



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

“El fragmento C-terminal del Factor de Crecimiento de Fibroblástico 23 (FGF23) es una proteína de 19 kDa que circula en plasma humano”

Marcela Alejandra Olivera Zúñiga

MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICA

Director de Tesis

Dr. Luis Toro Cabrera, MD PhD FACP
Investigador Centro de Investigación
Clínica Avanzada (HCUCH)
Profesor asistente Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor patrocinante

Dr. Alfonso Paredes Vargas
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

2022

*Como la luna vacía
repleta de cráteres,
Como la playa vacía
Entre rocas y olas,
Como la montaña vacía
Llena de vida.*

Agradecimientos

En este momento, te recuerdo con tu sonrisa, tu tecito en la mañana, tus manos acariciándome. Te quiero agradecer a ti, porque en los días que no creo en mí, viene a mi mente tu recuerdo, tu esperanza, tus sueños y me dan ganas de ser la mujer que tu creías que podía llegar a ser. Te extraño como a la vida misma. Te quiero y espero siempre poder sentirte a mi lado. Muchas gracias nanita. Gracias por hacerme la mujer que soy.

A mi papa y a mi mama, muchas gracias por la resiliencia, por la fuerza, por la entrega. Gracias por los consejos, por la comprensión, por la vida, por el amor.

A mi hermano Alejandro, gracias por ser mi otra mitad, por ser la voz que argumenta en mi cabeza y quien que discute conmigo en vivo. Gracias por enseñarme a crecer, gracias por la perspectiva, gracias por los conocimientos. Gracias por el cariño y gracias por el apaño.

A Andrés, Javiera, Jorge (negro), Esteban, Jorge y Nicolas, por ser mi apoyo y mi conciencia, por todos los momentos que pasamos juntos, sobreviviendo la carrera.

Al Dr. Sergio Álvarez, muchas gracias por su apoyo, gracias por sus consejos, enseñanzas y sabias palabras que me recuerdan que no todo es tan difícil, que quizás es mejor relajarse y no ver todo tan negro. Gracias por el amor a la microbiología, gracias por todo lo enseñado.

A la Dra. María Antonieta Valenzuela, muchas gracias por ese abrazo en el congreso, muchas gracias por las explicaciones interminables en su oficina, cuando no entendía nada, muchas gracias por la energía y el vaso medio lleno de cada día.

Al Dr. Luis Toro, muchas gracias por la comprensión, por el apoyo, por los consejos, gracias por todo lo enseñado, gracias por confiar en mí, gracias por cambiarme la perspectiva. Muchas veces me vi repitiendo sus consejos en mi cabeza para no olvidarlos, también recuerdo nuestras conversaciones en momentos inesperados, en donde de la nada, me llegan a la mente sus palabras y me hacen sentido nuevamente. Gracias por entenderme, gracias por darme tiempo y gracias por enseñarme.

Al Dr. Alfonso Paredes, muchas gracias por acompañarme a lo largo de la carrera, cuando pensé a quien le podría pedir que fuera mi patrocinador, el único me vino a la cabeza fue usted, fue usted el que me vio llorando, peleando, riendo, frustrada, sufriendo, triunfando, fracasando. Gracias por ser una persona tan integra y bacán, muchas gracias por el tiempo y la comprensión, gracias por los retos, por los

consejos, por las miradas, por las discusiones, por la crítica, por las risas. Gracias por escucharme y gracias por estar ahí en los momentos en que más lo necesitaba.

A la Dra. Daniela Seelenfreund, muchas gracias por ayudarme a encontrar fuerzas, gracias por creer en mí, gracias por la paciencia, gracias por el apoyo. Recuerdo su primera clase, cuando presento este mundo nuevo, gigante y microscópico, salí de la sala y lo único que tenía claro, es que no había entendido nada. También recuerdo nuestras conversaciones en clases, cuando molecular se me hacía imposible, pero siempre encontró la manera de explicarlo. Me recuerdo craneandome para las pruebas y los muchos de esos “ahhh, eso era” al revisarlas. Muchas gracias profe por enseñarme a pensar, a entrenar el cerebro y muchas gracias por todos los conocimientos entregados. Gracias por enseñarme a ser mejor persona, a discutir con argumentos sólidos, gracias por el cariño y la comprensión.

Muchas gracias profe, por recordarme que tengo que creer en mí, gracias por mostrarme que soy capaz, gracias por toda su ayuda, gracias por todas las herramientas y enseñanzas para la vida. Estoy agradecida de poder tener la relación que tenemos. Muchas gracias por todo Dani.

Yo entre a la universidad pensando que iba a aprender no solo bioquímica, que también iba a aprender a desenvolverme en esta vida, que la universidad de verdad entregaba conocimientos “universales” de la vida. En medio de la carrera, el pensamiento cambio, la universidad era un negocio, no había compañerismo, estaba todo lleno de competencia, la bioquímica era lo único que estaba aprendiendo en clases. El ambiente se sentía hostil y me quede con la idea de que me tenía que salvar solita, que nadie iba a tener compasión o comprensión por la situación que estaba viviendo. Pero ahí, les encontré y por eso estoy enormemente agradecida, me demostraron que no por ser científica o bioquímica iba a dejar de ser persona, muchas veces mostrando más comprensión y compasión conmigo que yo misma.

Hoy puedo decir que en la universidad aprendí bioquímica, y también, crecí como persona, hoy salgo a la jungla con muchas más herramientas de las que entre y por eso les quería dar las gracias a mis compañeros, amigos, profes y familia.

Por último, también me quiero agradecer a mí, por terminar esta etapa, por no darnos por vencida, nos costó, sufrimos daños, muertes y caídas, pero hoy estamos encontrando formas regenerarnos, con ideas y argumentos para mantener este ecosistema. Vacías como el mar. Llenas de vida.

Financiamiento

Esta memoria es parte del proyecto FONDECYT de iniciación N° 11171141, otorgado al Dr. Luis Toro Cabrera y se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Clínica Avanzada (CICA) del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH).

ÍNDICE

ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIACIONES	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Factor de crecimiento fibroblástico 23	2
1.1.1. Actividad de FGF23	2
1.1.2. Síntesis de FGF23	5
1.2. Estructura FGF23	9
1.2.1 Péptido señal	9
1.2.2 Dominio FGF	9
1.2.3 Sitio de unión a Klotho	11
1.2.4 C-terminal	12
1.3. FGF23 en Enfermedad Renal Crónica	13
1.4. C-terminal	15
1.4.1 Glicosilación y fosforilación	15
1.4.2 Inhibición a FGF23 intacto	15
1.4.3 Péptido en plasma reconocido por ELISA (QUIDEL®)	16
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
2.1. Hipótesis	18
2.2. Objetivos	18
2.2.1 Objetivo general	18
2.2.2 Objetivos específicos	19
3. MÉTODOS	20

3.1. Pacientes y obtención de muestra	20
3.2. Preparación de las muestras para la separación electroforética	21
3.3. Electroforesis	21
3.4. Western Blot	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Reconocimiento de FGF23 intacto en muestras de plasma	
humano por medio de un ensayo de inmunodetección.....	23
4.1.1. Estandarización de la técnica	23
4.1.2. Anticuerpos y reconocimiento de FGF23 intacto	26
4.2. Reconocimiento de FGF23 C-terminal en muestras de plasma por	
medio un ensayo de inmunodetección de anticuerpos específicos	
para la porción C-terminal de la proteína	28
4.3. Determinación del peso molecular y estimación del sitio de corte	
en la secuencia aminoacídica del fragmento C-terminal de FGF23	
circulante en plasma sanguíneo.....	30
5. DISCUSIÓN	31
5.1. Estandarización de Western Blot	31
5.1.1. Normalización por volumen	32
5.1.2. Tiempos de transferencia	33
5.2. Caracterización FGF23 C-terminal	33
5.3. Proyecciones futuras	35
6. CONCLUSIONES	37
7. REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Actividad de FGF23 en sus tejidos blanco	4
Figura 2: Esquema de vías de señalización de FGF23 en osteoclasto	8
Figura 3: Esquema de la estructura primaria de FGF23	9
Figura 4: Representación de la estructura cristalográfica de FGF23	10
Figura 5: Representación de la estructura cristalográfica de FGF23 y FGF2	11
Figura 6: Representación estructura cristalográfica complejo FGFR1c-FGF23-Klotho	12
Figura 7: Patrón de electroforesis plasma humano de membranas obtenidas con diferentes cursos de transferencia	25
Figura 8: Patrón de electroforesis plasma humano de membranas obtenidas con diferente estructura de sándwich de transferencia	26
Figura 9: Esquemización sitio de reconocimiento anticuerpo en FGF23	26
Figura 10: Reconocimiento de FGF23 en plasma por medio del anticuerpo primario FGF23 N-terminal monoclonal	27
Figura 11: Reconocimiento de FGF23 y cFGF23 en plasma por medio del anticuerpo primario FGF23 C-terminal 186-206	29
Figura 12: Reconocimiento de FGF23 y cFGF23 en plasma por medio del anticuerpo primario FGF23 C-terminal 225-244	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos utilizados, proteína recombinante y estándar de peso molecular	22
-------------------------------------------------------------------------------------------	----

Abreviaciones

BUN:	Nitrógeno ureico en sangre
cFGF23:	Fragmento C-terminal de FGF23
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático de fase sólida
EPO:	Eritropoyetina
ERC:	Enfermedad renal crónica
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF23:	Factor de crecimiento fibroblástico 23
FGFR:	Receptor de factores de crecimiento fibroblástico
GFR:	Índice de filtración glomerular
HRP:	Peroxidasa de rábano
iFGF23:	FGF23 intacto, proteína completa
kDa:	Kilodalton
PBS:	Tampón de fosfato salino
PTH:	Parathormona
RhEPO:	Eritropoyetina recombinante
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SPC:	Proteasa, Convertasa de proproteína similar a la subtilina

Resumen

El Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23) es una hormona peptídica de 251 aminoácidos. Su principal función es modular la homeostasis del fosfato, inhibiendo la reabsorción de fosfato en el túbulo proximal del riñón produciendo una disminución de la fosfatemia. Estudios muestran que los niveles plasmáticos de FGF23 aumentan en daño renal, para mantener estables los niveles de fosfato sanguíneo a medida que el riñón pierde su función. Este aumento en la concentración plasmática de la proteína se correlaciona en forma positiva con mayor mortalidad.

Se ha demostrado que existen distintas isoformas de FGF23 circulantes en plasma: una forma intacta (iFGF23) y una forma C-terminal (cFGF23). En la literatura se describe un corte en una secuencia altamente conservada ¹⁷⁶RHTRSAE¹⁸² que formaría un fragmento C-terminal de 72 aa. Sin embargo, este fragmento no es concordante con el fragmento C-terminal de aproximadamente 14 kDa descrito en diversas investigaciones anteriores. El objetivo de esta memoria es reconocer en muestras de plasma humano, iFGF23 y cFGF23 en condiciones normales y en pacientes con daño renal, avanzando en la caracterización de este fragmento.

Para este trabajo, se utilizó la técnica de inmunodetección de Western Blot, con la cual se detecta FGF23 en el plasma sanguíneo de pacientes en enfermedades crónicas de riñón y pacientes sanos. Para lograr este objetivo se utilizaron anticuerpos dirigidos a distintos epítetos de la proteína, un anticuerpo hacia su porción N-terminal y dos anticuerpos hacia la porción C-terminal.

Los resultados muestran la detección de una molécula de alrededor de 25 kDa, la cual es reconocida por todos los anticuerpos. Además, las bandas varían en intensidad, lo que se interpreta como una diferencia en sus cantidades relativas, las cuales se correlacionan con el daño renal presentado en los pacientes. Esto sugiere que la molécula que se reconoce es iFGF23. Por otro lado, también se observan bandas alrededor de los 19 kDa. Estas bandas demuestran la presencia de un fragmento C-terminal que posee tanto el segmento de unión a Klotho, un cofactor obligado para la activación del FGFR, reconocido por el anticuerpo C-terminal 186-206 y la cola C-terminal que es reconocida por el anticuerpo 225-244. Según el peso descrito para la cadena aminoacídica de la molécula, este fragmento C-terminal

contiene gran parte de la zona de homología a FGF, pero no completa; por lo tanto, se podría estimar que no es biológicamente activo, siendo incapaz de activar al receptor FGFR. Sin embargo, aún faltan estudios de funcionalidad para confirmar esta propiedad.

Estos resultados nos permiten concluir que es factible detectar la presencia de FGF23 por medio de un ensayo de Western Blot en muestras de plasma humano. Además, en este trabajo se reporta la presencia de un fragmento C-terminal de 19 kDa no descrito previamente. Esta molécula podría corresponder al fragmento que se encuentra circulando en el plasma en conjunto con iFGF23. Para caracterizar estos péptidos se requieren estudios de espectrometría de masas y de funcionalidad para determinar la importancia de este péptido de 19 kDa en la patología renal crónica.

Abstract

Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) C-terminal fragment is a 19 kDa protein circulating in human plasma.

Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) is a peptide hormone of 251 amino acids. Its main function is to modulate phosphate homeostasis, inhibiting phosphate reabsorption in the proximal tubule of the kidney, producing a decrease in phosphatemia. Studies show that plasma levels of FGF23 increase in kidney damage to maintain stable blood phosphate levels as the kidney loses its function. This increase in plasma concentration of the protein is positively correlated with higher mortality.

It has been shown that there are different isoforms of FGF23 circulating in plasma: an intact form (iFGF23) and a C-terminal form (cFGF23). The literature describes a cut in the highly conserved sequence ¹⁷⁶RHTRSAE¹⁸² that is predicted to form a C-terminal fragment of 72 aa. However, this fragment is not consistent with the C-terminal fragment of approximately 14 kDa described in various former investigations. The objective of this work is to identify iFGF23 and cFGF23 in raw human plasma samples in patients with kidney damage and patients with normal kidney function, advancing in the characterization of this fragment.

For this work, the Western Blot immunodetection technique was used, in which FGF23 is detected in the blood plasma of chronic kidney disease patients and healthy patients. For this, antibodies directed to different epitopes of the protein were used, one antibody that recognizes its N-terminal portion and two antibodies that bind to the C-terminal portion.

All the antibodies were able to recognize a molecule of around 25 kDa, the bands also vary in intensity, this is interpreted as a difference in their relative amounts, which correlate with the renal damage presented in patients. This suggests that the molecule being recognized is iFGF23. On the other hand, bands of around 19 kDa are also observed. These bands reveal the presence of a C-terminal fragment that includes both the Klotho-binding segment, a cofactor for the FGFR activation, recognized by the C-terminal antibody 186-206, and the C-

terminal tail that is recognized by the 225-244 antibody. According to the weight predicted by the amino acid chain of the molecule, this C-terminal fragment contains a large portion, but not the complete sequence of homology to FGF. Therefore, it is predictable that this fragment is not biologically active, being incapable of activating the FGFR receptor. However, functionality studies are still lacking to confirm or reject this possibility.

These results allow us to conclude that it is feasible to detect the presence of FGF23 by means of a Western Blot assay in human plasma samples. In addition, a 19 kDa C-terminal fragment is recognized that had not been described previously. This molecule might be the fragment found in plasma together with iFGF23. To characterize more deeply the properties of this fragment, mass spectrometry analysis and functionality studies are required to describe the importance of this 19 kDa molecule.

1.Introducción

La enfermedad renal crónica (ERC) se encuentra definida como anomalías presentes en la estructura o función de los riñones durante al menos 3 meses [1]. El diagnóstico se realiza por medio de marcadores como la albuminuria, sedimentos urinarios, anomalías en electrolitos, anomalías histológicas o el índice de filtración glomerular (GFR, por sus siglas en inglés) inferior a 60ml/min por 1,73m². Esta enfermedad posee una prevalencia mundial de 13,6% y su diagnóstico es usualmente tardío, debido a que la sintomatología y el desbalance en los marcadores se presentan cuando el daño celular ya es avanzado [1].

El declive de la función renal sostenido en el tiempo se ha clasificado en 5 estadios, en los cuales se observa la aparición de distintas enfermedades adyacentes provocadas por la pérdida de homeostasis mineral. La enfermedad cardiovascular la principal causa de muertes de estos pacientes [1].

La homeostasis mineral se ve alterada en pacientes con ERC. A medida que disminuye el GFR se ve comprometida la excreción de fosfato. Para contrarrestar esto, se observa un aumento del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) plasmático, una fosfatona, la cual en estadios tempranos de la enfermedad logra mantener la concentración de fosfato sanguíneo inalterada por medio de la reducción de la reabsorción de fosfato a nivel renal [2].

La acción principal de esta hormona es disminuir la expresión de cotransportadores NaPi e inhibir la activación de vitamina D [2]. Es por esto que al verse aumentada la concentración de fosfato plasmático en daño renal se observa un aumento en la síntesis de FGF23 que mantiene los niveles de fosfato. Sin embargo, a medida del avance de la enfermedad se compromete su función y efectividad, aumentando su concentración en conjunto con el progreso de la enfermedad.

Este aumento en la expresión de FGF23 es una característica muy importante, ya que es una de las primeras alteraciones que se observan en pacientes con daño renal. En estos momentos en nuestro laboratorio se encuentra enfocado en el estudio de un método de

diagnóstico utilizando esta alza en la concentración de FG23 circulante en plasma, en conjunto de otros marcadores novedosos.

Además, FGF23 es una proteína que según la literatura sufre un corte proteolítico y es posible detectar circulante en plasma un fragmento C-terminal. Esta memoria está enfocada en caracterizar el fragmento C-terminal de FGF23 circulante en plasma, para ayudar en su descripción y obtener datos que lo involucren o no, en este sistema de diagnóstico de daño renal.

1.1. Factor de Crecimiento Fibroblástico 23

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) constituyen una gran familia de proteínas que tienen en común una secuencia FGF conservada y poseen múltiples funciones en el metabolismo, en la organogénesis y en el desarrollo general del individuo. Podemos dividir estas proteínas en 3 clases de FGFs según su mecanismo de acción. Las familias FGF1, FGF4, FGF7, FGF8 y FGF9 poseen actividades paracrin/autocrin, se unen y activan el receptor de membrana FGFR. Por otro lado, la familia FGF11 no interactúa con el receptor de membrana FGF (FGFR), poseen una actividad intracrina y se denominan FGFs nucleares.

Por último, la familia FGF19 se compone de factores que se encuentran circulando en el torrente sanguíneo, ejerciendo una acción endocrina [3]. Estas proteínas tienen una baja unión a heparán sulfato, pues a diferencia de las otras familias no poseen el dominio de unión a heparina. Esta característica les permite difundir fácilmente a la sangre y ejercer una acción hormonal [3] en tejidos blanco alejados de su sitio de síntesis. En estos tejidos, los FGFs interactúan con el FGFR de membrana y activan a la tirosina quinasa. La familia FGF19 incluye a FGF23, una proteína de 251 aminoácidos sintetizada en el tejido óseo, la cual es secretada al torrente sanguíneo y ejerce su acción en distintos tejidos como el riñón, glándula paratiroides, entre otros.

1.1.1. Actividad de FGF23

FGF23 puede unirse y activar a los receptores FGFR1c, FGFR3 y FGFR4, siendo su receptor principal FGFR1c [3]. FGF23 posee una baja afinidad por estos receptores, incluido su receptor principal y para provocar la activación de FGFR1c necesita de un cofactor obligado. Una proteína transmembrana de tipo 1 de aproximadamente 130 kDa denominada

Klotho. Esta proteína posee un dominio citoplasmático pequeño y uno extracelular compuesto por dos cadenas en tándem, Kl1 y Kl2 [4]. Estas cadenas interactúan con el receptor, favoreciendo la formación del complejo FGFR-Klotho-FGF23. La formación de este complejo provoca la activación del receptor y la consecuente transducción de señal en los distintos tejidos blanco.

En la **figura 1** se detallan los efectores y las distintas acciones de FGF23 en dos de sus órganos blanco. Cabe destacar que FGF23 al secretarse al torrente sanguíneo y ejercer una acción endocrina posee variados órganos blanco, entre ellos el riñón, la glándula paratiroides, el corazón, el hueso, entre otros. Nos enfocaremos principalmente en su acción en el túbulo proximal, ya que es la función más comprometida y estudiada en pacientes con ERC y en su acción sobre PTH, ya que, existe una retroalimentación negativa que controla la expresión de ambas.

Como se muestra en la **figura 1**, en el riñón la señalización de FGF23 ocurre por medio de la activación de la cascada ERK1/2-SGK1. En el túbulo proximal, la activación de estas quinasas produce la fosforilación del factor NHERF-1, el cual induce la internalización y degradación de los cotransportadores de sodio-fosfato NaPi2a [5] y NaPi2c [6]. La función principal de FGF23 caracterizada hasta hoy es disminuir la reabsorción de fosfato en el riñón, aumentando la fosfaturia.

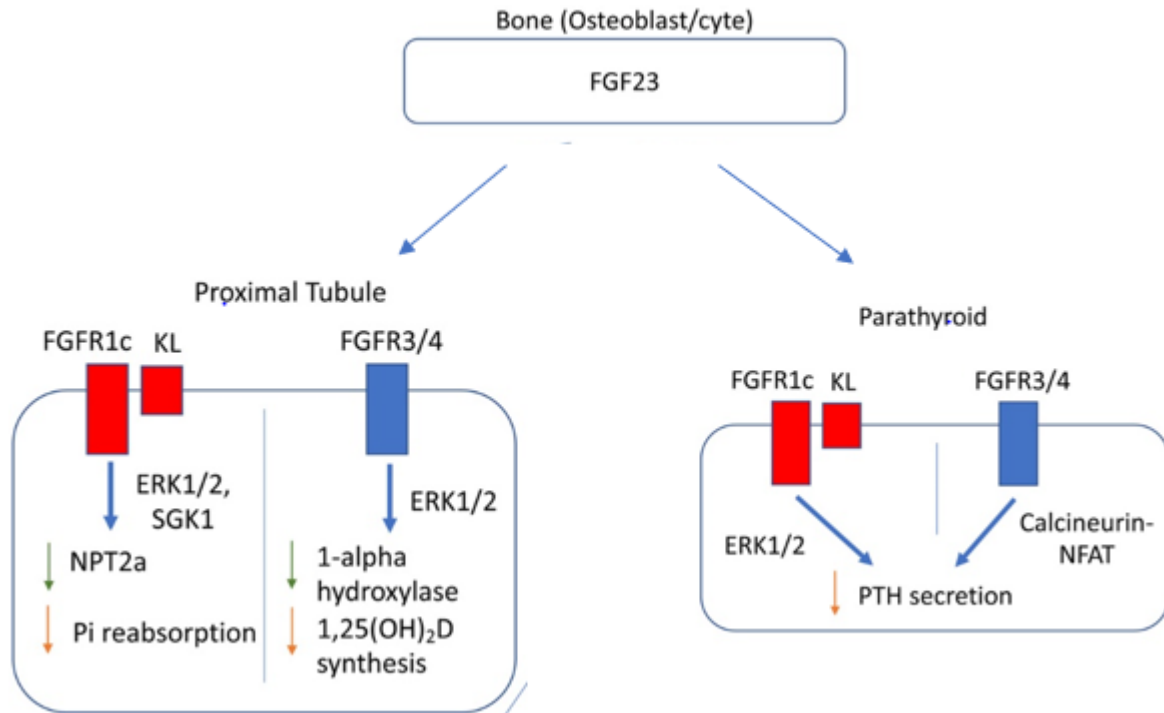


Figura 1: Funciones de FGF23 en sus tejidos blanco. En la imagen se muestran la vía de transducción en túbulo proximal, siendo los principales factores transcripcionales activados en este tejido son ERK1/2 y SGK1, quienes son responsables de la baja en la reabsorción de fosfato por la internalización de los cotransportadores. Además, FGF23 por medio de su unión con FGFR3/4 promueve una baja de la activación de vitamina D por medio de la inhibición de las hidrolasas involucradas en su síntesis. Por otro lado, en la glándula paratiroides la activación de los receptores conlleva a una reducción en la expresión de PTH, esto por medio de la activación de factores como ERK1/2 y NFAT (Modificado de Ho y Bergwitz, 2021)

Además, FGF23 es un regulador de la síntesis de vitamina D, influyendo la expresión renal de las enzimas encargadas de la activación de la vitamina D [6]. FGF23 tiene un efecto inhibitorio frente la expresión de la hidrolasa 1 α OHasa, hidrolasa encargada de la activación de la vitamina D. Al mismo tiempo, muestra un efecto positivo sobre la concentración de 24OHase, enzima encargada de la inactivación por hidrólisis de la vitamina D [6]. Ambos efectos coinciden en una disminución en la vitamina D activa y, por tanto, disminuyendo la absorción de ion calcio y fosfato a nivel renal, efecto característico de la vitamina D.

También se ha descrito la estimulación en la glándula paratiroides, donde promueve la expresión del factor de transcripción ERK1/2 y NFAT quienes inhiben la expresión y

secreción de Parathormona (PTH). Esta disminución en la expresión de PTH tiene un efecto indirecto en el nivel de fosfato en sangre. La PTH promueve la resorción del hueso, al contrario de la vitamina D y en consecuencia aumenta los niveles de fosfato sanguíneo, por lo que este efecto coincide con la disminución en los niveles plasmáticos de fosfato que la expresión de FGF23 genera [7].

1.1.2. Síntesis FGF23

Las células óseas son las principales responsables de la síntesis de FGF23. El hueso se compone principalmente de tres tipos celulares especializados, los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos. Los osteoclastos se encargan de la resorción del hueso, los osteoblastos forman la matriz ósea y los osteocitos representan a las células esqueléticas adultas, estos se encargan de la remodelación del hueso, manteniendo estable la matriz ósea [8]. Además de esta función local, a través de sus dendritas conectan con la vasculatura y secretan factores al torrente sanguíneo para ejercer control metabólico. Entre ellos se encuentra FGF23, que se sintetiza principalmente en los osteocitos ubicados en la periferia trabecular del hueso [9].

El control de la expresión de FGF23 está regulado por una diversidad de factores y condiciones que aportan al control homeostático que realiza. La homeostasis mineral es uno de los parámetros más controlados en nuestro organismo y es por esto que la regulación de FGF23 es tan estricta y diversa. Los factores de transcripción más importante involucrados en su activación son el receptor citoplasmático de vitamina D, VDRRXR, y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) y, por otro lado, su inhibición está dada por factores como quinasas activadas por mitógenos (MAPK) o la activación de la proteína de caja *forkhead* O1 (FOXO1) por la acción de la insulina. En la **Figura 2** se resumen todas las vías involucradas en su síntesis. A continuación, se describen con mayor detalle algunas de ellas, correspondientes a las más afectadas en pacientes con daño renal.

- **PTH y Vitamina D:** PTH es un regulador positivo muy importante de FGF23. La activación del receptor PTH1R induce la vía cAMP/PKA y la transcripción del factor NURR1, el cual se une al promotor de FGF23 induciendo su transcripción, aumentando los niveles de FGF23 [10]. Con esto podemos contrastar las funciones

de ambas proteínas, FGF23 inhibe la síntesis de PTH y PTH estimula la síntesis de su inhibidor ejerciendo control sobre su expresión y manteniendo el equilibrio entre ambas hormonas.

Por otro lado, el calcitriol o vitamina D al unirse a su receptor citoplasmático VDR/RXR estimula la transcripción de FGF23 por medio de la unión al elemento de respuesta de vitamina D (VDRE) ubicado en el promotor de FGF23. Además, se observa también que la producción de local calcitriol por parte de los osteoblastos sería un agente primario en la regulación de la transcripción de FGF23 [11]. Esto da cuenta de la misma situación con PTH, FGF23 ejerce una acción inhibitoria sobre su regulador positivo.

- **Fosfato:** La regulación de FGF23 por fosfato aún se encuentra en discusión. Existe evidencia de que el aumento de fosfato en la dieta de ratones sanos provoca un incremento en los niveles plasmáticos de FGF23 [12], sin embargo, también se ha observado que la inyección de fosfato intravenoso no provoca un aumento significativo de FGF23, a pesar de observarse un aumento de la fosfatemia [13].

Algunas investigaciones postulan que esta regulación está dada por el cotransportador de sodio fosfato tipo 3 (PiT2). El cual actuaría como sensor aumentando o disminuyendo la producción de FGF23, en ratones KO para este transportador se pierde la respuesta a la ingesta de fosfato [14].

Por otro lado, se ha observado que la activación de FGFR1 en células óseas, por medio de la unión de su ligando, por ejemplo, FGF2 es capaz de inducir la producción de FGF23. Al mismo tiempo su inhibición provoca una baja en la producción de la proteína. Finalmente, también se ha estudiado que en respuesta a un alza en la ingesta de fosfato en la dieta la isoforma C del receptor FGFR1 (FGFR1c), censa de alguna manera este aumento y se fosforila en la tirosina 196 en ausencia de un ligando; esta activación induciría a las quinasas MAPK y ERK quienes controlarían la síntesis de FGF23 [15].

Sin embargo, en diversos estudios se confirma que pacientes sanos no experimentan cambios en la concentración de FGF23, ni con la deprivación de fosfato dietario, ni

con el aumento de su concentración plasmática [13,16]. Se necesita mayor investigación para dilucidar el rol del fosfato en la síntesis de FGF23 en humanos.

- **Eritropoyetina:** En un estudio de ratones en donde se realiza una delección del gen de FGF23 en osteocitos y osteoblastos, igualmente se observa la presencia de FGF23 en el suero, lo que sugiere que otros tejidos contribuyen en la síntesis de la proteína. Se ha demostrado que la médula ósea es un tejido que aporta una cantidad significativa al FGF23 circulante. En ratones WT se observa que la cantidad de FGF23 sintetizada por la médula ósea es comparable con la síntesis en tejido óseo y que FGF23 es expresada de forma transiente en eritropoyesis [13]. La eritropoyetina es una glicoproteína involucrada en la síntesis de glóbulos rojos en la medula ósea; se ha estudiado también que la administración de eritropoyetina recombinante (rhEPO) provoca un aumento en la expresión de mRNA de FGF23 en células EPCs [17].
- **Inflamación:** Los factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 1b (IL-1B), el *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS), aumentan la expresión de FGF23 en células IDS-SW3, una línea celular de osteocitos diferenciados [18]. Ensayos en hueso humano confirman que la estimulación por LPS y TNF α aumentan de manera significativa el mRNA de FGF23 [18].

Tanto TNF α , TWEAK y IL-1B inducirían la expresión de FGF23 por medio NF κ B, factor transcripcional involucrado en la mediación de múltiples respuestas proinflamatorias y el control de citoquinas. Por tanto, la activación de este factor es otro regulador positivo adicional en la síntesis de FGF23 en células óseas [19].

- **Insulina:** Esta hormona ha demostrado ser un agente antiinflamatorio y también posee un efecto negativo en la producción de FGF23. En células UMR-106 se ha estudiado que la insulina y el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF1) disminuyen la síntesis de FGF23 por medio de la inhibición de la vía de señalización FOXO1 y PI3K. Experimentos en humanos dan cuenta de este mecanismo observándose una baja de FGF23 a nivel plasmático posterior a la administración de glucosa oral y consiguiente alza de insulina [20].

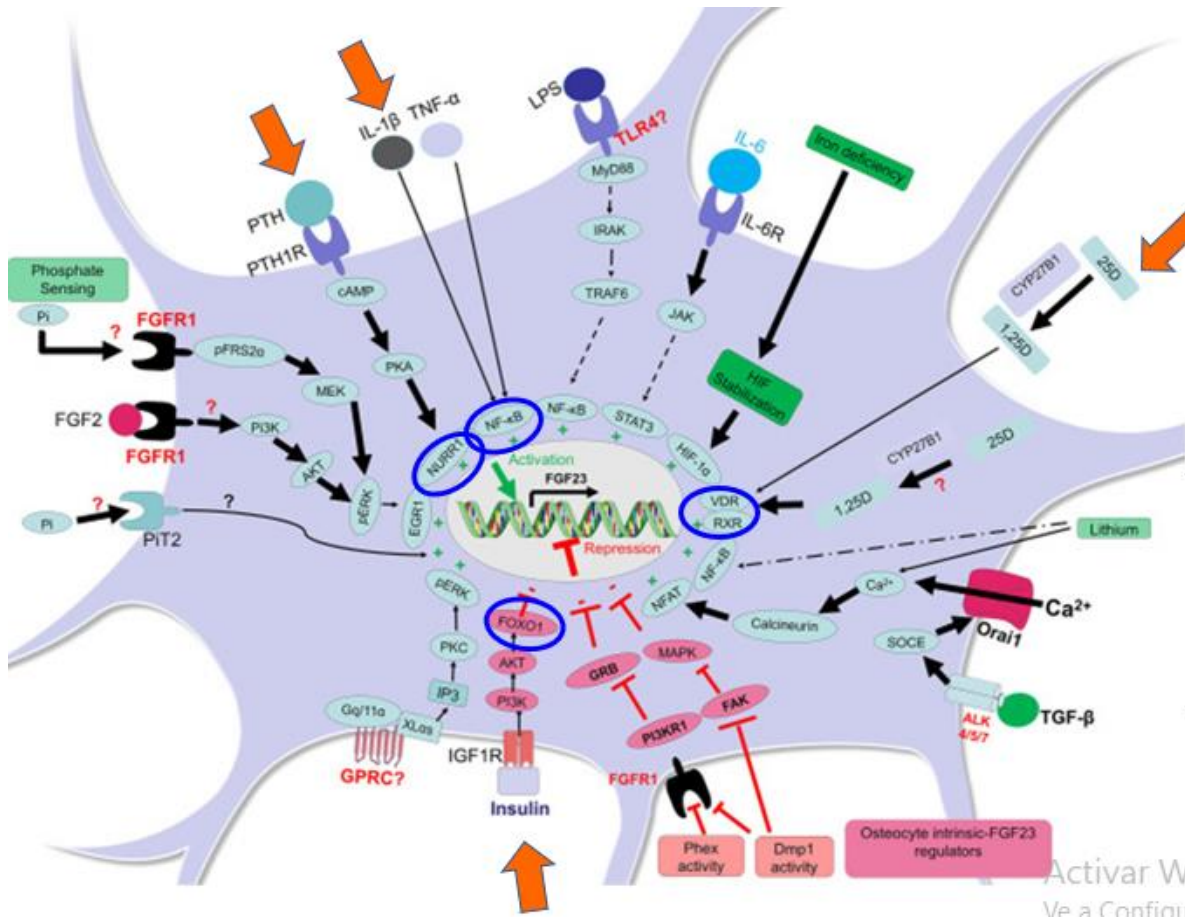


Figura 2: Esquema de vías de señalización de FGF23 en osteoclasto. El control de expresión de FGF23 está regulado por una diversidad de factores y condiciones que aportan al control homeostático que esta hormona realiza. En la figura se muestra un esquema que en donde se detallan las distintas vías de estimulación e inhibición de la síntesis de FGF23. En naranja se muestran las principales vías involucradas y detalladas en el texto. En azul se muestran los principales factores de transcripción involucrados. (modificada de Agoro y cols., 2020)

1.2. Estructura de FGF23

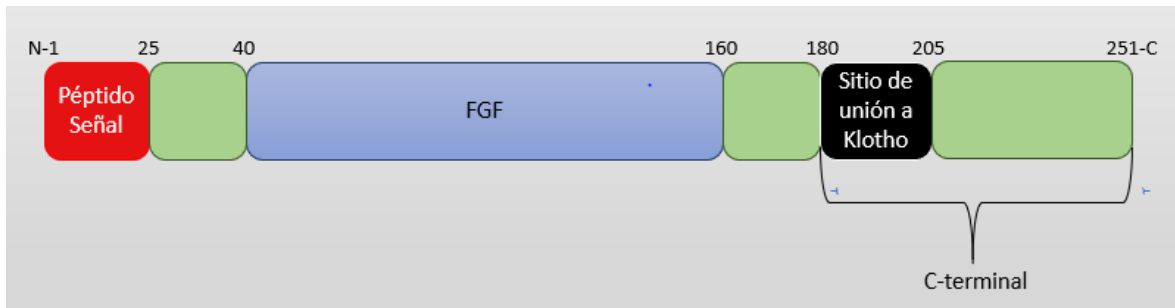


Figura 3: Esquema de la estructura primaria de FGF23. La proteína FGF23 posee distintos dominios a lo largo de su cadena aminoacídica. Los primeros 24 péptidos conforman el péptido señal de secreción indicados en rojo. En azul se muestra el dominio FGF, encargado de activar a los distintos FGFRs y en negro se muestra el dominio de unión a Klotho, un dominio pequeño que se encuentra dentro de la cola C-terminal de la proteína. Imagen propia.

1.2.1. Péptido señal

Los 24 primeros aminoácidos de la proteína recién sintetizada funcionan como marcador para su procesamiento en el aparato de Golgi y posterior secreción. Este segmento es procesado en las cisternas y la proteína madura es secretada con 227 aminoácidos [21].

1.2.2. Dominio FGF

El dominio FGF es el responsable de la activación del receptor FGFR1-4. Este dominio posee una estructura secundaria que comprende 12 hojas β antiparalelas las cuales forman una estructura globular (1β - 12β) [22].

La familia FGF19 difiere de este motivo, la falta de una hoja beta en la región entre β 10 y β 12 (**Figura 4**), producto de una diferencia en la estructura primaria. Por medio de ensayos de cristalografía se describe que en FGF23 el *loop* β 11 no se forma por la existencia de un triplete de prolina [23]. Una variación importante frente a las otras familias de FGFs (**Figura 5**), en donde se encuentran aminoácidos mayoritariamente básicos.

Este triplete de prolina y ausencia del *loop* β 11, le impide la formación de puentes de hidrogeno con los sulfatos de la heparina resultando en una baja afinidad por esta molécula. Esta baja afinidad por heparán sulfato le confiere la capacidad de difundir y no quedar

atrapada por la heparina en la matriz extracelular ejerciendo una acción paracrina, sino que difunde y llega al torrente sanguíneo para ejercer una acción endocrina, propiedad única de esta subfamilia de FGFs.

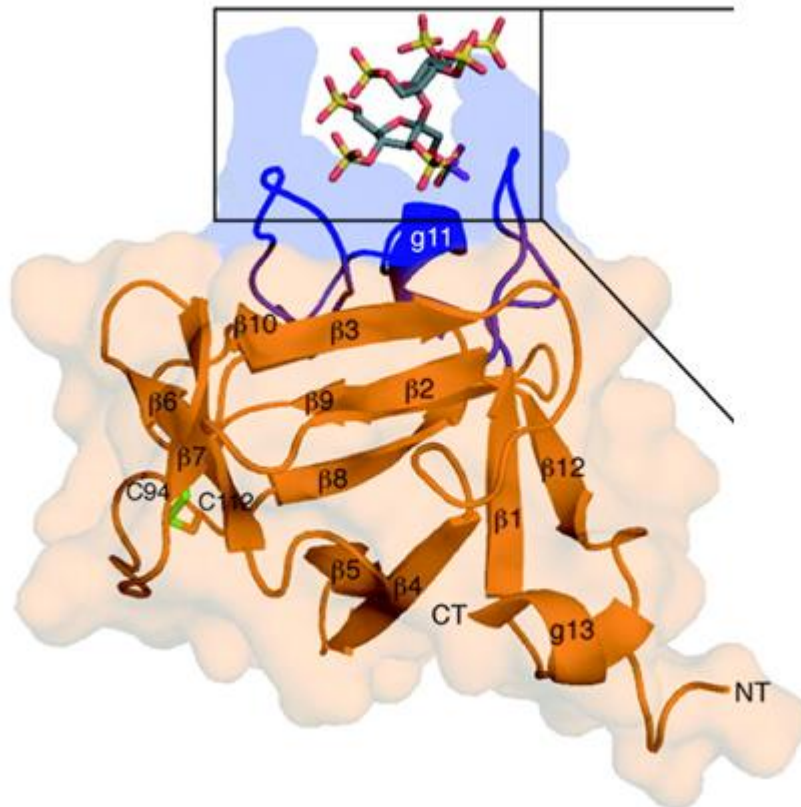


Figura 4: Representación de la estructura cristalográfica de FGF23. En la figura se encuentra representado en detalle el dominio central de FGF23, también se observa la estructura de una molécula auxiliar utilizada en la cristalografía y la estructura difusa es la parte externa de FGF23. En la imagen se observan las hojas β de la proteína y podemos ver como FGF23 carece del loop $\beta 11$. Las hojas beta están etiquetadas según la nomenclatura de FGF1 y FGF2, los factores más estudiados de esta familia. (Modificada de Goetz, R., y cols, 2007)

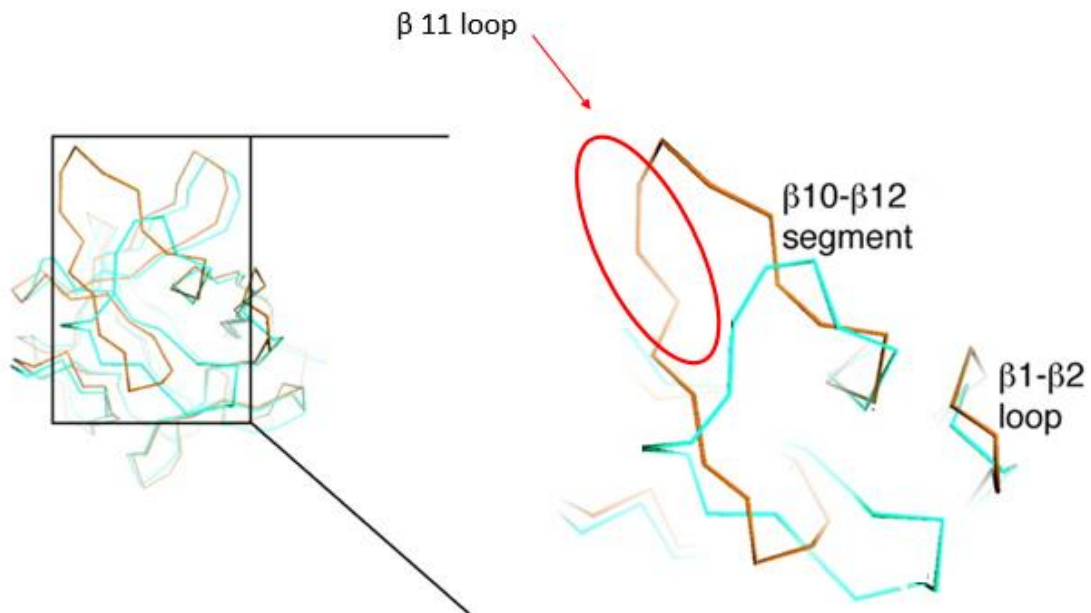


Figura 5: Representación de la estructura cristalográfica de FGF23 y FGF2. En la imagen se observa una sobreposición entre la estructura de FGF23 en celeste y FGF2 en café. En el círculo rojo se observa el *loop* $\beta 11$, el cual no se encuentra en FGF23 y como se observa, esto provoca una diferencia importante en la estructura de las moléculas. Por esto, FGF23 no se une a heparina y difunde al torrente sanguíneo. (Modificada de Goetz, R., y cols, 2007)

1.2.3. Sitio de unión a Klotho

Klotho es una proteína transmembrana, que no posee actividad enzimática, la cual es requerida como cofactor para la activación del receptor de FGF23. La necesidad de este cofactor está dada también por la desestabilización del motivo globular por la falta del *loop* $\beta 11$ [24]. Esta modificación no solo produce una baja afinidad por heparina, sino también por los FGFRs, por lo que para activar el FGFR1c, FGF23 se une a Klotho por medio del sitio de unión entre los aminoácidos 180-205 y a FGFR por medio de el motivo entre los aminoácidos 40-160 y formando un hetero trímero que es capaz de activar a la tirosina quinasa y transducir la señal [25].

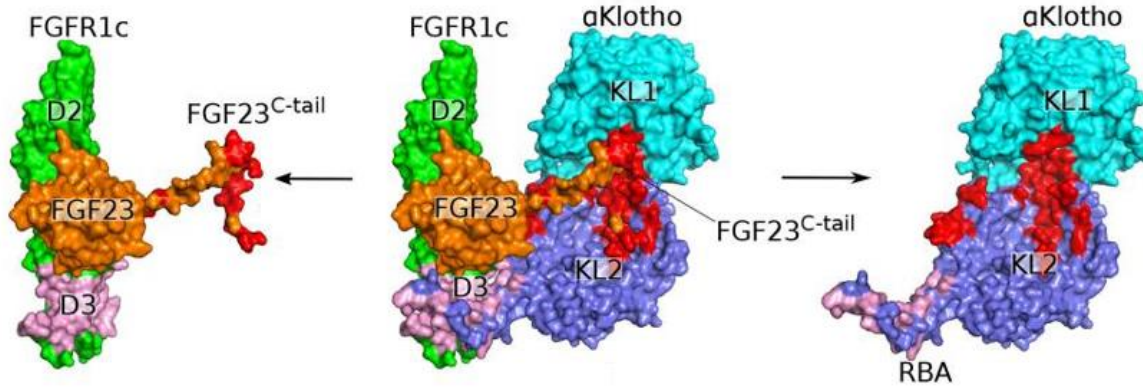


Figura 6: Representación estructura cristalográfica complejo FGFR1c-FGF23-Klotho. En la imagen se observa la unión entre FGF23, su cofactor Klotho y su receptor FGFR1c. El dominio RBA de Klotho, en la formación del trímero interactúa con el dominio D3 de FGFR1c. Estas interacciones entre FGF23 y Klotho con FGFR1c son necesarias para activar al receptor y transducir la señal de activación provocada por FGF23. FGFR1c: en verde dominio D2 y rosado dominio D3. FGF23: en naranja y aminoácidos del sitio de unión a Klotho en rojo. Klotho: KL1 en celeste, KL2 en morado, dominio de unión a FGF23 en Rojo y dominio de unión a D3 en rosado. (Modificada de Chen G., y cols, 2018.)

1.2.4. C-terminal

En las primeras investigaciones con FGF23 se demuestra mediante un mapeo genético mutaciones sin sentido en una secuencia altamente conservada ¹⁷⁶RHTRSAE¹⁸². Esta secuencia funciona como sitio de corte para proteasas del tipo SPC (*subtilin-like proprotein convertase*, furina) [26].

En condiciones sin mutación, al producirse el corte en la serina 180 (¹⁷⁶RHTR¹⁷⁹/S¹⁸⁰AE¹⁸²), se desprende el dominio C-terminal de FGF23, una cadena de 72 aminoácidos la cual contiene el sitio de unión a Klotho. Por tanto, su corte impide a FGF23 activar a su receptor, inactivando la proteína [25].

Estas mutaciones reemplazan una de las dos argininas (R176Q, R179W, R179Q) [27] lo cual modifica el sitio de corte e impide el reconocimiento de la furina. El consecuente aumento en la actividad de FGF23, provocado por estas mutaciones produce un Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD) [21]. Enfermedad en donde se observa una pérdida renal de fosfato dada por el aumento de los niveles circulantes de FGF23, esto tiene como consecuencia una hipofosfatemia acompañada de desmineralización ósea.

1.3 FGF23 en Enfermedad Renal Crónica

En pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) se observa alterada la homeostasis mineral-ósea. Al verse comprometida la excreción de fosfato por parte del riñón, se activan mecanismos compensatorios. Uno de ellos es el aumento en la concentración plasmática de FGF23. Por medio de su acción fosfaturica, en estadios tempranos de la enfermedad, el aumento en su concentración mantiene los niveles de concentración normales de fosfato en sangre [9]. Por otro lado, este aumento de FGF23, tiene como efecto secundario una disminución en los niveles de vitamina D activa, lo cual promueve una hipocalcemia y posterior hiperparatiroidismo secundario. Ambas condiciones que dan cuenta de la progresión de la enfermedad [28].

En etapas más avanzadas, FGF23 es incapaz de mantener los niveles normales de fosfato. El aumento sostenido de la fosfatemia, potenciada con la caída en los niveles de vitamina D resultan en una baja en la expresión renal de Klotho [29] y, por tanto, la pérdida de la afinidad de FGF23 por su receptor FGFR1c. Esto provoca que aumentos de 100 hasta 1000 veces en la concentración plasmática de FGF23 en pacientes en hemodiálisis, no se refleje en los niveles de fosfato plasmático [30].

La afinidad con el receptor FGFR1 también se ve comprometida en la glándula paratiroides, en donde se observa una resistencia a los elevados niveles de FGF23. Esto explica el aumento de los niveles de PTH observado en estos pacientes, ya que se rompe la retroalimentación o *feedback* negativo que ejerce FGF23 a PTH [31].

Por otro lado, el aumento en la síntesis de FGF23 también se explica por factores externos como lo son la utilización de EPO en pacientes anémicos y la terapia de vitamina D. Ambas terapias administradas para controlar condiciones derivadas de la insuficiencia renal, ambas moléculas poseen la capacidad de aumentar la síntesis de FGF23 [13,32].

Sin embargo, en estudios de inmunohistoquímica no se observa un marcado aumento en la síntesis de FGF23 por parte de los osteocitos [9]. Muchos estudios enfocan este incremento de FGF23 plasmático más a una reducción en eliminación o *clearance* de la proteína que a una sobreestimulación en la síntesis de esta [19].

El aumento en los niveles plasmáticos de FGF23 se ha observado sistemáticamente y la mayor parte de los estudios clínicos y en animales muestran a FGF23 como un marcador

de ERC, ya que se observa un aumento en sus niveles plasmáticos antes de otros marcadores mayormente estudiados; como lo son el aumento de la creatinina, fósforo, PTH y la disminución de 1,25-(OH)₂D₃ [33]. En un estudio sobre un universo de 4000 pacientes en estadios 2-4 de ERC se observa que el aumento de FGF23 ya es claro en pacientes que presentan un GFR de 70 ml/min/1,73 m² [34]. Además, en niños con ERC en estadios tempranos se observa que el aumento del fragmento C-terminal de FGF23 es la primera anomalía detectable [35].

La elevación en la concentración sanguínea de FGF23 se ha asociado con un mayor riesgo de mortalidad de los pacientes en ERC. En estudios realizados a principios de la década del 2010, el análisis de la concentración de FGF23 en una sola toma de muestra se relaciona independientemente con un mayor riesgo de muerte en individuos en ERC (estadios 2 a 5). También se observa esta relación en pacientes con trasplantes de riñón y enfermedades cardiovasculares [35,36]. Por otra parte, en estudios más recientes con pacientes en diálisis prolongadas se observa una correlación entre un incremento progresivo en el tiempo de la concentración de FGF23 y la mortalidad por cualquier causa en pacientes en estadios 2-5 de ERC [30,37].

Algo interesante a destacar es que, en más de la mitad de los pacientes analizados en el estudio de Isakova y sus colaboradores [38], se observa una estabilización de concentración de FGF23. En ellos, no se observa relación con la mortalidad, lo que da cuenta que una elevación en la línea base de la concentración plasmática de FGF23 no se correlaciona con un mayor riesgo de mortalidad independientemente, sino que este aumento debe que ser sostenido en el tiempo.

En este caso, FGF23 se podría utilizar como marcador de un fenotipo de alto riesgo y no como una toxina urémica directamente, ya que la estabilización de su línea base aumentada no está relacionada con el riesgo de mortalidad directamente [38]. Es por esto que como grupo de investigación nos interesa describir detalladamente a FGF23 y su C-terminal para poder utilizar su aumento prematuro como herramienta y así, ayudar con el diagnóstico temprano de fallas en la funcionalidad del riñón.

1.4 C-terminal

1.4.1 Glicosilación y fosforilación

FGF23 posee una secuencia altamente conservada ¹⁷⁶RHTRSAE¹⁸² la cual funciona como sitio de corte del tipo SPC, este corte genera dos fragmentos inactivos N-terminal y C-terminal [26]. Los primeros estudios de FGF23 se concentran en este sitio, se observa que mutaciones sin sentido en este sitio (SPC) que sustituyen la arginina (R) le confieren resistencia a la proteólisis y, por tanto, derivan en un aumento de iFGF23 y el desarrollo de raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD) [39].

Se ha postulado que el corte en este sitio funcionaría como punto de control para mantener una concentración adecuada en el plasma de iFGF23 y funcional. La proteólisis está controlada por la glicosilación o fosforilación de FGF23 en este sitio. La glicosilación es catalizada por la N-acetilgalactosaminotransferasa 3 (GalNAc-T3) quien realiza una O-glicosilación en la Thr¹⁷⁸, esta glicosilación hace que FGF23 sea menos susceptible al corte por SPC.

Por otro lado, la quinasa Fam20C, es la encargada de fosforilar la Ser¹⁸⁰ esto provoca un impedimento estérico a la glicosilación. Entonces, al ser fosforilada FGF23 es principalmente proteolizada y transformada a fragmentos N-terminal y C-terminal [39].

1.4.2 Inhibición a FGF23 intacto

Se ha descrito que esta cola C-terminal posee una acción inhibitoria sobre la actividad de iFGF23. La porción C-terminal de 72 aminoácidos de FGF23 abarca la secuencia de unión a su cofactor, Klotho y en ensayos in vitro se ha demostrado que posee la capacidad de unirse al complejo formado por Klotho y el receptor FGFR1c.

Esto porque al unirse a Klotho, una proteína transmembrana, impide la unión de iFGF23, confiriéndole una acción inhibitoria sobre la formación del complejo FGFR1-Klotho-iFGF23. Producto de un impedimento estérico provocado por la unión a Klotho y la incapacidad de activar al receptor [25].

En modelos genéticos de diabetes tipo 2 en ratones, los cuales presentan los parámetros característicos de nefropatía diabética con una elevada concentración de iFGF23, se ha demostrado que al administrar una dosis constante de C-terminal durante 12 semanas se observa la disminución en la fibrosis renal y mejoras en la

creatinina, BUN y albumina [40]. Por otro lado, en ratones HYP, los cuales son un modelo de una hipofosfatemia ligada a X, en donde se observa un aumento en la actividad de iFGF23 [41], al ser estimuladas con C-terminal se produce una baja en la excreción renal de fosfato [25].

Además, en ratas Sprague-Dawley, la administración de este péptido lleva a la retención de fosfato renal produciendo hiperfosfatemia [25]. Todos estos resultados dan cuenta de una acción antagonista a la actividad fosfaturica de FGF23 por parte de C-terminal tanto en ensayos in vitro como in vivo.

1.4.3 Péptido en plasma reconocido por ELISA (QUIDEL®)

El ensayo más utilizado para medir la concentración de FGF23 en plasma humano ha sido el ensayo ELISA. Este consta de dos ensayos, un ensayo con anticuerpos que reconocen la porción N-terminal y C-terminal de la proteína, los epítomos para este ensayo se encuentran localizados entre los aminoácidos 25-179 y 180-225 [42]; el otro ensayo reconoce solo la porción C-terminal, sus epítomos se ubican entre los residuos 186-206 y 225-244 [42]. La diferencia en las concentraciones de iFGF23 y cFGF23 observada en diversos estudios indican la presencia en el plasma de la proteína intacta y de su porción C-terminal [43,44].

En 2012 se presenta la idea de que este fragmento C-terminal se encuentra circulando en la sangre, tanto de pacientes con enfermedades crónicas de riñón como en individuos sanos. Un estudio explica que la diferencia en la medición de la concentración de iFGF23 y cFGF23 obtenida en un ensayo de ELISA QUIDEL®, se debe a la presencia de una cadena de alrededor de 14 kDa en el torrente sanguíneo que es reconocida únicamente por el anticuerpo C-terminal de FGF23. Estos resultados son obtenidos por medio de un ensayo de inmunoprecipitación sobre plasma y posteriormente un Western Blot contra iFGF23 y C-terminal [45].

En la literatura no se encuentran estudios enfocados en describir la estructura de este péptido C-terminal. Sin embargo, en ensayos accesorios de distintas investigaciones, por medio de técnicas de inmunoprecipitación y posterior Western Blot se han observado bandas entre los 12-17 kDa [16,25,26,39,42,46]. Este péptido reconocido tiene un peso molecular que lo distancia del péptido de 72 aminoácidos descrito en la literatura como la porción C-terminal de FGF23.

Esta memoria tiene como objetivo reconocer, por medio de la utilización de una técnica de Western Blot directa al plasma, a la molécula C-terminal que se encuentra circulando, misma molécula que es reconocida por los ensayos de ELISA QUIDEL® C-terminal. Para este trabajo, se utilizaron los mismos anticuerpos QUIDEL® utilizados en los ensayos de ELISA de FGF23 y la muestra utilizada fue tratada al mínimo, bajo los estándares de manejo de muestra humanas. De esta forma se espera reconocer directamente al fragmento C-terminal presente en el plasma, sin problemas de descomposición de la muestra. Este ensayo nos permite obtener una aproximación del peso molecular del fragmento de estudio, entregando detalles de su estructura.

2. Hipótesis y Objetivos

En base a los antecedentes presentados, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

2.1 Hipótesis

Es posible detectar directamente la proteína FGF23 y su fragmento C-terminal en muestras de plasma humano mediante la utilización de anticuerpos específicos en pacientes con enfermedad renal crónica.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Detectar la proteína FGF23 y su fragmento C-terminal en plasma humano, determinar la eficacia de su detección por medio de anticuerpos específicos, dirigidos al reconocimiento de la fracción C-terminal de FGF23 para profundizar en su caracterización y avanzar en su eventual uso como herramienta de diagnóstico en insuficiencia renal.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Detectar la proteína FGF23 intacta en muestras de plasma humano sin procesar por medio de un ensayo de inmunodetección.
2. Evaluar si el fragmento C-terminal de FGF23 es reconocido en muestras de plasma por medio de un ensayo de inmunodetección con anticuerpos específicos para la porción C-terminal de la proteína.
3. Caracterizar el péptido C-terminal determinando su peso molecular y el sitio de corte en la secuencia aminoacídica del fragmento C-terminal de FGF23 circulante en plasma sanguíneo (Objetivo no realizado).

3. Métodos

3.1 Pacientes y obtención de muestra

Para el estudio se solicitó la firma de un consentimiento informado. El paciente es libre de seguir o dejar el estudio sin perjuicio a su terapia usual. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile (HCUCh) (ver anexo 1).

Para esta memoria se incluyeron dos pacientes en etapa avanzada de enfermedad renal crónica reclutados desde el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Ambos pacientes cumplían con todos los criterios de inclusión: mayores de 18 años, diagnosticados con enfermedad renal crónica terminal, encontrándose en terapia de hemodiálisis 3 veces por semana en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile o en sus centros de hemodiálisis ambulatorios. Los criterios de exclusión fueron la incapacidad de otorgar el consentimiento informado, historial de trasplante de riñón, mujer embarazada, diagnóstico de cáncer activo, sangrado activo o hipertensión descontrolada. Ambos pacientes incorporados al estudio son de sexo masculino.

Se reclutó también un voluntario sano como control, mayor de 18 años, de sexo masculino, con ausencia de historial de hipertensión, diabetes o alguna deficiencia renal. Sus parámetros de función renal son normales, con una tasa de filtración glomerular mayor a 90mL/min/1,73m² y un índice de creatinina inferior a los 30 mg/mg. Los criterios de exclusión para los controles sanos fueron la incapacidad de entregar el consentimiento informado, mujer embarazada, diagnóstico de cáncer activo, diagnóstico de alguna enfermedad hematológica o anemia de otra etiología.

Las muestras de sangre fueron extraídas en tubos lilas, con EDTA, compuesto que detiene la cascada de coagulación y permite una mantención intacta del plasma. Las muestras se enviaron al Laboratorio Central del HCUCh, para los análisis hematológicos, y al Centro de Investigación Clínica Avanzada (CICA), para los análisis bioquímicos y de la hormona. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 G durante 5 minutos, se obtuvo el plasma y se conservó en tubos Eppendorf de 0,6 mL a -80°C, marcados con los estándares de manejo de muestras sanguíneas y manteniendo la confidencialidad del paciente, para su posterior análisis.

3.2 Preparación de las muestras para la separación electroforética

Las muestras de plasma fueron diluidas en un factor 1:20 en PBS. La estandarización de la cantidad de proteínas cargadas en cada bolsillo se realizó por medio del volumen de muestra cargado, en este caso el volumen utilizado fue de 15 μ L de la dilución en cada carril del gel.

Además, para confirmar el reconocimiento correcto de nuestros anticuerpos a la proteína de interés, se utiliza una muestra de FGF23 recombinante, a una concentración de 3 ng diluidos en 15 μ L.

3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras de 15 μ L se cargaron en los bolsillos del gel concentrador (acrilamida al 2%). Se inició la separación electroforética a 70 mV durante 20 min aproximadamente. Cuando el frente de corrida atravesó al gel separador (acrilamida al 15%) la corriente se elevó a 110 mV hasta que el frente de corrida llegó al final del gel en un tiempo promedio de 115 min. La solución de corrida de la electroforesis utilizada contenía 10% Tris-glicina 10X, 1% SDS 10% y 89% H₂O.

3.4 Western Blot

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a una electro-transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,2 μ m. Esta transferencia se realizó durante 80 min a 350 mA a 4°C. La solución de transferencia constó de 10% Tris-glicina 10X, 20% metanol al 70% y 70% H₂O. Para finalizar el procedimiento se confirmó la adecuada transferencia de proteínas por medio de una tinción de rojo Ponceau de la membrana. Posteriormente, se bloquearon las membranas con leche libre de grasas disuelta en PBS al 5% p/v durante 1 hora temperatura ambiente y agitación suave.

Tras finalizar el bloqueo, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios diluidos a una concentración 1:1000 en solución de bloqueo durante 15 horas a 4°C en agitación lenta (**Tabla 1**). Para la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HRP), se realizó una dilución 1:3000 en leche libre de grasas al 5% p/v durante 1 hora. Finalmente se utilizó el sistema comercial de revelado Thermo Scientific™ Pierce™

Western Blot Signal Enhancer kit (#11836804) de Thermo Scientific (Rockford, IL, EEUU) y el equipo C-DiGit Blot Scanner (LI-COR).

Tabla 1: Anticuerpos utilizados, proteína recombinante y estándar de peso molecular

Anticuerpo	Antígeno	Fabricante
Cabra Anti-FGF23 C-terminal (186-206)	FGF23 C-terminal (186-206)	QUIDEL® #20-6110
Cabra Anti-FGF23 C-terminal (225-244)	FGF23 C-terminal (225-244)	QUIDEL® #20-6120
Ratón monoclonal anti-FGF23 N-terminal	FGF23 N-terminal	QUIDEL® #20-6610
Ratón anti-cabra	IgG Cabra	Abcam # ab157532
Conejo anti-ratón	IgG Ratón	Abcam # ab6728
FGF23 humano recombinante		Abcam # ab283482
Estándar de peso molecular		Thermo Scientific™ # 26620

4.Resultados

4.1 Reconocer FGF23 intacto en muestras de plasma humano por medio de un ensayo de inmunodetección

4.1.1 Estandarización de la técnica

En trabajos anteriores [25,26,39] la detección de FGF23 en plasma se realizó por medio de una inmunoprecipitación y posterior inmunodetección. Para esta memoria se realiza un ensayo de Western blot directamente para alterar al mínimo la estabilidad de la muestra.

Los anticuerpos utilizados en esta memoria derivan de los anticuerpos del sistema comercial ELISA de QUIDEL®. Este sistema comercial es ampliamente aplicado a muestras de plasma sanguíneo para realizar la cuantificación de la proteína FGF23 intacta.

La cuantificación de FGF23 es una medición muy utilizada para evaluar los niveles de este factor en el contexto de la enfermedad renal crónica, tanto en estudios básicos como clínicos. Gracias a estas investigaciones sabemos que FGF23 es una proteína circulante en el plasma. Además, las diferencias en concentraciones que se observan con los distintos ELISA para medir FGF23 intacta y el fragmento FGF23 C-terminal indican que no solo circula la proteína intacta, sino que en el plasma también se encuentra en forma independiente como péptido su porción C-terminal.

Los valores de cada uno además son independientes entre sí y difieren dependiendo según las distintas patologías que presentan los pacientes. Los anticuerpos de este ELISA se encuentran unidos a biotina y/o a HRP, ambas modificaciones que se requieren para la realización de un ensayo de ELISA. Sin embargo, en otras técnicas no es necesario la unión a estas moléculas, por lo que fueron modificados.

Para ser utilizados en otras técnicas de inmunodetección, se les retiró estas moléculas adicionales y mantienen el reconocimiento de los mismos epítomos. En este ensayo se utilizaron los anticuerpos modificados para una técnica de Western Blot, en donde se busca el reconocimiento de la proteína y la estimación de su peso molecular.

Para este trabajo se utilizaron muestras de sangre humana, a las cuales solo se les realizó una separación de fases, para extraer el plasma, mantención de las muestras a -80°C y posterior dilución de las muestras en PBS. Conservando la estabilidad de la muestra.

FGF23 intacto posee un peso molecular alrededor de 25 - 28 kDa y el fragmento C-terminal de FGF23 fluctúa entre los 12 - 15 kDa. Al tratar con moléculas de tan bajo peso molecular, es necesario obtener una transferencia a la membrana íntegra y eficaz. Con este propósito se realizaron modificaciones en dos parámetros:

- A) Se comienza el experimento con una transferencia de 70 min a 350 mA, como se observa en la **figura 7a** y se decide modificar el tiempo de transferencia a 90 min (**Figura 7b**) para realizar transferencia más exhaustiva de las proteínas.

- B) En segundo lugar, para lograr una mayor definición en las bandas transferidas, se realizó un cambio en la estructura del sándwich: se aumenta la cantidad de filtros de esponja, con lo que se aumenta la presión entre el gel y la membrana, permitiendo una mayor eficiencia en la transferencia, aumentando su definición (**Figura 8**).

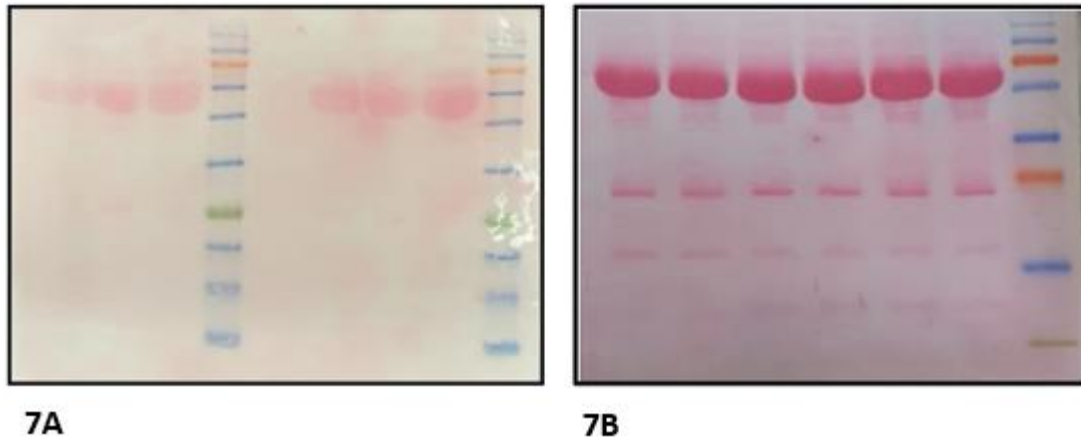


Figura 7: Patrón de electroforesis plasma humano de membranas obtenidas con diferentes tiempos de transferencia. En la figura se muestran las proteínas transferidas a la membrana gracias a la tinción con rojo ponceau. Se observa también el patrón de peso molecular utilizado en cada ensayo. Se observa una gran concentración de proteínas de un peso alrededor de los 50kDa, este patrón es característico de muestras de plasma en donde la proteína de 50kDa observada es la albumina. En la figura se comparan las membranas obtenidas a distintos tiempos de transferencia (A) membrana obtenida con una transferencia de 70 min a 350 mA (B) membrana obtenida mediante una transferencia de 90 min a 350 mA

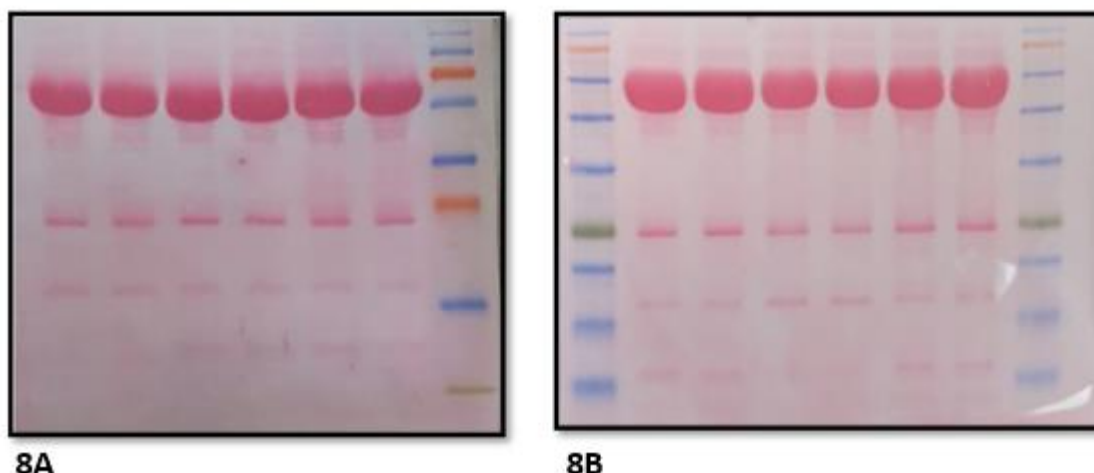


Figura 8: Patrón de electroforesis plasma humano de membranas obtenidas con diferente estructura de “sándwich” de transferencia. En la figura se muestran las proteínas transferidas a la membrana gracias a la tinción con rojo ponceau. Se observa también el patrón de peso molecular utilizado en cada ensayo. Se comparan las membranas obtenidas en la transferencia durante 90 min a 350 mA. En la figura (A) con un solo filtro por lado en el “sándwich”. (B) Transferencia durante 90 min a 350 mA con dos filtros por lado en el “sándwich”

4.1.2 Anticuerpos y reconocimiento de FGF23 intacto

En este trabajo se utilizan 3 anticuerpos distintos, quienes reconocen distintas porciones de FGF23. Como se observa en la **figura 9**, los anticuerpos van dirigidos a distintos epítetos de FGF23 intacta, con lo cual se espera que la molécula reconocida es nuestra molécula de interés. Los anticuerpos utilizados se especifican en la **Tabla 1**.



Figura 9: Esquema del sitio de reconocimiento de los anticuerpos en FGF23. En la figura se muestran los epítetos reconocidos por los distintos anticuerpos utilizados en esta memoria. FGF23 N-terminal, FGF23 C-terminal 186-206, FGF23 C-terminal 225-244. Imagen propia.

Para determinar la efectividad de la detección de FGF23 intacto, en primer lugar, se empleó un anticuerpo que reconoce la porción N-terminal de FGF23 (**figura 10**). Se observa una banda de alrededor de 25 kDa, la cual consistentemente es reconocida tanto por los anticuerpos N-terminal como por los anticuerpos que reconocen la porción C-terminal. Además, como se observa en la **figura 10**, las bandas varían en intensidad. Esto se interpreta como una diferencia en sus cantidades relativas, las cuales difieren en concordancia con las muestras de plasma cargadas y las cantidades se correlacionan con el daño renal presentado en los pacientes. Esto sugiere que la molécula que se reconoce en los 25 kDa corresponde a FGF23 intacto.

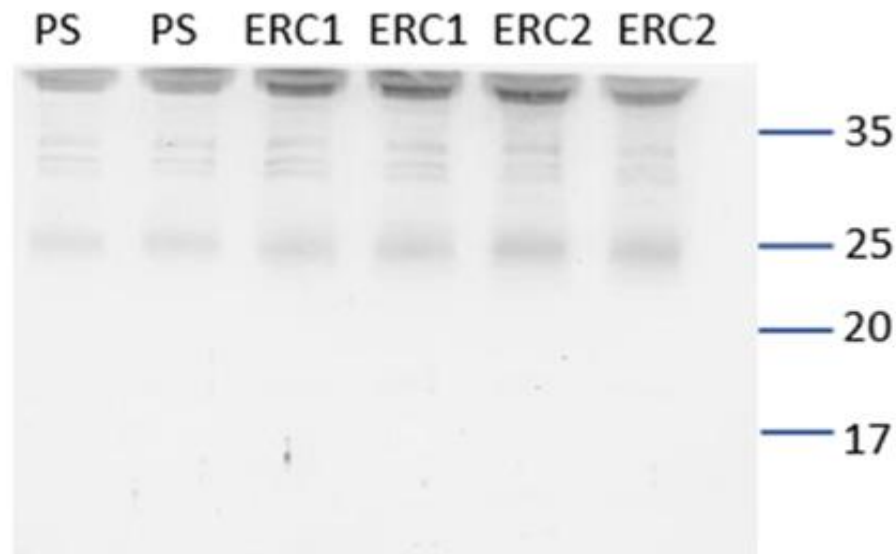


Figura 10: Reconocimiento de FGF23 en plasma por medio del anticuerpo primario FGF23 N-terminal monoclonal. Se observa una banda de 25 kDa, la cual es reconocida en todas las muestras. La proteína reconocida coincide con las características de peso molecular esperado. Se observa una variación en la intensidad de las bandas, lo que nos indica diferencias en la concentración de proteínas reconocidas por el anticuerpo, estas variaciones coinciden con el deterioro renal de los distintos pacientes, lo que nos confirma que la proteína reconocida es FGF23. PS: paciente sano; ERC1: paciente 1 en ERC diálisis dependiente; ERC2: paciente 2 en ERC diálisis dependiente.

4.2 Reconocimiento de FGF23 C-terminal en muestras de plasma por medio un ensayo de inmunodetección de anticuerpos específicos para la porción C-terminal de la proteína.

Para determinar la presencia de fragmentos C-terminales de FGF23, se realiza una electroforesis y una transferencia lenta, controlada y exhaustiva. Lo que nos permite una buena separación y la detección de proteínas de bajo peso molecular. En la **figura 9** se muestran los epítomos que serán reconocidos por los anticuerpos empleados para la detección de FGF23 C-terminal, un anticuerpo reconoce el segmento entre los aminoácidos 186 y 206 de la cadena y, el otro, reconoce entre en el segmento 225-244. Para complementar el resultado se utilizó un recombinante de FGF23 para asegurarnos que el motivo reconocido por los anticuerpos era el mismo que un estándar de FGF23.

En el ensayo, Se identifican bandas alrededor de los 19 kDa que son reconocidas por ambos anticuerpos y demuestran la presencia de un fragmento C-terminal circulante en el plasma en conjunto FGF23 intacto. Este fragmento posee el segmento de unión a Klotho, reconocido por el anticuerpo C-terminal 186-206 (**figura 11**) y la cola C-terminal que es reconocida por el anticuerpo 225-244 (**figura 12**), el fragmento reconocido, posee un peso molecular aproximado de 19kDa.

Según el peso predicho por la cadena aminoacídica de la molécula, este fragmento C-terminal contiene gran parte de la zona de homología a FGF, pero no completa. Esta banda de 19kDa corresponde al fragmento detectado por los ensayos de ELISA QUIDEL® FGF23 C-terminal, cuyos resultados se utilizan ampliamente en la literatura de FGF23.

Con este resultado se infiere que el fragmento de C-terminal de 19kDa, posee la cola C-terminal, la secuencia de unión a Klotho, además de unos 80 aminoácidos los cuales son parte de la zona de homología FGF. Esta estructura es un estimado, se esperaba completar este trabajo con una espectrometría de masas, para obtener con exactitud tanto la longitud de la cadena, como el sitio de corte del fragmento C-terminal, sin embargo, esos ensayos no se han podido concretar hasta el momento de la entrega de esta memoria.

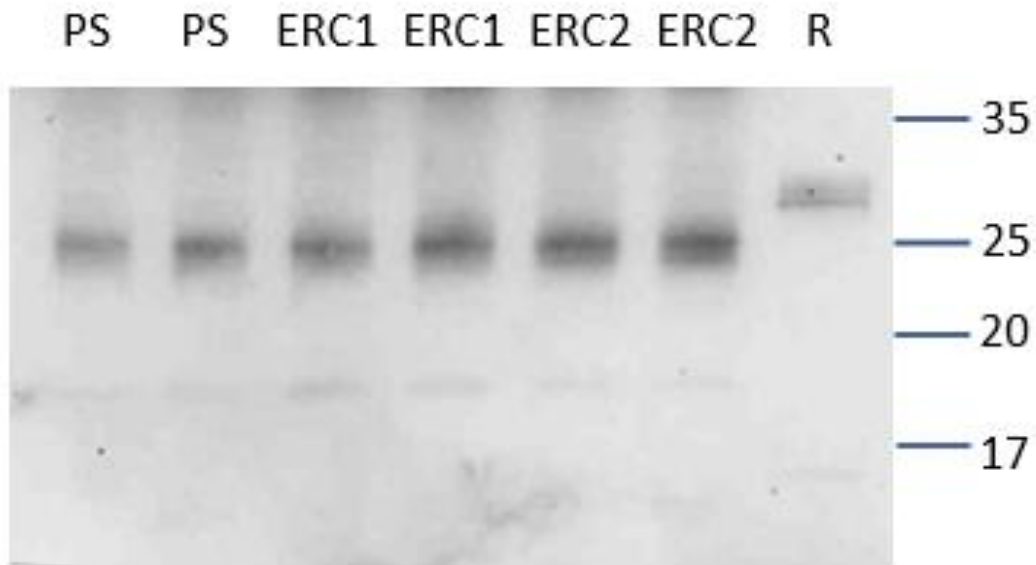


Figura 11: Reconocimiento de FGF23 y cFGF23 en plasma por medio del anticuerpo primario FGF23 C-terminal 186-206. Se observa una banda en los 25kDa, también tenemos la detección de una banda en el recombinante, por lo que estas bandas corresponden a FGF23 intacto. Además, se observa claramente una banda más débil alrededor de los 19kDa, esta banda corresponde a la porción C-terminal de FGF23. R: recombinante (control) FGF23; PS: paciente sano; ERC1: paciente 1 en ERC diálisis dependiente; ERC2: paciente 2 en ERC diálisis dependiente.

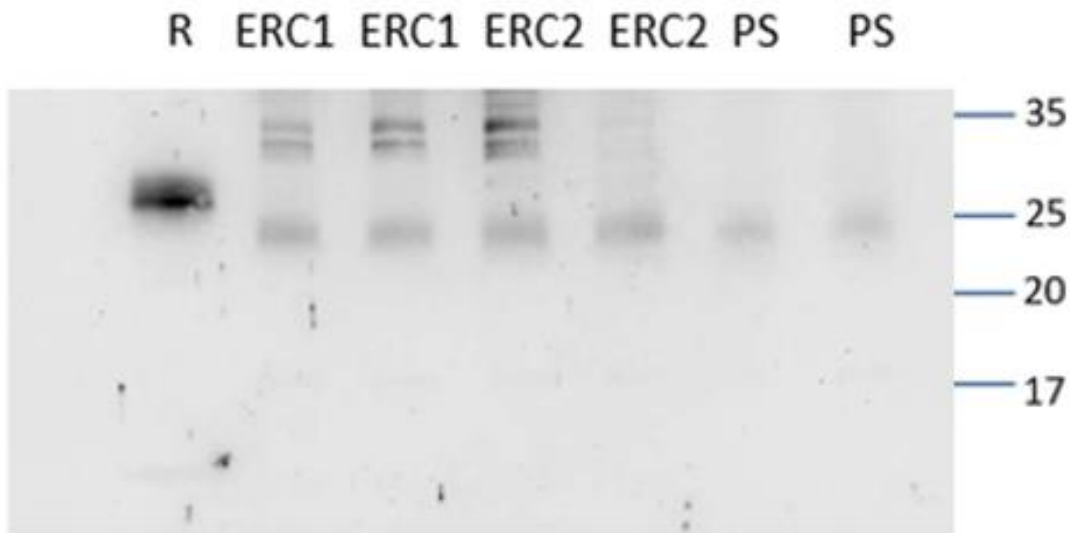


Figura 12. Reconocimiento de FGF23 y cFGF23 en plasma por medio del anticuerpo primario FGF23 C-terminal 225-244. Se observa una banda a los 25kDa que corresponde a FGF23 intacto. La banda más débil alrededor de los 19kDa corresponde a la porción C-terminal de FGF23. R: FGF23 recombinante (control); PS: paciente sano; ERC1: paciente 1 con ERC diálisis dependiente; ERC2: paciente 2 con ERC diálisis dependiente.

4.3 Determinación del peso molecular y estimación del sitio de corte en la secuencia aminoacídica del fragmento C-terminal de FGF23 circulante en plasma sanguíneo.

La realización de este proyecto se vio dificultada por motivos sanitarios, por la aparición del virus SARS-COV-2, por lo que el último objetivo de esta memoria no se alcanzó a concretar. Sin embargo, se espera que la determinación del peso molecular de FGF23 C-terminal se realice por medio de una espectrometría de masas. Al dilucidar la estructura por medio de esta técnica, se puede comparar con la secuencia ya descrita de FGF23 intacto, esto nos entregará información sobre el sitio de corte. Con esto, determinar el peso molecular exacto del fragmento, además de realizar ensayos de funcionalidad y determinar si posee alguna actividad biológica o no.

5. Discusión

FGF23 es una de las principales proteínas reguladoras de la homeostasis mineral de nuestro organismo que se encuentra circulando en el plasma actuando principalmente como una fosfatonina a nivel renal. Esta proteína posee una secuencia altamente conservada $^{176}\text{RHTRSAE}^{182}$ la cual es reconocida como sitio de corte de proteasas del tipo SPC (furinas). Esta secuencia fue encontrada por medio de secuenciación y modelos *in silico* [39], y se demostró que la furina es capaz de realizar el corte en $\text{R}^{179}/\text{S}^{180}$ [26,39].

Los fragmentos caracterizados como este FGF23 C-terminal de 72 aminoácidos producto del corte con esta proteasa, tienen un peso molecular entre 12 kDa y 15 kDa [25,26,39,42]. Si el fragmento C-terminal posee 72 aminoácidos y cada aminoácido tiene un valor de 110 kDa en promedio, el peso molecular de esta cola C-terminal debería estar alrededor de los 9 o 10 kDa. Como en ensayos de distintos grupos las condiciones de síntesis de FGF23 se hacen en condiciones totalmente controladas y se realiza la detección por medio de ensayos de inmunoprecipitación [25,26,39], este segmento de aproximadamente 15 kDa solo posee su secuencia aminoacídica sin modificaciones postraduccionales y, por tanto, estos resultados son insuficientes para concluir que la secuencia de FGF23 C-terminal posee solo 72 aminoácidos.

En estos estudios anteriores, el fragmento C-terminal de FGF23 y su caracterización se encuentran en un segundo plano, ninguno de los autores ha indagado más allá en esta discordancia en pesos moleculares, por lo que como equipo de investigación decidimos atender esta pregunta.

5.1 Estandarización de Western Blot

El western blot o inmunoblot, es una técnica de inmunodetección y semicuantificación de proteínas específicas en homogenizados celulares complejos, descrito por primera vez en 1979 por Towbin et al [49], es un proceso que involucra la transferencia de proteínas desde un gel a una membrana (*blotting*), para luego, por medio de la utilización de anticuerpos específicos unidos a distintos mecanismos de revelado, se realiza la detección de la proteína de interés.

La primera parte del ensayo implica la realización de una electroforesis, en donde las proteínas del homogeneizado son separadas de acuerdo a su peso molecular, por medio de la aplicación de un campo eléctrico en gel, lo que nos entrega un peso molecular estimado de las proteínas detectadas. Para esta memoria, se prepararon geles SDS-PAGE con una concentración al 15% de acrilamida. La alta concentración de poliacrilamida permite una adecuada separación de proteínas de bajo peso molecular, como nuestras proteínas de interés, FGF23 (25kDa) y FGF23 C-terminal (19 kDa).

La segunda parte del ensayo, el *blotting*, consta de la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana. En este caso se utilizaron membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro 0.2 mm. Esta membrana puede sustentar a las proteínas y les otorga una mayor estabilidad que el gel y nos facilita la unión de los anticuerpos a la proteína para seguir con los experimentos [49]. El tamaño de poro tiene relación con el tamaño de proteínas que queremos transferir, en este caso, es el mínimo, lo que nos permite la captura de proteínas o péptidos muy pequeños.

5.1.1 Normalización por volumen

La normalización por concentración de proteínas se obtiene por medio de la detección de proteínas que poseen un patrón de expresión constante en la célula o tejido a utilizar, denominadas “*housekeeping*”, como la tubulina o actina. Sin embargo, en plasma humano no se encuentran proteínas con estas características de expresión.

Por otro lado, en pacientes en ERC las proteínas plasmáticas cambian frecuente e independientemente de la concentración de FGF23. La albumina, la proteína más abundante del plasma, posee una concentración que varía entre los 3.4 a 5.4 g/dL (de 34 a 54 g/L) en individuos sanos [1]. Esta variación se ve aumentada en pacientes en ERC, siendo la albumina la proteína con mayores cambios en su concentración. Estas variaciones no solo difieren entre individuos sanos y enfermos, sino que también en el mismo individuo en el tiempo de progreso de la enfermedad.

Además, FGF23 posee una concentración muy baja comparada con la concentración de albúmina del plasma, una normalización por concentración de proteína nos entrega datos erróneos sobre la concentración de FGF23 en plasma humano, dado que los volúmenes de carga del gel cambiarían en forma dependiente de las concentraciones de albúmina encontradas en cada sujeto en el estudio y no en función de la concentración de

FGF23 en la muestra. Por lo tanto, en esta memoria, la normalización se realizó por volumen de plasma homogeneizado cargado en cada bolsillo del gel.

5.1.2 Tiempos de transferencia

Se realizó la transferencia a distintos tiempos para lograr una estandarización, obtener una mejor resolución y disminuir el ruido del revelado. En primera instancia, se utilizó un tiempo de transferencia de 70 min a 350 mA, lo cual nos entregó bandas difusas, como se observa en la **Figura 7A**. Para solucionar este problema se decidió aumentar el tiempo de transferencia a 90 min, manteniendo el amperaje. En estas condiciones se obtuvo una transferencia de proteínas de bajo peso molecular mucho más eficiente y de bandas de mayor nitidez (**figura 7B**). Sin embargo, para lograr una mayor resolución en la técnica, se decidió aumentar la presión en la cámara de transferencia ocupando un segundo filtro para la transferencia, con lo que se logró una membrana clara y definida como se observa en la **figura 8B**. Esta definición en la transferencia es necesaria, debido a que las moléculas estudiadas poseen un bajo peso molecular y una exigua concentración en el plasma, por tanto, se requiere una optimización de la técnica para lograr los resultados esperados.

La tinción con rojo Ponceau revela un patrón característico de proteínas del plasma. Con esto, se confirma la estabilidad de las proteínas en la muestra utilizada. Esta confirmación es necesaria para proseguir con los experimentos, ya que la degradación de proteínas podría generar falsos positivos por la proteólisis y consecuente reconocimiento de estos fragmentos proteicos por parte de los anticuerpos utilizados, provocando falsos positivos que nos lleven a conclusiones erróneas.

5.2 Caracterización FGF23 C-terminal

En este trabajo, nuestros ensayos detectan una proteína de 19 kDa la cual es reconocida por los anticuerpos C-terminal 186-206 y 225-244. Esta proteína posee regiones de interés, como el sitio de unión a Klotho, la cola C-terminal, además de una parte de la región N-terminal de FGF23 intacto, que incluye parte de la región de homología FGF.

Proponemos que el fragmento FGF23 C-terminal circulante en el plasma humano tiene un peso de 19kDa y el sitio de corte involucrado es uno distinto al ¹⁷⁶RHTR¹⁷⁹/S¹⁸⁰AE¹⁸² anteriormente descrito. Nuestros resultados indican que tanto en pacientes sanos como en pacientes con enfermedad renal crónica se observa la presencia de este fragmento C-

terminal de 19 kDa. Por tanto, se infiere que la molécula detectada sufre los mismos procesos postraduccionales en individuos sanos como en pacientes con enfermedad renal crónica. Entonces FGF23c es un componente estándar del plasma, y podría ser un participante activo en este sistema, inhibiendo la acción de iFGF23.

El trabajo realizado en esta memoria es la primera parte de una investigación sobre la función biológica que este fragmento C-terminal de FGF23 posee. En estos momentos, en nuestro grupo de laboratorio se está realizando un proyecto FONDEF que busca un biomarcador combinado para el diagnóstico de insuficiencia renal aguda (IRA), otra de las enfermedades en donde se observa un pronunciado aumento tanto de FGF23 intacto como FGF23 C-terminal. Este biomarcador combinado corresponde a la estandarización de parámetros que sufren variaciones en IRA, como lo son la alza en la concentración de FGF23 y la baja en la concentración de Klotho y eritropoyetina.

En la literatura se describe que cuando estamos frente a un daño renal se observa un aumento en la concentración de cFGF23, al igual que iFGF23. Además, este aumento se produce con anterioridad a la variación de parámetros ya descritos como marcadores de enfermedad, como el eGFR o creatinina [1]. Por esta razón es muy importante evaluar la función de este fragmento para así determinar su participación en esta triada de diagnóstico.

La información recabada por distintos grupos de investigación [2,4,5] concluye que FGF23 es una proteína que circula en nuestro torrente sanguíneo que posee diversas funciones. Los ensayos de ELISA de otras investigaciones y nuestros resultados muestran que el fragmento C-terminal también se encuentra circulando en plasma. Además, existen estudios de funcionalidad de la cola de 72 aminoácidos que indican que este fragmento podría cumplir una función de inhibición de FGF23 intacta. Competiendo y generando un impedimento estérico en la unión a su cofactor, Klotho, sin generar respuesta fisiológica [25].

Por otro lado, el aumento de la concentración de iFGF23 en plasma se produce en etapas tempranas de ERC, debido a la necesaria mantención del balance mineral en nuestro organismo. Posteriormente esta elevación en la concentración de iFGF23, es mucho mayor y este solo argumento de la mantención del balance mineral no es suficiente para explicar esta alza. Una manera de comprenderlo es que este incremento en la concentración de

iFGF23 está estrechamente relacionado con una menor eficiencia en la actividad proteica; y, por tanto, una inhibición provocada por su fragmento C-terminal [25] o por la baja en la expresión de Klotho [29] en estadios más avanzados de la enfermedad.

Estos factores serían los responsables de los grandes aumentos de iFGF23 observados en pacientes con enfermedad renal crónica. En donde, la concentración de iFGF23 alcanza niveles hasta mil veces más altos que sus valores normales, aumento que no se ve reflejado en la actividad de la proteína. Es muy importante describir si existe una inhibición por parte de este fragmento de 19kDa circulante y que tipo de inhibidor es este cFGF23, para tener más antecedentes que permitan explicar esta elevación de FGF23 en enfermedad renal crónica.

5.3 Proyecciones futuras

La molécula de 19 kDa que se describe en esta memoria, posee tanto el sitio de unión a Klotho como una parte del dominio de homología FGF, sitio encargado de la activación del receptor FGFR. Para completar la caracterización y confirmar la secuencia aminoacídica de la proteína, son necesarios análisis por espectrometría de masas, además de un estudio cuantitativo de la expresión de cFGF23. Ambas aproximaciones estaban contempladas para la realización de esta memoria, sin embargo, fueron objetivos que no se pudieron realizar debido a la imposibilidad de trabajar en el laboratorio por la pandemia del virus SARS-COV-2.

En un trabajo futuro, como grupo proponemos la necesidad de realizar ensayos en donde se determine si este dominio cFGF23 de 19 kDa inhibe a la proteína FGF23 intacta. También es de interés investigar la inhibición producida por esta interacción. Proponemos una inhibición de tipo competitiva, lo que explicaría el aumento exacerbado en la expresión de FGF23 en ERC. Para demostrarlo, es necesario realizar ensayos en líneas celulares sensibles a la acción de FGF23.

La construcción de una curva dosis-respuesta nos entregará la concentración necesaria de FGF23 que provoca una respuesta en el receptor. Los parámetros que dan cuenta de la actividad de FGF23 pueden ser la expresión de mRNA de cotransportadores de Na-Pi en células RPTEC/TERT1 [50], línea celular de células del túbulo proximal. También es posible

observar su acción sobre la síntesis de PTH en células RCPTH [51], línea celular de células de la paratiroides.

En el ensayo debemos comparar la actividad cuando estimulamos las células solo con iFGF23 y cuando las estimulamos con iFGF23 y cFGF23 en conjunto. Es indispensable evaluar el porcentaje de inhibición y observar si es posible desplazar al inhibidor (en este caso FGF23 C-terminal) con una cantidad en exceso de la concentración de iFGF23, lo que permite determinar si la inhibición es competitiva o no.

Estos ensayos nos entregarían detalles que ayudarían a comprender el aumento en la concentración de iFGF23 en enfermedad renal crónica. Estos resultados ayudarían a sustentar nuestro sistema de diagnóstico, exponiendo una razón al alza de iFGF23 y, por tanto, la transversalidad de su aumento en los pacientes con enfermedad renal crónica.

Conclusiones

A partir del análisis teórico y del trabajo experimental desarrollado en esta memoria, las conclusiones son:

1. Se logró el reconocimiento directo de FGF23 intacto en muestras de plasma humano.
2. El fragmento C-terminal de FGF23 fue reconocido por los anticuerpos específicos para la porción C-terminal de FGF23 en muestras de plasma humano.
3. Se observó que el fragmento C-terminal reconocido por los anticuerpos utilizados es de aproximadamente 19 kDa y se estima que el sitio en donde se produce el corte proteolítico se encuentra dentro del dominio FGF de FGF23.

5) Referencias

- [1] Liv, J. C., & Zhang, L. X. (2019). Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, 1165, 3–15. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_1
- [2] Bhattacharyya, N., Chong, W. H., Gafni, R. I., & Collins, M. T. (2012). Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(12), 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.07.002>
- [3] Dolegowska, K., Marchelek-Mysliwiec, M., Nowosiad-Magda, M., Slawinski, M., & Dolegowska, B. (2019). FGF19 subfamily members: FGF19 and FGF21. *Journal of physiology and biochemistry*, 75(2), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00675-7>
- [4] Chen, G., Liu, Y., Goetz, R., Fu, L., Jayaraman, S., Hu, M. C., Moe, O. W., Liang, G., Li, X., & Mohammadi, M. (2018). α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature*, 553(7689), 461–466. <https://doi.org/10.1038/nature25451>
- [5] Gattineni, J., Bates, C., Twombly, K., Dwarakanath, V., Robinson, M. L., Goetz, R., Mohammadi, M., & Baum, M. (2009). FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297(2), F282–F291. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90742.2008>
- [6] Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S., & Yamashita, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19(3), 429–435. <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301264>
- [7] Krajisnik, T., Björklund, P., Marsell, R., Ljunggren, O., Akerström, G., Jonsson, K. B., Westin, G., & Larsson, T. E. (2007). Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *The Journal of endocrinology*, 195(1), 125–131. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0267>

- [8] Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annual review of physiology*, 82, 485–506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>
- [9] Pereira, R. C., Juppner, H., Azucena-Serrano, C. E., Yadin, O., Salusky, I. B., & Wesseling-Perry, K. (2009). Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone*, 45(6), 1161–1168. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.08.008>
- [10] Meir, T., Durlacher, K., Pan, Z., Amir, G., Richards, W. G., Silver, J., & Naveh-Many, T. (2014). Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney international*, 86(6), 1106–1115. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.215>
- [11] Nguyen-Yamamoto, L., Karaplis, A. C., St-Arnaud, R., & Goltzman, D. (2017). Fibroblast Growth Factor 23 Regulation by Systemic and Local Osteoblast-Synthesized 1,25-Dihydroxyvitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 28(2), 586–597. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010066>
- [12] Perwad, F., Azam, N., Zhang, M. Y., Yamashita, T., Tenenhouse, H. S., & Portale, A. A. (2005). Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology*, 146(12), 5358–5364. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0777>
- [13] 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, A. M., Elorza, A. A., Pinto, M. E., Alzamora, R., Romero, C., & Michea, L. (2018). Erythropoietin induces bone marrow and plasma fibroblast growth factor 23 during acute kidney injury. *Kidney international*, 93(5), 1131–1141. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.11.018>
- [14] Bon, N., Frangi, G., Sourice, S., Guicheux, J., Beck-Cormier, S., & Beck, L. (2018). Phosphate-dependent FGF23 secretion is modulated by PiT2/Slc20a2. *Molecular metabolism*, 11, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.007>
- [15] Takashi, Y., & Fukumoto, S. (2020). Phosphate-sensing and regulatory mechanism of FGF23 production. *Journal of endocrinological investigation*, 43(7), 877–883. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01205-9>
- [16] Larsson, T., Nisbeth, U., Ljunggren, O., Juppner, H., & Jonsson, K. B. (2003). Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney

disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney international*, 64(6), 2272–2279. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00328.x>

[17] van Vuren, A. J., Gaillard, C., Eisenga, M. F., van Wijk, R., & van Beers, E. J. (2019). The EPO-FGF23 Signaling Pathway in Erythroid Progenitor Cells: Opening a New Area of Research. *Frontiers in physiology*, 10, 304. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00304>

[18] Ito, N., Wijenayaka, A. R., Prideaux, M., Kogawa, M., Ormsby, R. T., Evdokiou, A., Bonewald, L. F., Findlay, D. M., & Atkins, G. J. (2015). Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli. *Molecular and cellular endocrinology*, 399, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.10.007>

[19] Agoro, R., Ni, P., Noonan, M. L., & White, K. E. (2020). Osteocytic FGF23 and Its Kidney Function. *Frontiers in endocrinology*, 11, 592. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00592>

[20] Bär, L., Feger, M., Fajol, A., Klotz, L. O., Zeng, S., Lang, F., Hocher, B., & Föller, M. (2018). Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(22), 5804–5809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800160115>

[21] Yamashita, T., Yoshioka, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 277(2), 494–498. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3696>

[22] Murzin, A. G., Lesk, A. M., & Chothia, C. (1992). beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *Journal of molecular biology*, 223(2), 531–543. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90668-a](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90668-a)

[23] Goetz, R., Beenken, A., Ibrahim, O. A., Kalinina, J., Olsen, S. K., Eliseenkova, A. V., Xu, C., Neubert, T. A., Zhang, F., Linhardt, R. J., Yu, X., White, K. E., Inagaki, T., Kliewer, S. A., Yamamoto, M., Kurosu, H., Ogawa, Y., Kuro-o, M., Lanske, B., Razzaque, M. S., ... Mohammadi, M. (2007). Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and cellular biology*, 27(9), 3417–3428. <https://doi.org/10.1128/MCB.02249-06>

- [24] Richter, B., & Faul, C. (2018). FGF23 Actions on Target Tissues-With and Without Klotho. *Frontiers in endocrinology*, 9, 189. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00189>
- [25] Goetz, R., Nakada, Y., Hu, M. C., Kurosu, H., Wang, L., Nakatani, T., Shi, M., Eliseenkova, A. V., Razzaque, M. S., Moe, O. W., Kuro-o, M., & Mohammadi, M. (2010). Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 407–412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902006107>
- [26] Liu, S., Guo, R., Simpson, L. G., Xiao, Z. S., Burnham, C. E., & Quarles, L. D. (2003). Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *The Journal of biological chemistry*, 278(39), 37419–37426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304544200>
- [27] White, K. E., Carn, G., Lorenz-Depiereux, B., Benet-Pages, A., Strom, T. M., & Econs, M. J. (2001). Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney international*, 60(6), 2079–2086. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00064.x>
- [28] Hasegawa, H., Nagano, N., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Iijima, K., Fujita, T., Yamashita, T., Fukumoto, S., & Shimada, T. (2010). Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney international*, 78(10), 975–980. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.313>
- [29] Neyra, J. A., & Hu, M. C. (2017). Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone*, 100, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.017>
- [30] Isakova, T., Xie, H., Yang, W., Xie, D., Anderson, A. H., Scialla, J., Wahl, P., Gutiérrez, O. M., Steigerwalt, S., He, J., Schwartz, S., Lo, J., Ojo, A., Sondheimer, J., Hsu, C. Y., Lash, J., Leonard, M., Kusek, J. W., Feldman, H. I., Wolf, M., ... Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group (2011). Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA*, 305(23), 2432–2439. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.826>
- [31] Galitzer, H., Ben-Dov, I. Z., Silver, J., & Naveh-Many, T. (2010). Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney international*, 77(3), 211–218. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.464>

[32] Vogt, I., Haffner, D., & Leifheit-Nestler, M. (2019). FGF23 and Phosphate-Cardiovascular Toxins in CKD. *Toxins*, 11(11), 647. <https://doi.org/10.3390/toxins11110647>

[33] Desjardins, L., Liabeuf, S., Renard, C., Lenglet, A., Lemke, H. D., Choukroun, G., Drueke, T. B., Massy, Z. A., & European Uremic Toxin (EUTox) Work Group (2012). FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 23(7), 2017–2025. <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1838-0>

[34] Isakova, T., Wahl, P., Vargas, G. S., Gutiérrez, O. M., Scialla, J., Xie, H., Appleby, D., Nessel, L., Bellocich, K., Chen, J., Hamm, L., Gadegbeku, C., Horwitz, E., Townsend, R. R., Anderson, C. A., Lash, J. P., Hsu, C. Y., Leonard, M. B., & Wolf, M. (2011). Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney international*, 79(12), 1370–1378. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.47>

[35] Portale, A. A., Wolf, M., Jüppner, H., Messinger, S., Kumar, J., Wesseling-Perry, K., Schwartz, G. J., Furth, S. L., Warady, B. A., & Salusky, I. B. (2014). Disordered FGF23 and mineral metabolism in children with CKD. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 9(2), 344–353. <https://doi.org/10.2215/CJN.05840513>

[36] Gutiérrez, O. M., Mannstadt, M., Isakova, T., Rauh-Hain, J. A., Tamez, H., Shah, A., Smith, K., Lee, H., Thadhani, R., Jüppner, H., & Wolf, M. (2008). Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *The New England journal of medicine*, 359(6), 584–592. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706130>

[37] Isakova, T., Xie, H., Yang, W., Xie, D., Anderson, A. H., Scialla, J., Wahl, P., Gutiérrez, O. M., Steigerwalt, S., He, J., Schwartz, S., Lo, J., Ojo, A., Sondheimer, J., Hsu, C. Y., Lash, J., Leonard, M., Kusek, J. W., Feldman, H. I., Wolf, M., ... Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group (2011). Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA*, 305(23), 2432–2439. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.826>

[38] Bouma-de Krijger, A., de Roij van Zuijdewijn, C., Nubé, M. J., Grooteman, M., Vervloet, M. G., & CONTRAST Study Group (2020). Change in FGF23 concentration over time and its

association with all-cause mortality in patients treated with haemodialysis or haemodiafiltration. *Clinical kidney journal*, 14(3), 891–897. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa028>

[39] Isakova, T., Cai, X., Lee, J., Xie, D., Wang, X., Mehta, R., Allen, N. B., Scialla, J. J., Pencina, M. J., Anderson, A. H., Talierco, J., Chen, J., Fischer, M. J., Steigerwalt, S. P., Leonard, M. B., Hsu, C. Y., de Boer, I. H., Kusek, J. W., Feldman, H. I., Wolf, M., ... Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Investigators (2018). Longitudinal FGF23 Trajectories and Mortality in Patients with CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 29(2), 579–590. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017070772>

[40] Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wiley, S. E., Xiao, J., Gonzalez, D. J., Nidumanda Appaiah, H., Koller, A., Nizet, V., White, K. E., & Dixon, J. E. (2014). Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15), 5520–5525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402218111>

[41] Zhang, X., Guo, K., Xia, F., Zhao, X., Huang, Z., & Niu, J. (2018). cFGF23-tail improves diabetic nephropathy by attenuating renal fibrosis and inflammation. *BMC biotechnology*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0449-7>

[42] Brownstein, C. A., Zhang, J., Stillman, A., Ellis, B., Troiano, N., Adams, D. J., Gundberg, C. M., Lifton, R. P., & Carpenter, T. O. (2010). Increased bone volume and correction of HYP mouse hypophosphatemia in the Klotho/HYP mouse. *Endocrinology*, 151(2), 492–501. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0564>

[43] Shimada, T., Urakawa, I., Isakova, T., Yamazaki, Y., Epstein, M., Wesseling-Perry, K., Wolf, M., Salusky, I. B., & Jüppner, H. (2010). Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(2), 578–585. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1603>

[44] Wesseling-Perry, K., Pereira, R. C., Wang, H., Elashoff, R. M., Sahney, S., Gales, B., Jüppner, H., & Salusky, I. B. (2009). Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and bone mineralization in children with renal failure on peritoneal dialysis.

The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 94(2), 511–517.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-0326>

[45] Chudek, J., Kocęłak, P., Owczarek, A., Bożentowicz-Wikarek, M., Mossakowska, M., Olszanecka-Glinianowicz, M., & Wiecek, A. (2014). Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and early chronic kidney disease in the elderly. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29(9), 1757–1763. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu063>

[46] Smith, E. R., Cai, M. M., McMahon, L. P., & Holt, S. G. (2012). Biological variability of plasma intact and C-terminal FGF23 measurements. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(9), 3357–3365. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1811>

[47] Yamamoto, H., Ramos-Molina, B., Lick, A. N., Prideaux, M., Albornoz, V., Bonewald, L., & Lindberg, I. (2016). Posttranslational processing of FGF23 in osteocytes during the osteoblast to osteocyte transition. *Bone*, 84, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.12.055>

[48] Eren, M., Place, A. T., Thomas, P. M., Flevaris, P., Miyata, T., & Vaughan, D. E. (2017). PAI-1 is a critical regulator of FGF23 homeostasis. *Science advances*, 3(9), e1603259. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603259>

[49] Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

[50] Simon, B. R., Wilson, M. J., & Wickliffe, J. K. (2014). The RPTEC/TERT1 cell line models key renal cell responses to the environmental toxicants, benzo[a]pyrene and cadmium. *Toxicology reports*, 1, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.010>

[51] Cabané, P., Gac, P., Ramirez M., Rossi, R., Oviedo S., Romero C., Caviedes, P., Salazar-Onfray, F., Salazar, L., Lopez, M., Moyano, L., Caviedes R. (2013). Caracterización de línea celular de paratiroides humana (RCPTH) y evaluación de tumorigenicidad en ratones NOD/SCID. *Rev. chil. endocrinol. diabetes*, 6(2), 59-68.

[52] Ho, B. B., & Bergwitz, C. (2021). FGF23 signalling and physiology. *Journal of molecular endocrinology*, 66(2), R23–R32. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0178>