animales que presentaron un nitrógeno ureico sobre 100 mg/dL y anemia fueron incluidos en este estudio.

Grupos experimentales.

Estudio del tratamiento agudo con rEPO en NPX5/6.

Tratamiento agudo: luego de la segunda operación, los animales se mantuvieron durante 4 semanas en condiciones estándar, concluido este tiempo se inyectó una dosis de rEPO (Recormon™, ROCHE, 5000 UI/Kg) mediante inyección subcutánea (s.c.) o vehículo (NaCl 0,9%).

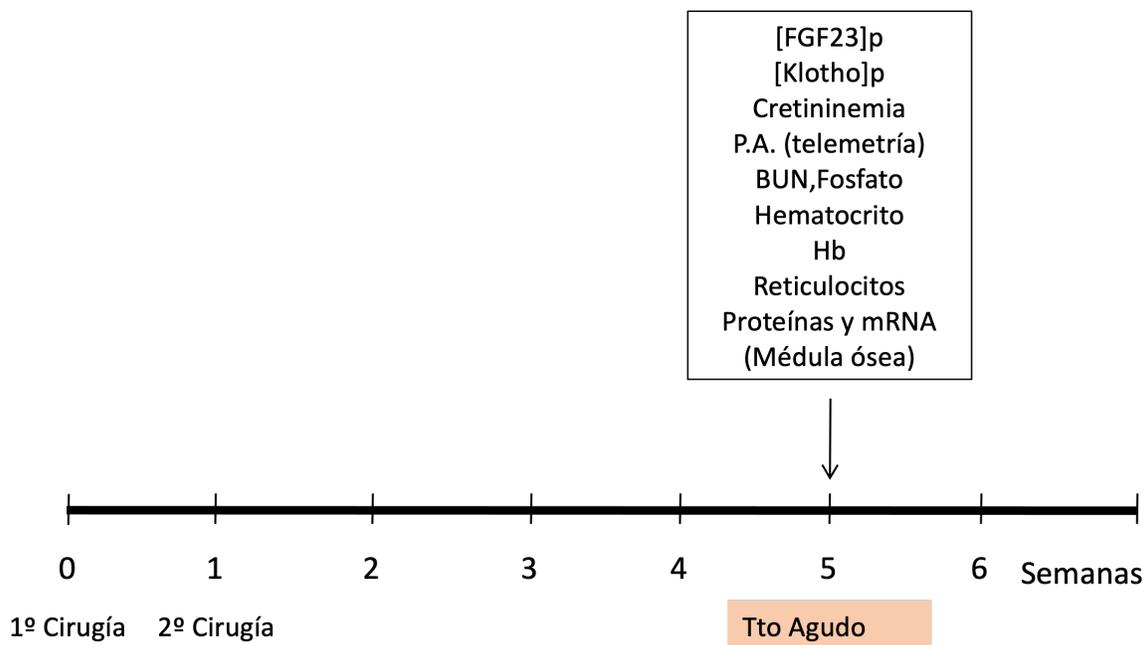


Figura 32. Esquema representativo de experimentación del modelo experimental ERC 5/6.

Se dividirá el estudio en tratamiento agudo y crónico con rEPO modelo ERC Oxalato.

Luego de los 7 días de dieta normal post 14 días de oxalato los animales se dividieron en 2 grupos (rEPO o vehiculo) donde se inyectó rEPO (Recormon™, ROCHE) (5.000 UI/Kg peso corporal) mediante inyección subcutánea (s.c.) o vehiculo (NaCl 0,9%) respectivamente. Adicionalmente, se analizaron los grupos Sham (rEPO o vehiculo).

Tratamiento crónico: luego de los 7 días de dieta normal post oxalato los animales se dividieron en los siguientes grupos: SHAM más vehiculo, SHAM más rEPO, ERC más vehiculo, ERC más rEPO. La rEPO (5000 IU/Kg peso corporal, s.c.) o vehiculo (NaCl 0,9%) se inyectó 3 veces a la semana.

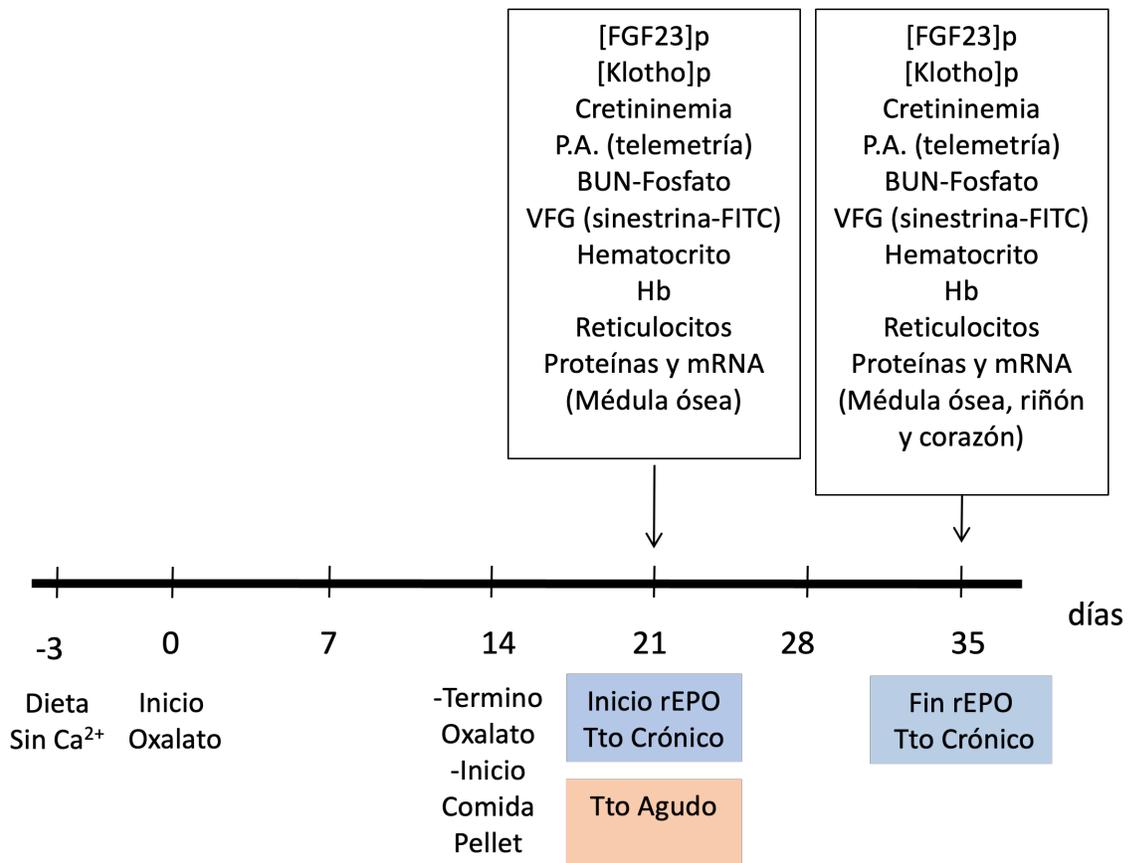


Figura 33. Esquema representativo de experimentación del modelo experimental ERC Oxalato.

Determinaciones en plasma

Al finalizar el periodo experimental los animales fueron anestesiados y se realizó la extracción de sangre de la vena cava para obtención de plasma. La muestra se utilizó para determinaciones de nitrógeno ureico (BUN), fosfato y potasio plasmático, FGF23 C-terminal mediante un kit de ELISA comercial (Immutopics, Athens, OH, Cat#60-6300 para cFGF23), y FGF23 intacto mediante un kit de ELISA comercial (Immutopics, Athens, OH, Cat#60-6800 para iFGF23), EPO mediante kit de ELISA BioLegend Max™ Mouse eritropoyetina (EPO) BL.442707.

Extracción de RNA de células de médula ósea.

Se extrajo RNA total de muestra de células de médula ósea a 4°C a partir aproximadamente 2 mm² de tejido recién extraído del animal o 1 pocillo de una placa de 24 pocillos con aproximadamente 1 millón de células, en 1 mL de TRIzol (Michea et al., 2008). Las muestras se trataron por 30 minutos a 37°C con DNasa I (*DNA-free*[™], Ambion Applied BioSystems, Waltham, MA USA) para eliminar eventual contaminación con DNA genómico. La cuantificación del RNA se realizó por el método fluorométrico Quant-iT[™] Assay (Invitrogen, Waltham, MA USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Transcripción Reversa.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR *Improm-II*[™] *Reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), utilizando 0,2 µg de RNA total como templado, de acuerdo a instrucciones del fabricante (Michea et al., 2008). El cDNA obtenido será utilizado como templado en reacciones de polimerasa en cadena cuantitativas (qPCR).

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.* (Coralville, Iowa, USA).

Tabla 2. Secuencias de partidores Sense y Asense.

<i>Target</i>	Partidor <i>Sense</i> 5´- 3´	Partidor <i>Asense</i> 5´- 3´
18S	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	GCT GGA ATT ACC GCG GCT
Pim1	TTC GGC TCG GTC TAC TCT GG	GGC TCC TCG TTC GGT GAT AA
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
EPOR	CCA GCT CTA AGC TCC TGT GC	CTTCAG GTG AGG TGG AGT GG
FAM20C	GCG CTT TGC ACA TTG CTG TT	AGA GGC TGG ATC TGA GCT GAA
GALNT3	CGC TCA CGT TCT TAG ATG CTC	TAT CCT GGC CAG CAG AGG
Klotho	TGA CAA CTA CGT TCA AGT GGA CA	GCC GGA TGG CAG AGA AAT CA

PCR en tiempo real.

El qPCR fue realizado en un termociclador Applied BioSystems StepOne, usando el 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, Madison, WI, USA).

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 expresarán como la razón del transcrito de interés/18S.

Extracción de proteínas

Se prepararon extractos de proteínas totales a partir de los tejidos de interés mediante homogenizado en Lysing Matrix D Tube (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), 4°C, tampón sacarosa con inhibidores de proteasas (ROCHE) y fosfatasas (ROCHE).

Luego, el homogenado fue centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C (*Centrifuge 5415R*, Eppendorf). El sobrenadante obtenido se guardó alicuotado a -20°C hasta su utilización.

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), ERK total, pERK, AKT total, pAKT, STAT5 total, pSTAT5 (Cell Signaling, Technology) diluido en TTBS más BSA al 5% (dilución 1:1000). 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 quimioluminiscencia 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.

Análisis de citometría de flujo de células de médula ósea y células progenitoras hematopoyéticas.

Las células de médula ósea 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 PE-Cy7 y rat anti-mouse TER119 conjugado con PE (ambos BD Biosciences) en PBS/BSA al 0,5% durante 20 min a 4°C. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,5% y se analizó la expresión superficial de las proteínas. Para el análisis fenotípico por citometría de flujo, se resuspendieron 2

$\times 10^6$ células en 80 μL de PBS/BSA al 0,5%. Las células se resuspendieron en 0,3 mL de PBS/BSA al 0,5% y se analizaron dentro de 1 hora después de la tinción usando el software BD FACSDiva en un citómetro de flujo BD FACS-Cantoll (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Se recolectaron 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 fueron usadas como control negativo para cada canal de fluorescencia.

Análisis estadístico.

Determinación del número de animales: se estudiaron variables continuas como: Parámetros hematológicos, parámetros de función renal, y daño en tejido blanco (variables de daño de tejido blanco pueden ser estudiadas juntas). Se estudiaron 4 grupos de animales (Control, control+rEPO, ERC y ERC+rEPO). Para el estudio de cada variable se requirieron los 2 grupos de animales mencionados anteriormente, uno para hacer el estudio agudo y otro para el estudio crónico de la administración de rEPO. Considerando: alfa = 0,05; poder = 0,8; asumiendo una desviación estándar del 20% en las variables de interés y esperando encontrar una diferencia entre grupos mayor o igual al 30% (respecto al grupo control) y considerando un 20% de pérdida, se necesitaron 7 animales por grupo. Por lo que se requirieron 168 ratones (4X2 grupos x 7 ratones por grupo x 3 variables = 168).

Los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar (ES) de los valores obtenidos en cada condición experimental. Para 2 muestras independientes se analizaron los resultados con test no paramétrico Mann-Whitney. Para 3 ó más muestras independientes los resultados se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con test a posteriori de Dunns. Se aceptó como nivel de significancia estadística un valor de $P < 0,05$.

XII. REFERENCIAS

1. Perico N, Remuzzi G. Chronic kidney disease: a research and public health priority. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;Suppl3:iii19-26.
2. Zoccali C, et al. FGF23: a mature renal and cardiovascular risk factor? *Blood Purif*. 2013;36(1):52-7.
3. Zuñiga C, et al. Prevalencia de enfermedad renal crónica en centros urbanos de atención primaria. *Rev Med Chile*. 2011;139:1176-84.
4. Tonelli M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: A systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2034-47.
5. Reinecke H, et al. Baseline characteristics and prescription patterns of standard drugs in patients with angiographically determined coronary artery disease and renal failure (CAD-REF registry). *PLoS One*. 2016;11(2):e0148057.
6. Havel M, et al. Prognostic value of myocardial perfusion imaging and coronary artery calcium measurements in patients with end-stage renal disease. *Hell J Nucl Med*. 2015;18(3):199-206.
7. Seifert ME, et al. Left ventricular mass progression despite stable blood pressure and kidney function in stage 3 chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2014;39(5):392-9.
8. Hu MC, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. *Ann Rev Physiol*. 2013;75:503-33.
9. Gattineni J, et al. 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*. 2011;301:F371-7.
10. Urakawa I, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770-4.
11. Kuro-o M. Klotho. *Pflugers Arch*. 2010;459(2):333-43.
12. Rotondi S, et al. Soluble α -klotho serum levels in chronic kidney disease. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:872193.
13. Alonso A, et al. Circulating fibroblast growth factor-23 and the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(5):e001082.

14. Arnlov J, et al. Serum FGF23 and risk of cardiovascular events in relation to mineral metabolism and cardiovascular pathology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(5):781-6.
15. Kestenbaum B, et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular disease in the general population: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Heart Fail*. 2014;7(3):409-17.
16. Lutsey P, et al. Fibroblast growth factor-23 and incident coronary heart disease, heart failure, and cardiovascular mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e000936.
17. Scialla JJ. Epidemiologic insights on the role of fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(3):260-7.
18. Wright CB, et al. Plasma FGF23 and the risk of stroke: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Neurology*. 2014;82(19):1700-6.
19. Babitt JL, et al. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1631-4.
20. Lutsey P, et al. Fibroblast growth factor-23 and incident coronary heart disease, heart failure, and cardiovascular mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e000936.
21. Nakano C, et al. Intact fibroblast growth factor 23 levels predict incident cardiovascular event before but not after the start of dialysis. *Bone*. 2012;50(6):1266-74.
22. Fliser D, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: The mild to moderate kidney disease (MMKD) study. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:2601-8.
23. Gutierrez OM, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis. *N Eng J Med*. 2008;359(6):584-92.
24. Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA*. 2011;305:2432–9.
25. Jean G, et al. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:2792–6.

26. Mirza MA, et al. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis*. 2009;205(2):385-90.
27. Faul C, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4393-408.
28. Di Marco GS, et al. Treatment of established left ventricular hypertrophy with fibroblast growth factor receptor blockade in an animal model of CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(11):2028–35.
29. Goodkin DA, Fuller DS, Robinson BM, Combe C, Fluck R, Mendelssohn D, et al. Naturally occurring higher hemoglobin concentration does not increase mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):358-65.
30. Grabner A, et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab*. 2015;22:1020–32.
31. Ix JH, et al. Fibroblast growth factor 23 and early decrements in kidney function: the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:993-7.
32. Farrow EG, et al. Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(46):E1146-55.
33. Wolf M, et al. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res*. 2013;28(8):1793-803.
34. Wolf M, White KE. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(4):411-9.
35. Van Breda F, et al. Relation between red cell distribution width and fibroblast growth factor 23 cleaving in patients with chronic kidney disease and heart failure. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128994.
36. McClellan W, et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin*. 2004;20(9):1501-10.
37. Drueke TB, et al. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2071–84.

38. Pfeffer MA, et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2019–32.
39. Singh AK, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2006;355:2085–98.
40. Solomon SD, et al. Erythropoietic response and outcomes in kidney disease and type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1146-55.
41. Szczech LA, et al. Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-alpha dose and achieved hemoglobin outcomes. *Kidney Int*. 2008;74(6):791–8.
42. Besarab A, et al. 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*. 1998;339:584–90.
43. Parfrey PS et al. Double-blind comparison of full and partial anemia correction in incident hemodialysis patients without symptomatic heart disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(7):2180–9.
44. Singh AK, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2006;355:2085–98.
45. Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(7):543-55.
46. Coe LM, et al. FGF-23 is a negative regulator of prenatal and postnatal erythropoiesis. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9795-810.
47. Hibi M, Hirano T. Signal transduction through cytokine receptors. *Int Rev Immunol*. 1998;17:75Y102.
48. Sigrist MK, Taal MW, Bungay P, McIntyre CW. Progressive vascular calcification over 2 years is associated with arterial stiffening and increased mortality in patients with stages 4 and 5 chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 Nov;2(6):1241-8.
49. Michea L, Villagrán A, Urzúa A, Kuntsmann S, Venegas P, Carrasco L, Gonzalez M, Marusic ET. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats. *Hypertension*. 2008 Aug;52(2):295-300.
50. Clejan S., Mallia C., Vinson D., Dotson R., Beckman B. Erythropoietin stimulates G-protein-coupled phospholipase D in haematopoietic target cells. 1996 *Biochem. J*. 314, 853-860.

51. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet.* 2000; 26:345–8.
52. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:6500–5.
53. Frishberg Y, Ito N, Rinat C, Yamazaki Y, Feinstein S, Urakawa I, et al. Hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome: a congenital disorder of O-glycosylation associated with augmented processing of fibroblast growth factor 23. *J Bone Miner Res.* 2007; 22:235–42.
54. Tagliabracci VS, Engel JL, Wiley SE, Xiao J, Gonzalez DJ, Nidumanda Appaiah H, et al. Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:5520–5.
55. Rabadi S, Udo I, Leaf DE, Waikar SS, Christov M. Acute blood loss stimulates fibroblast growth factor 23 production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018 Jan 1;314(1):F132-F139.
56. Clinkenbeard EL, Hanudel MR, Stayrook KR, Appaiah HN, Farrow EG, Cass TA, Summers LJ, Ip CS, Hum JM, Thomas JC, Ivan M, Richine BM, Chan RJ, Clemens TL, Schipani E, Sabbagh Y, Xu L, Srour EF, Alvarez MB, Kacena MA, Salusky IB, Ganz T, Nemeth E, White KE. Erythropoietin stimulates murine and human fibroblast growth factor-23, revealing novel roles for bone and bone marrow. *Haematologica.* 2017 Nov;102(11):e427-e430.
57. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood.* 1991 Jun 15;77(12):2583-90.
58. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 2008 Apr;141(1):14-31.
59. Haq R, Halupa A, Beattie BK, Mason JM, Zanke BW, Barber DL. Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2002 May 10; 277(19):17359-66.
60. Sawada, K., Krantz, S. B., Dai, C.-H., Koury, S. T., Horn, S. T., Glick, A. D., & Civin, C. I. (1990). Purification of human blood burst-forming units-erythroid and

demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *Journal of Cellular Physiology*, 142(2), 219–230.

61. Shinjo K, Takeshita A, Higuchi M, Ohnishi K, Ohno R. Erythropoietin receptor expression on human bone marrow erythroid precursor cells by a newly-devised quantitative flow-cytometric assay. *Br J Haematol*. 1997 Mar;96(3):551-8.

62. Menon MP, Fang J, Wojchowski DM. Core erythropoietin receptor signals for late erythroblast development. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2662-72.

63. Ratajczak J1, Majka M, Kijowski J, Baj M, Pan ZK, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells. *Br J Haematol*. 2001 Oct;115(1):195-204.

64. Oda A1, Sawada K, Druker BJ, Ozaki K, Takano H, Koizumi K, Fukada Y, Handa M, Koike T, Ikeda Y. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of Jak2, STAT5A, and STAT5B in primary cultured human erythroid precursors. *Blood*. 1998 Jul 15;92(2):443-51.

65. Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, Gashin LB, Terrell S, Klitgaard JL, Santo L, Addorio MR, Ebert BL, Griffin JD, Frank DA. The STAT5 inhibitor pimozone decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3421-9. doi: 10.1182/blood-2009-11-255232.

66. Kato K, Jeanneau C, Tarp MA, Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Bennett EP, Mandel U, Strom TM, Clausen H. Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation. *J Biol Chem*. 2006 Jul 7;281(27):18370-7.

67. Farrow EG, Imel EA, White KE. Hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis (FGF23, GALNT3 and α Klotho). *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011 Oct;25(5):735-47.

68. Wang X, Wang S, Li C, Gao T, Liu Y, Rangiani A, Sun Y, Hao J, George A, Lu Y, Groppe J, Yuan B, Feng JQ, Qin C. Inactivation of a novel FGF23 regulator, FAM20C, leads to hypophosphatemic rickets in mice. *PLoS Genet*. 2012;8(5):e1002708.

69. Tagliabracci, V. S. et al. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science*, 2012, 336, 1150–1153.

70. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):20197-203.
71. Li G, Oparil S, Kelpke SS, Chen YF, Thompson JA. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation*. 2002 Aug 13;106(7):854-9.
72. Goetz R, Nakada Y, Hu MC, Kurosu H, Wang L, Nakatani T, Shi M, Eliseenkova AV, Razzaque MS, Moe OW, Kuro-o M, Mohammadi M. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):407-12.
73. Drüeke TB, Parfrey PS. Summary of the KDIGO guideline on anemia and comment: reading between the (guide)line(s). *Kidney Int*. 2012 Nov;82(9):952-60.
74. Wolf M., Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012 Oct;82(7):737-47.
75. Toro L, Barrientos V, León P, Rojas M, Gonzalez 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. Erythropoietin induces bone marrow and plasma fibroblast growth factor 23 during acute kidney injury. *Kidney Int*. 2018 May;93(5):1131-1141.
76. Saji F, Shiizaki K, Shimada S, Okada T, Kunimoto K, Sakaguchi T, Hatamura I, Shigematsu T. Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats. *Nephron Physiol*. 2009;111(4):p59-66.
77. Clinkenbeard EL, Noonan ML, Thomas JC, Ni P, Hum JM, Aref M, Swallow EA, Moe SM, Allen MR, White KE. Increased FGF23 protects against detrimental cardio-renal consequences during elevated blood phosphate in CKD. *JCI Insight*. 2019 Feb 21;4(4). pii: 123817.)
78. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros M, Herrera H, Garcia J. 2009 Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 1646–1654.

79. David V, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi L, Ramirez V, Zumbrennen-Bullough KB, Sun CC, Lin HY, Babitt JL, Wolf M. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2016 Jan;89(1):135-46.
80. Broxmeyer HE. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J Exp Med.* 2013 Feb 11;210(2):205-8.

Santiago, a 2 de febrero de 2018

Certificado n°: 18108-MED-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el protocolo número CBA 988 FMUCH del Proyecto de Investigación titulado "Papel de la eritropoyetina sobre la expresión de FGF23 en la enfermedad renal crónica", del Investigador Sr. Víctor Barrientos Labra, Estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas y cuyo Patrocinante e Investigador Responsable es el Dr. Luis Michea Acevedo, del Programa Disciplinario de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los investigadores, se han comprometido a la ejecución de este proyecto de investigación dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación, para el uso de 336 ratones *Mus musculus* (cepa C57 BL/6) provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante 36 meses, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el Instituto Milenio de Inmunología en Inmunoterapia P-09-016-F (ICM), Proyecto Fondecyt Regular 1171869.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.



Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director
CICUA - VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile