

“Epigenética del Hiperparatiroidismo Secundario”

Gonzalo Bedia Díaz
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral (HUCA)
Junio 2015
Master en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud
Universidad de Oviedo

RESUMEN:

Una consecuencia de la Enfermedad Renal Crónica (ERC) es la hiperplasia de la glándula paratiroides, también conocida como hiperparatiroidismo secundario (HPTs), y caracterizada por un incremento a nivel sistémico de los niveles de la parathormona (PTH) alterando la resorción y formación de hueso, y por tanto, afectando directamente al contenido mineral óseo, y con el tiempo, produce un aumento considerable de la morbi-mortalidad.

Los reguladores más importantes de la PTH son: la vitamina D, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), el fósforo y sobre todo, el más importante, el calcio. Se ha descrito que, a consecuencia del s-HPT, hay una disminución en la expresión del 80% de los genes en la glándula paratiroides. La justificación de esta regulación a la baja podría ser debida a mecanismos celulares englobados dentro de la "epigenética".

Los procesos epigenéticos son considerados hoy en día como los principales mediadores moleculares de la mayoría de los procesos de diferenciación y desarrollo de organismos superiores. La metilación del ADN es la modificación epigenética más estudiada y ocurre en citosinas que preceden a las guaninas, zonas conocidas como dinucleótidos CpGs, y suelen encontrarse en regiones concretas del genoma y en abundancia en lo que se conoce como islas CpG, en las zonas reguladoras de los genes, en el extremo 5'. Estas regiones no se encuentran metiladas en condiciones normales, pero en muchos procesos tumorales se ha demostrado que existe hipermetilación de estas regiones reguladoras de genes supresores de cáncer, causando su inactivación, pérdida de la expresión y de su función protectora ante el desarrollo de tumores.

El objetivo de este trabajo es confirmar si dicha regulación a la baja de determinados genes en s-HPT podría explicarse por la metilación del ADN. Los resultados obtenidos demuestran un patrón en el grado de metilación de cada gen en s-HPT.

SUMMARY:

One consequence of Chronic Kidney Disease (CKD) is the hyperplasia of the parathyroid gland, also known as secondary hyperparathyroidism (sHPT), and characterized by an increase in systemic levels of parathyroid hormone (PTH) altering bone remodelling, and thus directly affecting circulating levels of Calcium and phosphorous and over time, producing a significant increase in morbidity and mortality.

The most important regulators of PTH are: vitamin D, fibroblast growth factor 23 (FGF23), phosphorous and especially, the most important, calcium. It's been described that as a result of secondary hyperparathyroidism, there is a general decrease in the expression of 80% of genes in the parathyroid gland. The justification for this downregulation could be due to cellular mechanisms enshrined in the "epigenetic".

Epigenetic processes are considered today as the main molecular mediators of most processes of differentiation and development of higher organisms. DNA methylation is the most studied and occurs at cytosines epigenetic modification preceding guanines, areas known as dinucleotides CpGs, and usually found in specific regions of the genome and in abundance in what is known as CpG islands in regulatory areas gene, in the 5'end. These regions are unmethylated in normal conditions, but in many tumor processes have shown that there is hypermethylation of these regulatory regions of cancer suppressor genes, causing their inactivation and loss of expression of its protective function against tumor development.

The objective of this work is to confirm if the downregulation of certain genes in the sHPT is due to epigenetic DNA methylation process. The results show a pattern in the methylation grade of each gene in sHPT.

AGRADECIMIENTOS:

Aunque tan sólo ha sido un semestre y tengo mucha gente a la que dar las gracias, me gustaría empezar por Pablo ya que ha sido el que me ha brindado la oportunidad de hacer el TFM en el departamento de Metabolismo Óseo y Mineral, y ha sido mi guía y mentor durante el mismo. No sólo he aprendido un montón de cosas, sino que además me has abierto un mundo apasionante y al que espero dedicarme profesionalmente en un futuro.

Cómo no, a Jorge, jefe que siempre me ha tratado de tú a tú. A Manuel por estar siempre preocupado de mis logros y avances. A Jose Luis e Isa por estar ahí siempre que he tenido alguna duda. A Adriana por su continua cercanía, cariño, humildad y espíritu altruista. A Cris, Sara y Sara por estar siempre pendientes de ayudarme o contestar a todas las dudas que me iban surgiendo y a Natalia por guiarme y emplear gran parte de su tiempo. A Marisa por su cariño y siempre predisposición a bromear. A Guille y Laura por ser mis compañeros de batallas en el día a día lo que nos ha convertido ya en amigos.

Por último no me puedo olvidar de un grupo sin el cual, no habría avanzado tanto en este TFM: el Servicio de Epigenética del HUCA, en el que desde el primer al último integrante del mismo me han hecho sentir como en casa, como uno más. Y concretamente destacar a Cris ya que sin su inestimable ayuda me hubiese quedado atascado y sin obtener ningún resultado.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	13
1.a. Hiperparatiroidismo Secundario:	13
1.b. Epigenética:	16
1.c. Hipótesis y objetivos del TFM:	19
1.c.1 Hipótesis:.....	19
1.c.2 Objetivos:.....	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.a. Materiales:	21
2.a.1 Reactivos.....	21
2.a.2 Equipamiento:.....	22
2.a.3 Líneas celulares “in vitro”:	23
2.a.4 Muestras “in vivo”:	23
2.b. Métodos:	25
2.c. Análisis estadístico	29
3. RESULTADOS	31
4. DISCUSIÓN	35
5. CONCLUSIONES	39
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ABREVIATURAS

5-mC: 5-metilcitidina
°C: grados centígrados
ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
Ca: calcio
CaSR: receptor sensor de calcio
DNMT: ADN metiltransferasa
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERC: enfermedad renal crónica (CKD: Chronic Kidney Disease)
FGF23: factor crecimiento fibroblástico 2
FGFR: receptor del factor de crecimiento
h: hora
IRC: insuficiencia renal crónica
M: molar
MAPK: quinasas activadas por mitógeno
mg: miligramos
min: minutos
mL: mililitro
mM: milimolar
MT: temperatura de fusión
MT_i: temperatura de fusión individual del primer
MT_f: temperatura de fusión del par de primers
μL: microlitro
ng: nanogramos
NaCl: cloruro sódico
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pg: picogramos
PLG: phase lock gel
PTH: hormona paratiroides o parathormona
rpm: revoluciones por minuto
RXR: receptor X retinoico
HPTs: hiperparatiroidismo secundario
SDS: dodecilsulfato sódico
s: segundos
T^a: temperatura
TAE: tris-acetato-EDTA
TGF-α: factor transformador de crecimiento α
TFM: trabajo de fin de master
VDR: receptor de Vitamina D

1. INTRODUCCIÓN

1.a. Hiperparatiroidismo Secundario:

Durante el desarrollo de la enfermedad renal crónica (ERC), la glándula paratiroides presenta con frecuencia una hiperfunción e hiperplasia, lo que provoca un aumento de la parathormona (PTH) a nivel sistémico. Con el paso del tiempo, se han identificado diferentes factores que promueven el desarrollo del hiperparatiroidismo secundario (HPTs) provocando un aumento importante de la morbi-mortalidad en pacientes estadíos avanzados de ERC (1).

Uno de los primeros factores descritos como causante del HPTs ha sido la hipocalcemia (2), ya que los niveles de calcio pueden verse alterados por distintas causas, pero la principal es el descenso de la síntesis de calcitriol (vitamina D en su forma activa) a consecuencia del incremento del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) y de la inhibición de la actividad además de disminución de la expresión de 1- α -hidroxilasa a nivel del túbulo renal debido a la pérdida de parénquima renal funcional (2-3). Al disminuir el calcitriol, se reduce la absorción intestinal de calcio y se favorece, en consecuencia, su descenso a nivel plasmático. Esto estimula la síntesis y secreción de PTH en las glándulas paratiroides la cual ejerce su efecto hormonal de manera directa en riñón y hueso, y de manera indirecta a nivel intestinal a través del calcitriol estimulando mecanismos que intentan normalizar el calcio sérico. A su vez, el calcitriol también tiene un efecto supresor sobre la síntesis de PTH (4-5).

Otro factor relevante es el fósforo ya que se ha comprobado que inhibe la síntesis de 1- α -hidroxilasa renal, y con ello, la síntesis de calcitriol (6-7). Pero también se ha demostrado que el fósforo tiene un efecto directo, e independiente del calcio, sobre la síntesis de PTH ya que estabiliza al ARNm del mismo (2, 7-8) y la proliferación celular de la glándula paratiroides (9-10).

Así, la regulación de la PTH es un mecanismo en el que intervienen diversos factores como calcio, calcitriol, fósforo y FGF23.

Principales factores reguladores de la PTH:

El **calcio** iónico extracelular es el principal regulador de la función paratiroidea. Niveles bajos estimulan con rapidez la secreción de PTH (11), mientras que niveles elevados inhiben en cuestión de segundos la liberación de esta hormona y favorece su degradación dentro de las propias células paratiroideas. Esto es debido a que el calcio actúa sobre un receptor sensor en la membrana, el receptor sensor de calcio (CaSR) (12), de las células paratiroideas siendo capaz de regular la secreción de PTH en función de los niveles de calcio extracelular. Cuando éste se encuentra en valores elevados provoca la activación de la fosfolipasa C vía CaSR, de manera que al final de la cascada de señalización se reducen los niveles de AMP cíclico provocando una modificación en la transcripción del gen de la PTH inhibiéndose así la síntesis y secreción de PTH.

La activación del CaSR tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de la glándula paratiroides existiendo una relación inversa entre la hiperplasia de dicha glándula, y los niveles de ARNm y proteína de CaSR, de ahí la importancia que tienen los descensos del CaSR en el desarrollo, progresión y función de las glándulas paratiroides en la ERC.

La **vitamina D activa (calcitriol)** tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de PTH, disminuyendo a nivel transcripcional la síntesis de ARNm de PTH actuando sobre la glándula paratiroides a través de su receptor específico, el receptor de vitamina D (VDR). El VDR cuenta con dos dominios: uno de unión al ligando, y otro de unión al ADN. Cuando se forma el complejo ligando-receptor, se produce una translocación del mismo al núcleo celular formando un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR). El complejo calcitriol-VDR-RXR se une a elementos de respuesta a Vitamina D que se localizan en la región promotora del gen PTH bloqueando su transcripción (4).

Niveles bajos de calcitriol favorecen la proliferación de las células paratiroideas, en parte por los cambios en el calcio sérico. Así, el déficit de calcitriol ejerce los mismos efectos que una dieta baja en calcio (10). Por otro lado se ha visto que también puede ejercer un efecto anti proliferativo independiente del calcio que se acompaña de un freno en el incremento del

factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), principal responsable del desarrollo de hiperplasia en glándula paratiroides (13).

El **fósforo** actúa directamente sobre las paratiroides regulando síntesis y secreción de PTH. Su aumento a nivel sérico provoca un incremento en la secreción de PTH (8, 14) además de regular a nivel post-transcripcional la expresión del gen de la PTH (15) estabilizando el transcrito y evitando su degradación. Por el contrario, a bajos niveles de fósforo, se produciría un descenso de estos factores protectores favoreciendo su degradación. Se ha demostrado también que el fósforo puede regular los niveles de PTH por mecanismos independientes al calcitriol y el calcio (16).

A nivel de proliferación de células paratiroides, el fósforo ha demostrado ser un importante estímulo de la hiperplasia mediante un mecanismo que guarda relación con un aumento de TGF- α , el cual requiere de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (31).

El **FGF23** también es otro factor regulador de la función paratiroidea actuando sobre los niveles de PTH. Este factor de crecimiento se sintetiza fundamentalmente en osteocitos, pero también en osteoblastos cuando el fósforo o el calcitriol se encuentran aumentados (17-18). Para que el FGF23 actúe en sus órganos diana, debe hacerlo a través de sus receptores FGFR y siempre en presencia de su correceptor klotho (19). El complejo FGFR/klotho reconoce FGF23 y aumenta la excreción de fósforo urinario e inhibiendo en el riñón la síntesis de 1- α -hidroxilasa con el consiguiente descenso en la activación de vitamina D semi-activa (calcidiol) a vitamina D activa (calcitriol). También a nivel de glándula paratiroides actúa directamente disminuyendo la síntesis y la secreción de PTH (20). a través de la inactivación de la vía de las MAPK (20, 22) se ha visto que en pacientes con ERC, los niveles de FGF23 y PTH son elevados (21) lo que parece indicar que el FGF23 estimularía la secreción de la parathormona, pero varios trabajos han demostrado que FGF23 es no capaz de inhibir la síntesis y secreción de PTH al bajar la expresión de klotho en la uremia.

1.b. Epigenética:

La epigenética hace referencia a los cambios heredables en la expresión génica cuando ésta ocurre sin que haya alteraciones en la secuencia del ADN. Esos cambios pueden ser inducidos espontáneamente, por factores ambientales o como consecuencia de mutaciones específicas.

Hay dos mecanismos epigenéticos interconectados: la metilación del ADN y la modificación covalente de las histonas. Además, en los últimos años se ha demostrado que el ARN no codificante también está íntimamente relacionado con las modificaciones epigenéticas.

En este trabajo nos centraremos en el estudio de la metilación del ADN como posible explicación a la regulación a la baja de la expresión de determinados genes.

Metilación del ADN:

La metilación del ADN es la modificación epigenética cuyo mecanismo de actuación consiste en la adición de un grupo metilo en una de las bases de la cadena de ADN. Esto no provoca un cambio en la secuencia primaria del mismo pero generalmente reprime la transcripción, siendo por tanto un mecanismo importante de silenciamiento de genes en el desarrollo embrionario e inactivando genes supresores tumorales en determinados cánceres humanos.

Aunque la metilación de la citosina es la modificación más estudiada, se ha visto que también en organismos procariontes y en plantas, la adenina puede metilarse (32). Sin embargo, en mamíferos ocurre principalmente en el quinto carbono de la citosina, formando el complejo conocido como 5-metilcitosina (5-mC) y podemos encontrarla prácticamente de manera exclusiva en los dinucleótidos CpG. 5-mC es un marcador epigenético muy potente que regula la expresión de los genes. Las islas CpG metiladas ubicadas en las regiones promotoras de los genes, se asocian con la inactivación del gen. Esta metilación está catalizada por la familia de enzimas de las ADN metiltransferasas que incluyen a la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Estas dos últimas son conocidas como metiltransferasas *de novo* y son capaces de metilar dinucleótidos CpG que no han sido metilados previamente. Sin

embargo, DNMT1 es conocida como una metiltransferasa de mantenimiento, y tiene capacidad para metilar ADN semi-metilado durante la replicación.

El proceso de metilación es reversible y se cree que se puede deber a la sucesiva oxidación de 5-mC a 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxicitosina (Ilustración 1) estando implicadas enzimas de la familia Tet.

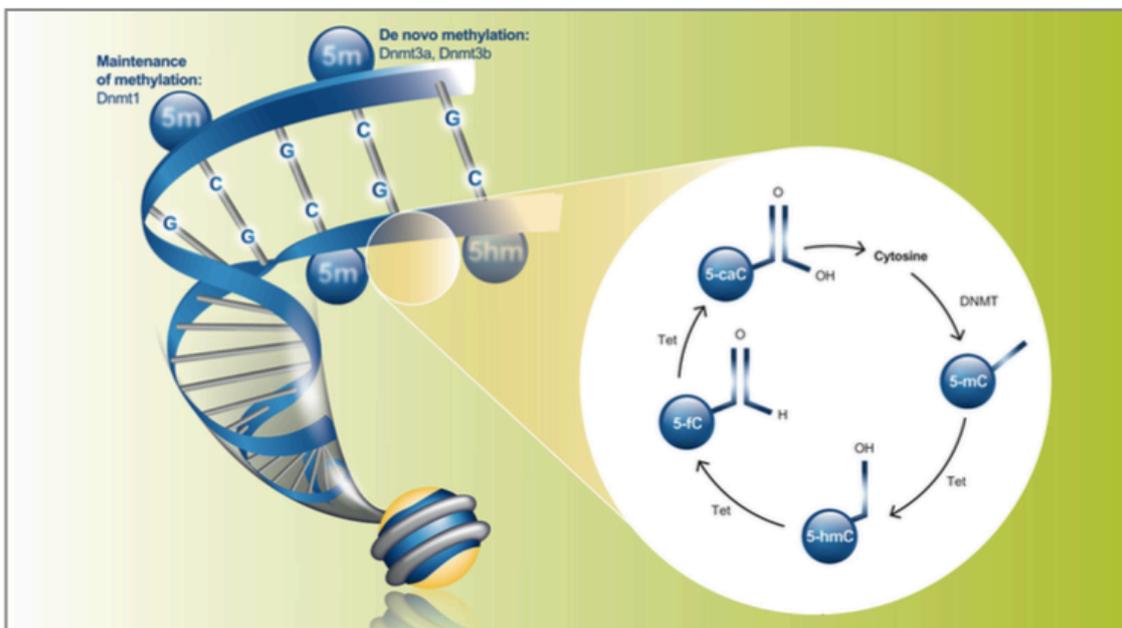


Ilustración 1. Proceso reversible de metilación (Fuente: Epigenetics Guide abcam®)

En este trabajo, para el estudio de la metilación del ADN, se empleó la conversión de bisulfitación.

Conversión de bisulfitación:

También conocida como “modificación mediante bisulfito sódico”, es una de las herramientas más utilizadas para el análisis de la metilación de las citosinas. Este método se basa en el tratamiento del ADN con bisulfito sódico y así determinar un patrón de metilación.

El tratamiento del ADN con bisulfito sódico trae consigo la deaminación de los residuos de citosina, convirtiéndolas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas (5-mC), permanecen intactas sin cambiar. Así, este tratamiento trae consigo cambios específicos en la secuencia de ADN que dependerá del grado de metilación de los residuos individuales de citosina y nos provee de información a nivel de citosinas individuales en cuanto al grado de metilación de una región de ADN: los residuos de citosina no metilados

serán detectados como uracilos mientras que los metilados, seguirán siendo detectados como citosinas (Ilustración 2)

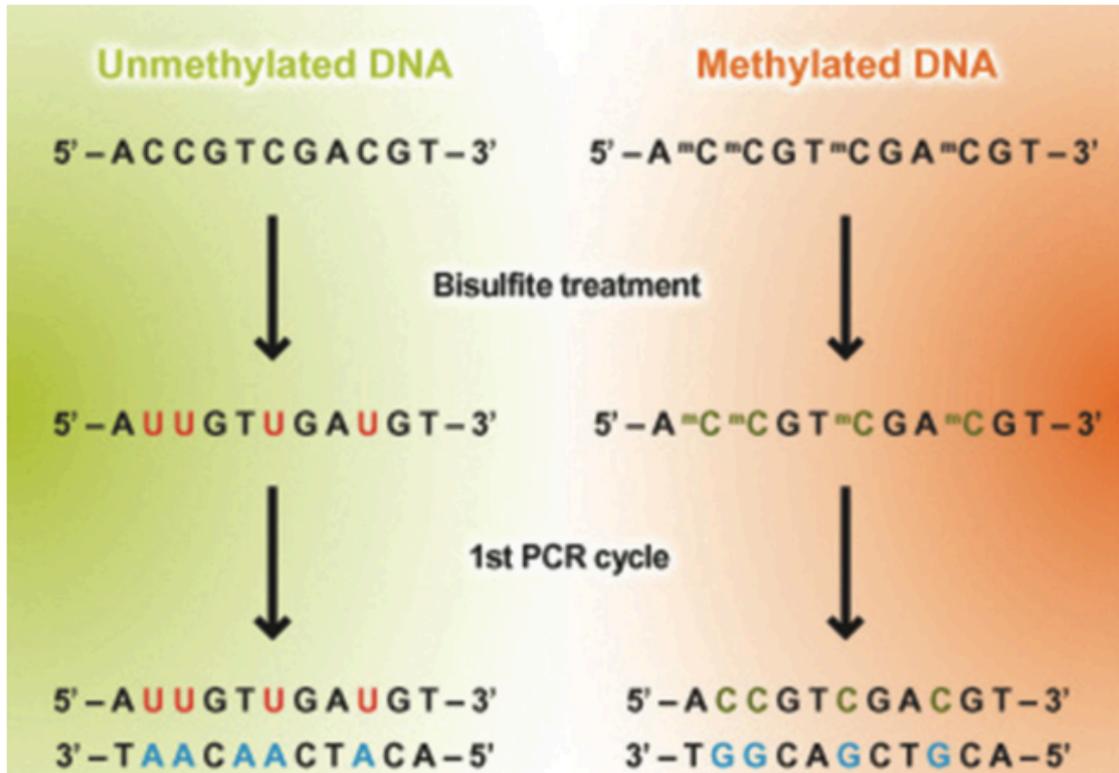


Ilustración 2. Tratamiento bisulfitación (Fuente: Epigenetics Guide Abcam®)

El ADN modificado por bisulfitación puede ser analizado mediante métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que pueden discriminar el estado metilado de las citosinas en regiones genómicas específicas y posteriormente por secuenciación, conocer el patrón de nucleótidos seguido de las regiones amplificadas y así comparar con secuencias idénticas sin metilar.

Antecedentes:

No son muchas las publicaciones recientes al respecto de la metilación del ADN como justificación tanto al silenciamiento de genes reguladores, como al silenciamiento general en la expresión de genes en determinadas patologías y las que hay, son contradictorias. En el caso del hiperparatiroidismo primario, hay resultados contradictorios al respecto del grado de metilación en los genes reguladores (23-24). Respecto al HPTs, un reciente y único artículo sugiere que la metilación no explica la regulación a la baja en la expresión de genes en la paratiroides en dicha patología (25).

1.c. Hipótesis y objetivos del TFM:

1.c.1 Hipótesis:

Está demostrado que en el HPTs hay una regulación a la baja de hasta el 80% de los genes en general (25-27), y en particular, de los relacionados con el control de la síntesis y secreción de PTH, y con la hiperplasia de la glándula (Ilustración 3).

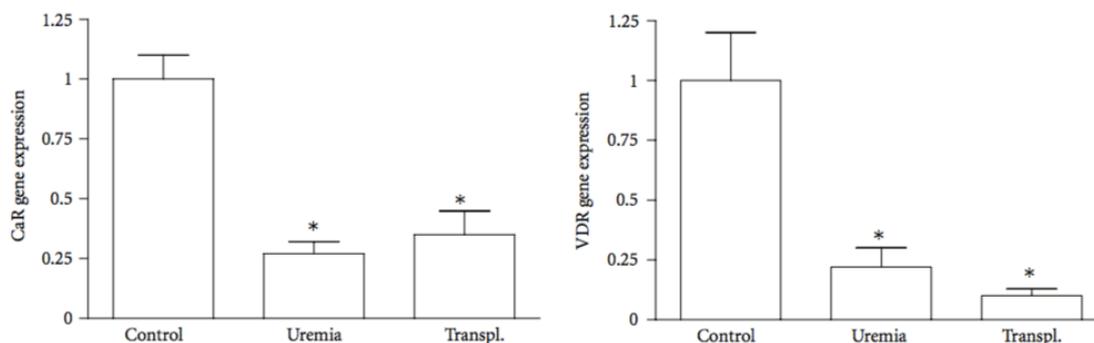


Ilustración 3. Disminución en la expresión génica de CaSR y VDR cuando hay HPTs (Adaptado por Hofman-Bang et al en 2012 del original de Lewin et al, 2004)

Ciertos aspectos de este fenómeno permanecen poco claros y **la hipótesis que se plantea en este TFM es que la disminución en la expresión de los genes VDR, CaSR y Klotho, cuando hay HPTs, podría ser debida, entre otros mecanismos, al silenciamiento epigenético en las islas CpGs en las regiones promotoras de dichos genes.**

Para ello, en este trabajo se empleó un modelo con líneas celulares de rata para la puesta a punto tanto de las técnicas de bisulfitación, del diseño de primers específicos para ADN bisulfitado, y amplificación de los fragmentos de interés con su consiguiente comprobación mediante electroforesis. Una vez conseguido esto tras varios meses de trabajo, se pasó al modelo “in vivo” utilizando glándulas paratiroides de ratas control y ratas con HPTs, aplicando la metodología puesta a punto en modelo “in vitro” para posteriormente proceder a la pirosecuenciación de dichos productos de PCR para poder comparar ambos grupos en cuanto al grado de metilación de las regiones CpGs.

1.c.2 Objetivos:

1-Puesta a punto del modelo

- Cultivos celulares de líneas celulares UMR106
- Extracción de ADN y posterior bisulfitación
- Diseño de primers para PCR de las regiones de interés
- Electroforesis para comprobar la amplificación del ADN bisulfitado

2-Análisis del grado de metilación de las regiones promotoras de los genes PTH, VDR, CaSR y klotho en modelos glándulas paratiroides de rata

- Extracción del ADN de glándulas paratiroides y posterior bisulfitación
- Amplificación por PCR de las regiones de interés
- Electroforesis para comprobar el éxito de la PCR
- Pirosecuenciación del producto amplificado
- Analizar la relación entre ambos grupos del estado de metilación

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.a. Materiales:

2.a.1 Reactivos

Kit Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):

- Immolase™ DNA Polymerase BIOLINE®
- 10X ImmoBuffer BIOLINE®
- 50mM MgCl₂ Solution BIOLINE®
- 2mM dNTPs BIOLINE®

EZ DNA Methylation-Gold™ Kit ZYMO RESEARCH® D5005

Primers utilizados:

Tabla 1. Listado de primers

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Nt</i>	<i>MT, °C</i>	<i>%GC</i>	<i>BT</i>
Klotho FW1	TGGAAAGTTTAGAATGGGAGAAAG	24	59,1	37,5	X
Klotho RV1	CCCTTTACCTTCCAAAACTAAT	23	58,2	34,8	✓
Klotho SQ	GGGAAAGTAGGTGTTTTATT	20	47,1	35,0	X
Klotho FW-Alt	GGATGTAGGGAAAGGAGAAATAGAA	25	55,6	40,0	X
CaR FW1	AGTTTGGGAATGTTATAGTT	21	59,6	38,1	X
CaR RV1	CTCCCTAAATCTCTCAAATCAACCTTTA	29	61,0	34,5	✓
CaR SQ1	TAGGTGGTTTGGGGG	15	50,9	60,0	X
CaR FW-Alt	TTTATTATATTGTGAGTTTTGGAATTTTTATTAGG	35	56,7	35,0	X
CaR FW2	GGGAAGTGTGAGTGTATGGG	20	53,0	55,0	X
CaR RV2	ATCTCTCAAATCAACCTTTAACTATAC	28	53,7	29,0	X
CaR SQ2	GTAGGTAGGAGGATTTTA	18	43,9	39,0	X
PTH FW1	GGATTTTGAGTTTTGGGTTAGTTTGAT	27	61,7	33,3	X
PTH RV1	ACCTAAATTCATATACAAACCTTTTACT	29	59,2	21,1	✓
PTH SQ1	ATTTGAAATTTTAGAGGAGTG	21	45,0	28,6	X
PTH FW-Alt	ATTTTGAGTTTTGGGTTAGTTTGAT	25	52,8	28,0	X
VDR FW1	AGGAATGTTAGGTAGGAGAGA	21	52,4	43,0	X
VDR RV1	CCTTAAAAACCTACCTTATAAAAACTCT	30	56,7	30,0	✓
VDR SQ1	GATATTATAAAGATTGTT	19	37,4	16,0	X
VDR FW-Alt	AATAGAGGAATGTTAGGTAGGAGAGAGG	28	59,9	43,0	X
VDR FW2	TAGAGTTGTAGAGGATTGAATTTAGT	26	54,5	31,0	X
VDR RV2	ACCTTTTAAACAAACAAAACTACTCA	26	53,3	27,0	X
VDR SQ2	GTAGAGGATTGAATTTAGTG	20	46,5	35,0	X

Nt= número de nucleótidos del primer

MT=temperatura de fusión en grados centígrados del primer

%GC=proporción en tantos por cien de guaninas y citosinas en el primer

BT=si el primer va marcado con biotina o no

2.a.2 Equipamiento:

EQUIPOS:

- Agitador Vortex BioProducts®
- Agitador Vortex VELP® Scientific 2x³
- Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS
- Nanodrop
- Baño seco Dry-Bath K DB-006
- Microondas Samsung
- Autoclave TRADE RAYD2® AE12
- Centrífuga con control de T^a Eppendorf® Centrifuge 5415R
- Centrífuga sin control de T^a Eppendorf® MiniSpin
- Fuente de electricidad BIO-RAD® Power Pac Basic
- Dispensadora Agua Milli-Q Millipore Q-POD®
- Termociclador BIO-RAD® My Cycler™
- Báscula Sartorius Universal
- Ordenador sobremesa ACER® Veriton™
- Pipetas GILSON® Pipetman 10µL, 20µL, 200µL y 1000µL
- Pipeta electrónica INTEGRA PIPETBOY
- Baño Memmert®
- Microscopio OLYMPUS CKX41
- Pirosecuenciador PyroMark QUIAGEN® Q24
- Roller Mixer STUART® SRT6D
- Campanas extractoras:
 - KOWELL®
 - Hero-Lab®
- Incubadoras:
 - De Cultivos (CO2) Thermo Scientific® HERAcell 240i
 - De laboratorio INFORS® Minitron
- Neveras:
 - 4°C IGNIS® y BALAY®
 - -20°C INDESIT®
 - -80°C New Brunswick® U570 Premium

SOFTWARE:

- Image Lab 3.0
- Nanodrop 1000 3.7.1
- PyroMark Q24 2.0.6

MATERIAL DESHECHABLE DE LABORATORIO:

- Puntas Pipeta epTIPS® 10, 20, 200 y 1000µL
- Puntas Pipeta Neptune Barrier Tip
- Guantes PehaSoft Nitrilo White Talla M
- Tubos Eppendorf® 0,5µL y 1,5µL
- Tubos FALCON® 15µL y 50µL
- Tubos PLG extracción ADN 2µL
- Pipetas vidrio DELTA LAB5µL, 10µL y 25µL
- Frascos de cultivos celulares FALCON® de 50µL, 250µL y 750µL

2.a.3 Líneas celulares “in vitro”:

Para la puesta a punto de este trabajo, se procedió a trabajar las técnicas y metodología en líneas celulares de **UMR106**, pertenecientes a células de rata de origen osteoblástico.

Se mantuvieron durante varios pases en frascos de cultivo celular dejándolas proliferar en la incubadora de cultivos. Cuando se necesitó trabajar con el ADN de dichas células, se procedió a extraer dicho material génico mediante el método fenol-cloroformo detallado en el apartado 2b.

2.a.4 Muestras “in vivo”:

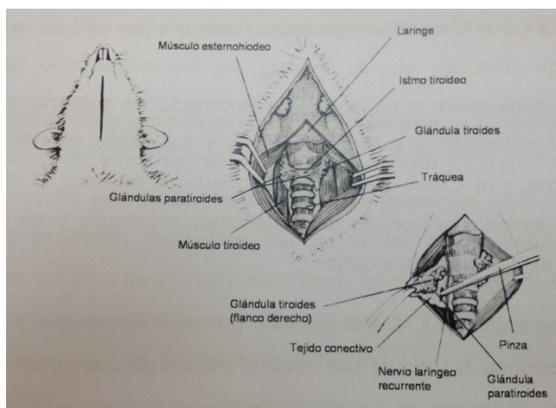


Ilustración 4. Esquema de extracción de glándulas paratiroides en rata (Fuente: Waynforth H. B.)

Una vez puesto a punto el método “in vitro”, se procedió al estudio en un modelo “in vivo” aprovechando las glándulas paratiroides de ratas conservadas de un proyecto realizado previamente en el Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral del HUCA.

En un estudio “in vivo” se había realizado previamente en ratas Wistar macho de 4 meses de edad procedentes del animalario de la Universidad de Oviedo y sometidas a un modelo experimental (Ilustración 5) consistente en la realización de nefrectomía parcial (7/8) para inducir insuficiencia renal crónica (IRC) y en consecuencia, HPTs. Unos animales fueron alimentados con dieta normal en fósforo (grupo control) y otras con una dieta alta en fósforo (grupo problema). Posteriormente se sacrificaron en las semanas 4, 8, 12, 16 y 20 y se recogieron varios tejidos entre los que estaban las glándulas paratiroides (ilustración 4) que se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para el TFM se estudió un grupo de 14 glándulas paratiroides obtenidas de 14 ratas (Tabla 2), en las cuales se estudió la metilación de los cuatro genes objetos del trabajo.

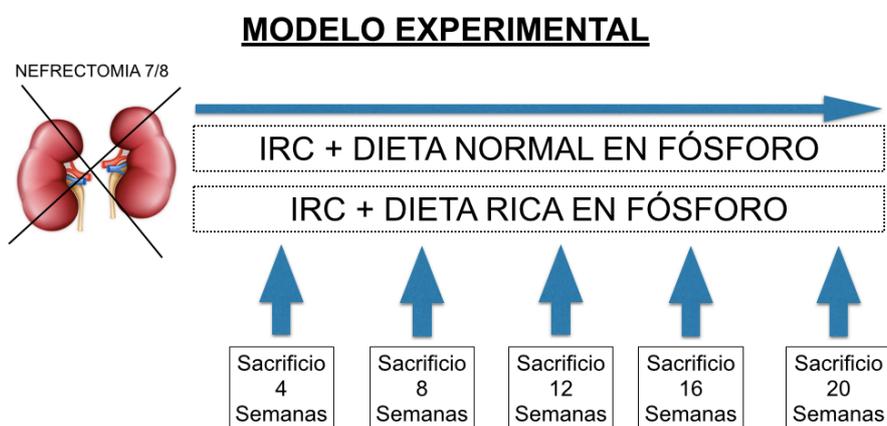


Ilustración 5. Esquema del modelo experimental al que fueron sometidas las ratas de donde proceden las glándulas paratiroides

Tabla 2. Listado ratas estudio genes VDR, CaSR y PTH

<i>Rata</i>	<i>Características</i>	<i>PTH</i>	<i>Grupo</i>	
1	H562	12 semanas, dieta normal	41	Control
2	H569	8 semanas, dieta normal	46	Control
3	H570	8 semanas, dieta normal	54	Control
4	H574	8 semanas, dieta normal	68	Control
5	H577	8 semanas, dieta normal	72	Control
6	H585	8 semanas, dieta normal	13	Control
7	H586	8 semanas, dieta normal	15	Control
8	H567	8 semanas, dieta alta fósforo	1313	Problema
9	H594	16 semanas, dieta alta fósforo	1139	Problema
10	H598	16 semanas, dieta alta fósforo	2436	Problema
11	H607	20 semanas, dieta alta fósforo	2233	Problema
12	H634	20 semanas, dieta alta fósforo	1767	Problema
13	H636	20 semanas, dieta alta fósforo	2035	Problema
14	H639	20 semanas, dieta alta fósforo	1411	Problema

Características = se especifica la semana en que fue sacrificada y el tipo de dieta
 PTH = valor final de PTH en el momento del sacrificio en pg/mL

Tras poner a punto todos pares de primers (Tabla 1) en el modelo “in vitro” en las líneas celulares de UMR106, se pasó al modelo “in vivo” en rata con un par de primers por cada gen objetivo de estudio (Tabla 3). Se eligieron en función de la calidad de la amplificación del ADN bisulfitado obtenida y analizada mediante electroforesis en gel de agarosa, ya que suelen ser primers muy sensibles y que no siempre amplifican como se espera.

Tabla 3. Parejas de primers utilizadas “in vivo”

Primer	Secuencia	Nt	MT_i	MT_f	Size	CpGs
Klotho FW1	TGGAAAGTTTAGAATGGGAGAAAG	24	54,8	51,3	150pb	5
Klotho RV1	CCCTTACCTTCCAAAACTAAT	23	51,8			
CaR FW1	AGTTTGGGAATGGTTATAGTT	21	51,0	52,7	167pb	8
CaR RV1	CTCCCTAAATCTCTCAAATCAACCTTTA	29	58,4			
PTH FW1	GGATTTGAGTTTTGGGTTAGTTTGAT	27	55,6	52,9	365pb	2
PTH RV1	ACCTAAATTCATATACAAACCTTTACT	29	54,2			
VDR FW1	AGGAATGTTAGGTAGGAGAGA	21	52,4	52,6	370pb	6
VDR RV1	CCTTAAAAACCCTACCTTATAAAAACTCT	30	56,7			

Nt = número de nucleótidos del primer

MT_i = Temperatura de fusión individual del primer

MT_f = Temperatura de fusión de ambos juegos de primers

Size = tamaño de la secuencia amplificada

CpGs = número de islas CpGs estudiadas en cada región amplificada

Mediante un análisis electroforético de los productos de PCR, se procedió a la pirosecuenciación de las muestras para luego comparar el grado de metilación entre el grupo control y grupo problema

2.b. Métodos:

Protocolo Extracción de ADN:

Para la extracción del material genómico tanto de las líneas celulares, como de las glándulas paratiroides de rata, se utilizó el método del Fenol-Cloroformo cuyos pasos son:

- 1-Añadir 500 µL de tampón de extracción (un tubo eppendorf/muestra)
- 2-Incluir en ese tampón el tejido del que queremos extraer ADN
- 3-Añadir 50 µL de Proteinasa K (10 mg/mL). Vortex
- 4-Incubar los tubos a 55°C (12-18 h)
- 5-Añadir la digestión homogénea a un tubo PLG
- 6-Añadir 500 µL de Fenol-Cloroformo
- 7-Mezclar mediante rotación durante 15-30 min

- 8-Centrifugar los tubos a 12.000 rpm (5 min)
- 9-Cuidadosamente recoger la fase acuosa a otro tubo 1,5 mL
- 10-Añadir 50 µL de Acetato Sódico 3M pH 5.3. Mezclar
- 11-Añadir 1 µL de Glucógeno (20 mg/ml). Mezclar
- 12-Añadir 1 mL de Etanol 100 % frío (4°C). Invertir varias veces
- 13-Centrifugar a 12.000 rpm (20 min)
- 14-Retirar la fase acuosa (supernadante)
- 15-Añadir 1 mL de Etanol 75 % frío (4°C) para lavar
- 16-Centrifugar a 12.000 rpm (5 min)
- 17-Retirar fase acuosa y dejar secar el pellet a temperatura ambiente
- 18-Añadir agua (50-300 µL) y dejar resuspender a 37°C (30 min)

Composición del tampón de extracción:

- NaCl: 0,1M
- Tris: 20mM pH 8.0
- EDTA: 25 mM pH 8.0
- SDS: 0,5 %
- Agua miliQ hasta completar volumen.

Protocolo Metilación ADN:

Se ha seguido el protocolo aportado por el kit de bisulfitación “EZ DNA Methylation-Gold™ Kit D5005” (Zymo Research):

- 1-Añadir a un tubo de 0,2 mL 130 µL de Reactivo de Conversión CT y 20 µL de la muestra de ADN que se quiere bisulfitar (que incluya 300-500 ng de ADN). Un tubo por cada muestra a bisulfitar.
- 2-Meter los tubos en un termociclador y someter a las siguientes termofases: 98°C 10 min, 64°C 150 min, y mantener a 4°C hasta su uso.
- 3-Añadir 600 µL de *M-Binding Buffer* a una columna Zymo-Spin™ (Una columna por cada muestra)
- 4-Añadir la muestra de ADN (150 µL) a la columna, cerrar el tapón y mezclar invirtiendo varias veces.
- 5-Centrifugar a velocidad máxima 30 s. Descartar
- 6-Añadir 100 µL de *M-Wash Buffer* a la columna y centrifugar 30 s
- 7-Añadir 200 µL de *M-Desulphonation Buffer* a la columna, esperar 15-20 min y tras la incubación, centrifugar 30 s
- 8-Añadir 200 µL de *M-Wash Buffer* a la columna y centrifugar 30 s

9-Repetir el paso anterior

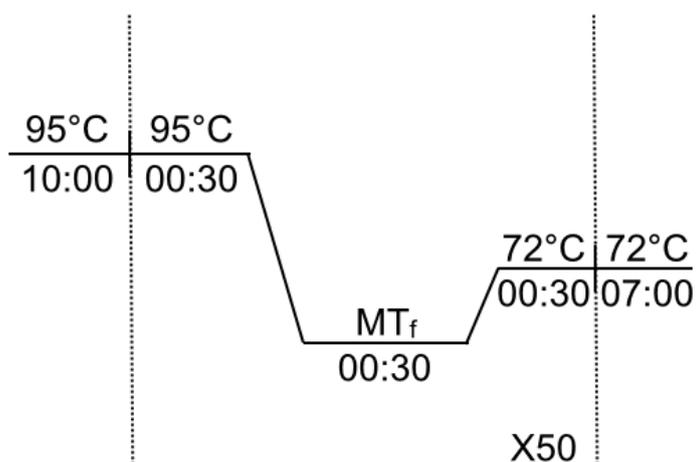
10-Añadir 10-15 μL de *M-Elution Buffer* a la columna y colocarla en un tubo eppendorf de 1,5 mL para centrifugar y recoger la fase líquida con el ADN bisulfitado.

Protocolo Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Se siguió el protocolo del Servicio de Epigenética del HUCA (Tabla 4), utilizando su patrón de ciclos recomendado (Ilustración 6):

Tabla 4. Receta PCR (por muestra)

Reactivo	Volumen
Agua	20,3 μL
Buffer 10X	3 μL
MgCl ₂ (50mM)	0,9 μL
dNTPs (2mM)	3 μL
Primer FW (10 μM)	0,3 μL
Primer RV (10 μM)	0,3 μL
ADN Polimerasa	0,2 μL
Muestra ADN	2 μL



$$MT_f = (MT_1 + MT_2) - 2$$

Ilustración 6. Esquema general de los tiempos y temperaturas utilizados en las (PCR).

La temperatura de fusión (MT) varía dependiendo de los primers utilizados. Por tanto, en cada caso, la MT se ha calculado teniendo en cuenta las MT individuales de cada primer, siguiendo la siguiente fórmula:

$$MT_F = [(MT_{\text{primer1}} + MT_{\text{primer2}})/2] - 2$$

Protocolo electroforesis en gel agarosa 2%:

Las electroforesis se han realizado en dos tamaños de geles:

- Pequeños:
 - 50 mL de TAE 1X
 - 1 gr de agarosa en polvo
 - 2 µL de Solución de tinción de ADN RedSafe™
- Grandes:
 - 150 mL de TAE 1X
 - 3 gr de agarosa en polvo
 - 6 µL de Solución de tinción de ADN RedSafe

Una vez cargados los productos de PCR en las calles de los geles de agarosa, se han puesto a correr a un voltaje de 80-100 voltios (V) durante periodos de entre 0,5-1 h, dependiendo del tamaño del gel.

Protocolo Pirosecuenciación:

La primera parte de la pirosecuenciación se lleva a cabo en la estación de trabajo previa preparación de las muestras, que son los productos de PCR, y también de los primers de secuenciación.

Para las muestras se prepara un “Sample Mix” para tantas muestras como se disponga, más dos, para no depender del error de pipeteo. Y lo mismo para los primers, en lo que se denomina “Primers Mix”. La mezcla deberá tener las siguientes proporciones indicadas en las tablas 5 y 6:

Tabla 5. Sample Mix (Por muestra)	
Reactivo	Volumen
Agua	19 µL
Binding Buffer	40 µL
Beads	1 µL
Muestra ADN	20-25 µL

Tabla 6. Primers Mix (Por muestra)	
Reactivo	Volumen
Annealing Buffer	22,5 µL
Primer secuenciación	2,5 µL

En la estación de trabajo, donde se puede trabajar con hasta 24 muestras a la vez, al pasar el peine con los filtros se procede a desnaturalizar la doble cadena de los amplicones, productos de las PCR, para que queden en forma de cadena simple y de esta forma quedarse con la que está marcada con biotina. Esta cadena, a la que se unen las perlas, podrá ser utilizada como



Ilustración 7. Estación de trabajo para pirosecuenciar (QIAGEN®)

molde donde se una posteriormente el primer de secuenciación a partir del cual, ya en el equipo de pirosecuenciación, se irán añadiendo nucleótidos y así conocer la secuencia detallada.

Además, con el software Pyromark 2.0.6, no sólo se obtiene secuencia, sino que es capaz de detectar las islas CpGs representativas de los fragmentos que se utilizan como muestra, y analizar el grado de metilación de las mismas.

2.c. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el paquete informático SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EEUU) para Windows. Para el análisis estadístico de los marcadores bioquímicos se empleó la prueba paramétrica de la t de Student (t-Student). En todos los casos se consideró como significación estadística una $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

La puesta a punto del sistema de análisis usando ADN genómico de la línea celular UMR106 (Ilustración 8) utilizando todos los pares de primers sirvió para seleccionar qué par de primers utilizar para cada gen en la siguiente fase “in vivo” en muestras de glándulas paratiroides de rata. Se decidió utilizar el primer par de primers (F1-R1) en los 4 genes objeto del estudio para trabajar con ellos en las muestras animales (ver apartado “Material y Métodos” sección 2.a.3.).

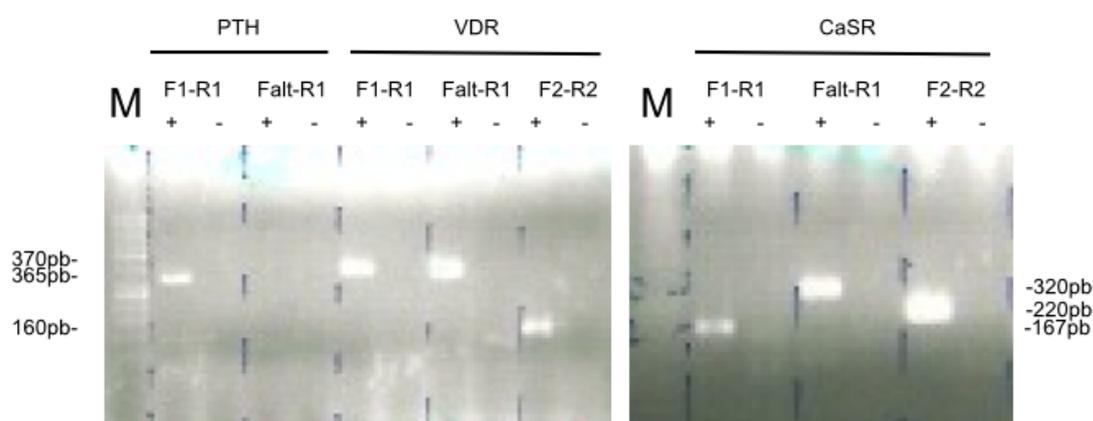


Ilustración 8. Electroforesis de todos los amplicones obtenidos de la PCR de ADN bisulfitado de células UMR106 utilizando todos los primers especificados en la tabla 1 para los genes PTH, VDR y CaSR (5µl de ADN cargado. Marker 50pb)

Se procedió a estudiar los pares de primers de PTH FW1-RV1 (ilustración 9), VDR FW1-RV1 (ilustración 10), CaSR FW1-FW1 (ilustración 11) y Klotho FW1-RV1 (ilustración 12) ya “in vivo”. Tras la extracción del ADN de las glándulas paratiroides de las muestras animales procedentes de 14 ratas se procede a la bisulfitación del mismo. La división en grupo control (sano) y grupo problema (HPTs) se hizo en base a las medias de parámetros bioquímicos clásicos del metabolismo óseo (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros bioquímicos de los grupos de estudio

Grupo	N	Urea	Crea	Ca	P	PTH	FGF23
CONTROL	7	103,6±32,2	1,0±0,3	11,7±1,1	5,8±1,2	44,1±23,4	377,9±102,7
PROBLEMA	7	200,7±51,2	2,1±0,4	10,5±1,1	12,8±1,9	1762,0±493,9	1029,1±101,2
pValor		0,001	0,000	0,07	0,000	0,000	0,000

N = número de ratas en ese grupo

Urea, Crea (Creatinina), Ca (Calcio) y P (Fósforo) expresado en mg/dL

PTH y FGF23 expresado en pg/mL

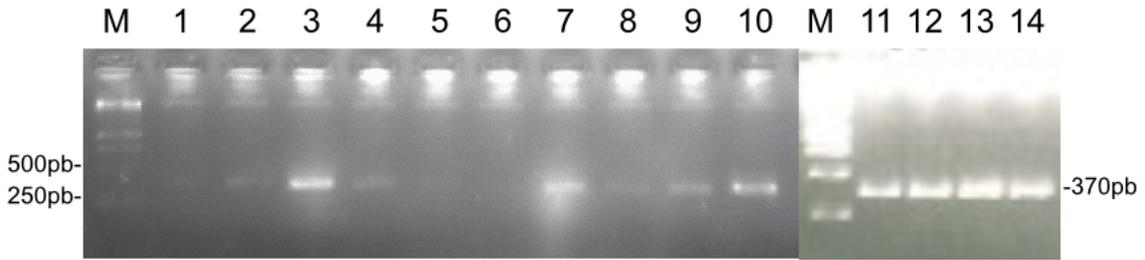


Ilustración 9. Electroforesis de PCR del gen PTH con FW1-RV1 de las 14 muestras animales (5µl de ADN cargado. Marker Ladder 1Kb)

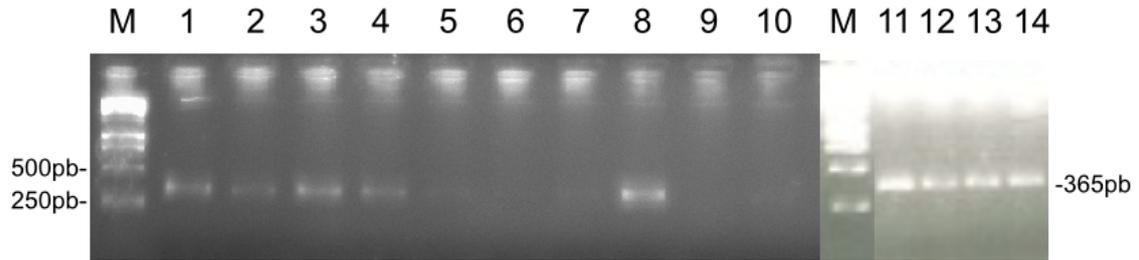


Ilustración 10. Electroforesis de PCR del gen VDR con FW1-RV1 de las 14 muestras animales (5µl de ADN cargado. Marker Ladder 1Kb)

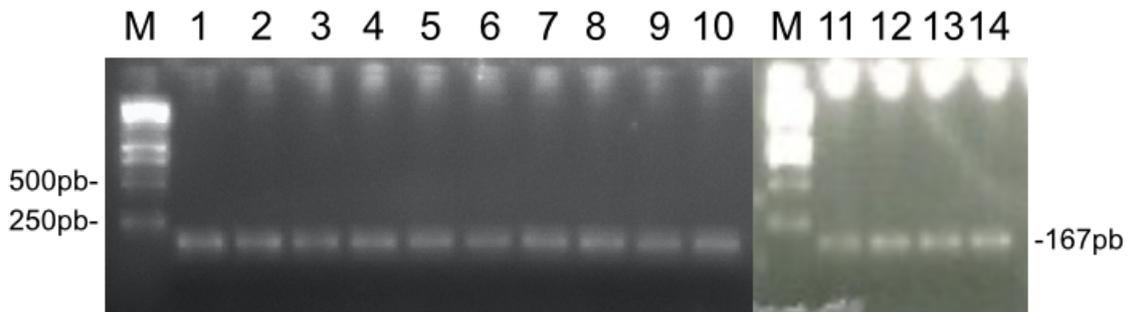


Ilustración 11. Electroforesis de PCR del gen CaSR con FW1-RV1 de las 14 muestras animales (5µl de ADN cargado. Marker Ladder 1Kb)

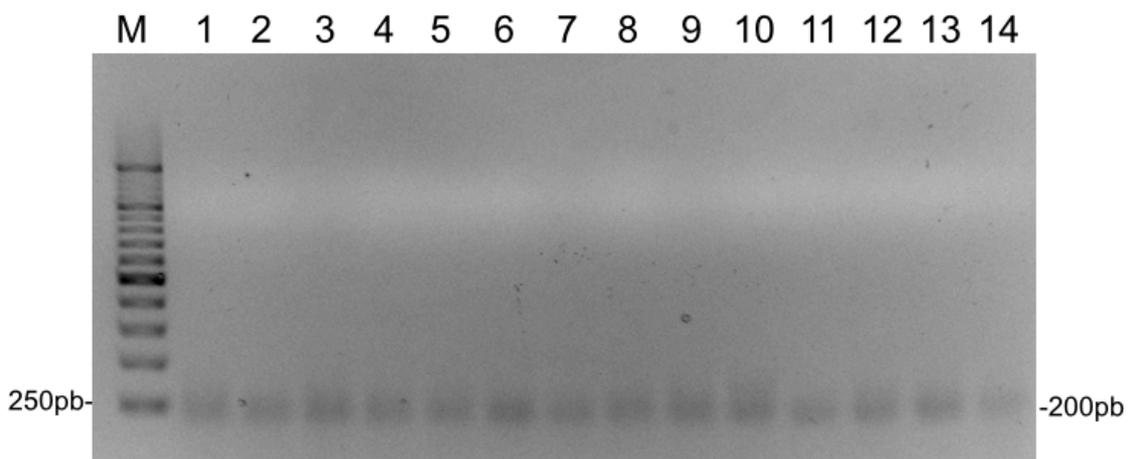


Ilustración 12. Electroforesis de PCR del gen klotho con FW1-RV1 de las 14 muestras animales (5µl de ADN cargado. Marker Ladder 1Kb)

Una vez comprobado que se dispone del producto de PCR, se procede a la pirosecuenciación de las muestras para obtener los resultados del grado

de metilación de cada una de ellas y así poder comparar, discutir y sacar conclusiones.

En las siguientes ilustraciones se muestran los resultados de la comparación del grado de metilación de las islas CpGs en los genes motivos de este trabajo (Ilustraciones 13-16):

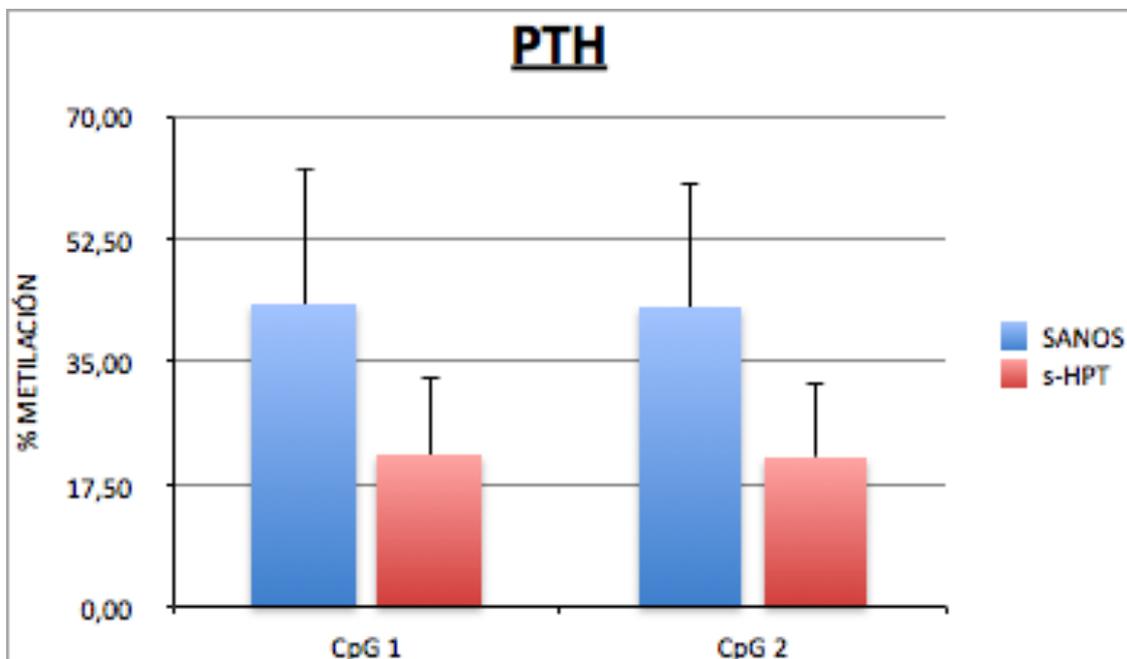


Ilustración 13. Comparativa grado metilación PTH grupo ratas sanas con grupo de ratas con HPTs. Expresada la media del porcentaje de metilación en cada barra y su desviación estándar.

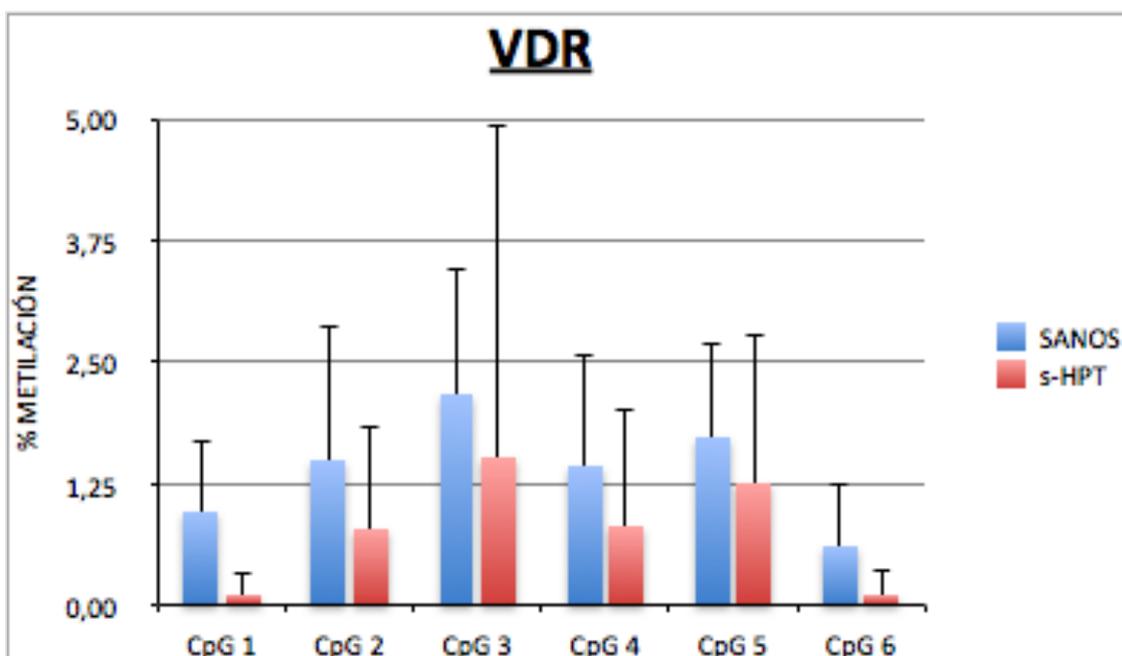


Ilustración 14. Comparativa grado metilación VDR grupo ratas sanas con grupo de ratas con HPTs. Expresada la media del porcentaje de metilación en cada barra y su desviación estándar.

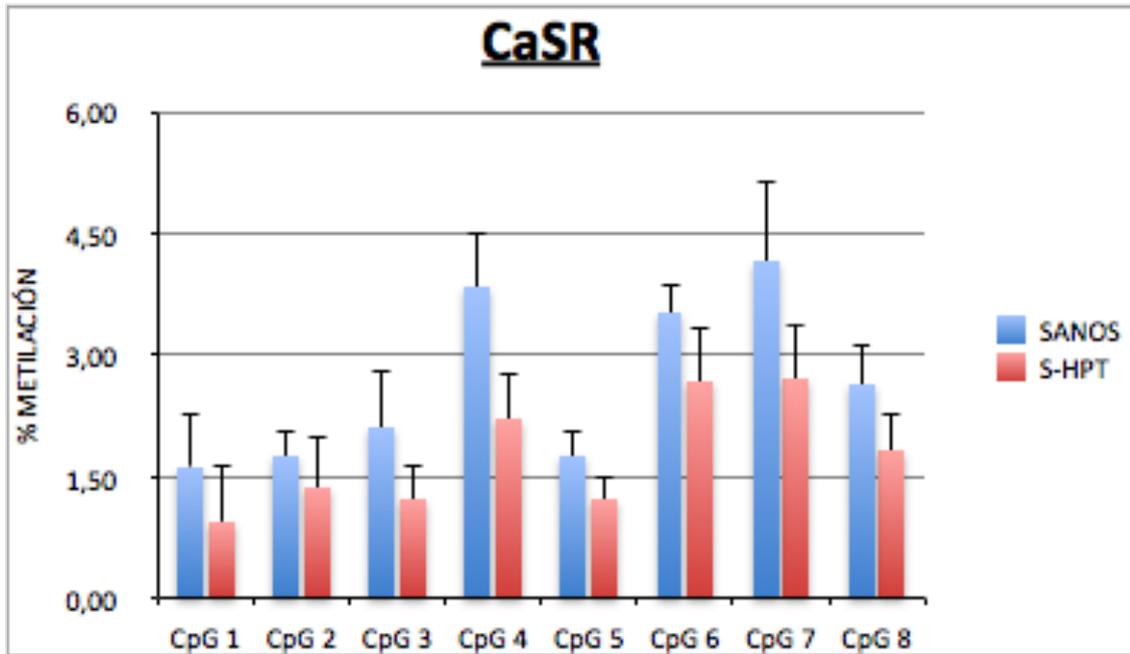


Ilustración 15. Comparativa grado metilación CaSR grupo ratas sanas con grupo de ratas con HPTs. Expresada la media del porcentaje de metilación en cada barra y su desviación estándar.

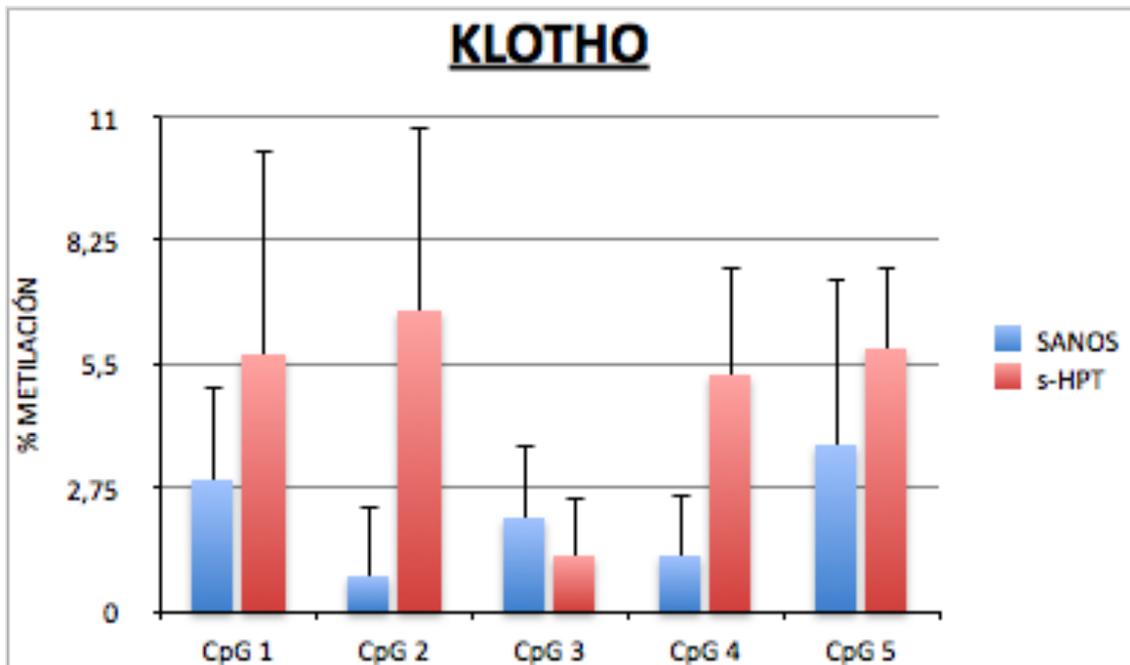


Ilustración 16. Comparativa grado metilación Klotho grupo ratas sanas con grupo de ratas con HPTs. Expresada la media del porcentaje de metilación en cada barra y su desviación estándar.

4. DISCUSIÓN

Este estudio se centra en la puesta a punto y el análisis de la metilación del ADN del promotor de cuatro genes centrales en la función paratiroidea.

El HPTs de la ERC se distingue porque la glándula paratiroides pierde parte de la capacidad de responder a sus reguladores, principalmente vitamina D y calcio, así como también a FGF23. Esto resulta en una hipersecreción de PTH que tiene dramáticas consecuencias en el manejo de la homeostasis del calcio y el fósforo en pacientes con enfermedad renal sobre todo en estadios avanzados. Esta pérdida de capacidad de responder a estímulos por parte de la glándula, también conocido como estado refractario, se caracteriza por una bajada en la expresión génica de los receptores de membrana de vitamina D, calcio y FGF23, que son respectivamente, VDR, CaSR y FGFR/Klotho.

En esta línea, estudios de nuestro grupo han visto que tanto en el desarrollo de HPTs severo humano (28) como murino (26), la expresión del 80% de los genes del genoma está regulada a la baja, usando micro-arrays de expresión génica.

Como se muestra en los resultados, el promotor del gen de la PTH está hipometilado (50,5 % vs. 100 % del grupo control). Este bloqueo de la transcripción por hipometilación podría ser debido a la elevada tasa transcripcional asociada a la hipersecreción de PTH. Sin embargo hay otros mecanismos post-transcripcionales que controlan la síntesis de PTH.

En esta línea, la hipometilación en los promotores de VDR y CaSR (54,6 % y 53,2 % respectivamente vs. 100 % del grupo control) es sorprendente, puesto que estos genes se encuentran regulados a la baja y lo esperable sería una hipermetilación aunque hay que señalar que no solo se regulan por mecanismos epigenéticos. Una explicación en el caso del VDR, es que su control transcripcional más fuerte es a través del bloqueo de la vía TGF- α /CEBP- β , que resulta en el bloqueo funcional de la transcripción del VDR (13).

En el caso del control transcripcional del CaSR, el VDR ejerce como un fuerte activador de la transcripción (29) y esto podría explicar que a pesar de la

hipometilación, el CaSR esté regulado a la baja, al estar regulado a la baja también el VDR.

En adenomas paratiroides (23) y en un modelo de HPTs diferente al nuestro (25), no se encontraron diferencias en el grado de metilación en estos dos genes pero la consistencia de nuestros resultados, en conjunción con el estadio avanzado de nuestro modelo (similar al encontrado en pacientes en prediálisis) hace pensar que este mecanismo de hipometilación quizá forme parte de una estrategia compensadora ejercida por la glándula en etapas muy avanzadas del desarrollo de HPTs. En dichas etapas, la glándula intentaría aumentar la transcripción del VDR y de CaSR mediante la hipometilación de sus promotores, para intentar frenar el crecimiento excesivo de la glándula y la hipersecreción de PTH.

En este mismo modelo murino, en el que se provoca ERC en estadios muy avanzados, hemos visto dichos efectos compensadores en otros órganos, tales como la aorta, donde hay mecanismos que intentan frenar la calcificación vascular.

Actualmente disponemos de glándulas paratiroides en estadios intermedios de HPTs, que serán analizadas en el futuro cercano para comprobar si el patrón de metilación es similar al de las glándulas sanas o a las hiperplasiadas, con el fin de comprobar si los mecanismos compensadores son activados de manera tardía o temprana.

En el caso del gen *klotho*, estudios clásicos (20) mostraron que el receptor de membrana de FGF23, está expresado en las glándulas paratiroides y por tanto la glándula responde a FGF23 a través de *Klotho*. Sin embargo, este paradigma ha cambiado recientemente (30), puesto que en estudios en ratones KO condicionales, donde se lleva a cabo una ablación de *klotho* exclusiva en la glándula paratiroides, se ha observado que la glándula sigue respondiendo a FGF23 a pesar de no tener *klotho*. Por lo tanto, el papel de *klotho* en la homeostasis glandular permanece aún poco claro. Nuestros resultados muestran una hipermetilación (231 % vs. 100 % del grupo control), acorde con una bajada en su expresión detectada en glándulas del mismo estudio (26). Esta combinación de resultados sugiere la hipótesis de que *Klotho* no forme parte de ese mecanismo compensador tardío activado en la glándula

y, por lo tanto, no sería un regulador de la secreción de PTH tan potente como el VDR y el CaSR.

En conclusión, la puesta a punto del análisis de la metilación ha sido exitosa técnicamente y además ha provisto de las hipótesis necesarias para emprender estudios mecanísticos posteriores dirigidos a discernir si existe un mecanismo compensatorio, si es activado en fases tardías o tempranas y si existen otros mecanismos de control adicionales.

5. CONCLUSIONES

1. El hiperparatiroidismo secundario afecta de manera diferencial al grado de metilación de las regiones promotoras de los genes relacionados con el control de la síntesis y secreción de hormona paratiroidea.
2. La región promotora del gen de la PTH se encuentra hipometilada en el hiperparatiroidismo secundario.
3. Las regiones promotoras del gen del VDR y del gen del CaSR se encuentran hipometiladas en el hiperparatiroidismo secundario, constituyendo probables mecanismos compensadores que tratan de mantener la expresión de ambos genes, imprescindibles en la homeostasis glandular.
4. La región promotora del gen klotho, co-receptor del FGF23, se encuentra hipermetilada en el hiperparatiroidismo secundario.
5. Estos hallazgos sugieren que alteraciones epigenéticas como la hipometilación del gen de la PTH y la hipermetilación del gen klotho en estadios avanzados de hiperplasia paratiroidea, favorecen tanto la síntesis como la secreción de PTH independientemente del fósforo extracelular.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avram MM, Sreedhara R, Avram DK, Muchnick RA, Fein P. Enrollment parathyroid hormone level is a new marker of survival in hemodialysis and peritoneal dialysis therapy for uremia. *Am J Kidney Dis.* 1996 Dec;28(6):924-30. PubMed PMID: 8957048.
2. Martin KJ, Slatopolsky E. The parathyroids in renal disease. In: Bilezikian JP MRyLM, editor. *The parathyroids, basic and clinical concepts.* New York: Raven Press; 1994. p. 711-20.
3. Naveh-Many T, Silver J. Regulation of parathyroid hormone gene expression and secretion by vitamin D. In: Holick MF, editor. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications.* Totowa: Humana Press Inc.; 1998. p. 217-37.
4. Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM. Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest.* 1986 Nov;78(5):1296-301. PubMed PMID: 3771798.
5. Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the synthesis of pre-parathyroid hormone mRNA. *Trans Assoc Am Physicians.* 1986;99:189-96. PubMed PMID: 3603922.
6. Tanaka Y, Deluca HF. The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys.* 1973 Feb;154(2):566-74. PubMed PMID: 4691503.
7. Lopez-Hilker S, Dusso AS, Rapp NS, Martin KJ, Slatopolsky E. Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol. *Am J Physiol.* 1990 Sep;259(3 Pt 2):F432-7. PubMed PMID: 2396669.
8. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, et al. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest.* 1996 Jun 1;97(11):2534-40. PubMed PMID: 8647946.

9. Wang Q, Palnitkar S, Parfitt AM. Parathyroid cell proliferation in the rat: effect of age and of phosphate administration and recovery. *Endocrinology*. 1996 Nov;137(11):4558-62. PubMed PMID: 8895317.
10. Naveh-Many T, Rahamimov R, Livni N, Silver J. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J Clin Invest*. 1995 Oct;96(4):1786-93. PubMed PMID: 7560070.
11. Morrissey JJ, Cohn DV. The effects of calcium and magnesium on the secretion of parathormone and parathyroid secretory protein by isolated porcine parathyroid cells. *Endocrinology*. 1978 Dec;103(6):2081-90. PubMed PMID: 748033. Epub 1978/12/01. eng.
12. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993 Dec 9;366(6455):575-80. PubMed PMID: 8255296.
13. Dusso A, Cozzolino M, Lu Y, Sato T, Slatopolsky E. 1,25-Dihydroxyvitamin D downregulation of TGFalpha/EGFR expression and growth signaling: a mechanism for the antiproliferative actions of the sterol in parathyroid hyperplasia of renal failure. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):507-11. PubMed PMID: 15225829.
14. Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, et al. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Oct;9(10):1845-52. PubMed PMID: 9773785.
15. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5253-9. PubMed PMID: 9478982. eng.
16. Martin DR, Ritter CS, Slatopolsky E, Brown AJ. Acute regulation of parathyroid hormone by dietary phosphate. *American journal of physiology*. 2005 Oct;289(4):E729-34. PubMed PMID: 15914507. Epub 2005/05/26. eng.
17. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate

transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Dec;289(6):G1036-42. PubMed PMID: 16020653. Epub 2005/07/16. eng.

18. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006 May;17(5):1305-15. PubMed PMID: 16597685. Epub 2006/04/07. eng.

19. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 2006 Dec 7;444(7120):770-4. PubMed PMID: 17086194. eng.

20. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):4003-8. PubMed PMID: 17992255. Pubmed Central PMCID: 2066196. Epub 2007/11/10. eng.

21. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, et al. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 2004 May;65(5):1943-6. PubMed PMID: 15086938. Epub 2004/04/17. eng.

22. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol.* 2007 Oct;195(1):125-31. PubMed PMID: 17911404. Epub 2007/10/04. eng.

23. Varshney S, Bhadada SK, Sachdeva N, Arya AK, Saikia UN, Behera A, et al. Methylation status of the CpG islands in vitamin D and calcium-sensing receptor gene promoters does not explain the reduced gene expressions in parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Oct;98(10):E1631-5. PubMed PMID: 23913941. Epub 2013/08/06. eng.

24. Sulaiman L, Juhlin CC, Nilsson IL, Fotouhi O, Larsson C, Hashemi J. Global and gene-specific promoter methylation analysis in primary hyperparathyroidism. *Epigenetics.* 2013 Jun;8(6):646-55. PubMed PMID: 23764768. Pubmed Central PMCID: 3857344. Epub 2013/06/15. eng.

25. Hofman-Bang J, Gravesen E, Olgaard K, Lewin E. Epigenetic Methylation of Parathyroid CaR and VDR Promoters in Experimental Secondary Hyperparathyroidism. *Int J Nephrol.* 2012;2012:123576. PubMed PMID: 23094155. Pubmed Central PMCID: 3474253. Epub 2012/10/25. eng.

26. Roman-Garcia P, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, Rodriguez I, Ortiz A, Cannata-Andia JB. Dual-Specificity Phosphatases Are Implicated in Severe Hyperplasia and Lack of Response to FGF23 of Uremic Parathyroid Glands from Rats. *Endocrinology*. 2012 Apr;153(4):1627-37. PubMed PMID: 22334717. Epub 2012/02/16. eng.
27. Lewin E. Parathyroid hormone regulation in normal and uremic rats. Reversibility of secondary hyperparathyroidism after experimental kidney transplantation. *Dan Med Bull*. 2004 May;51(2):184-206. PubMed PMID: 16009056. Epub 2005/07/13. eng.
28. Santamaria E, Avila MA, Latasa MU, Rubio A, Martin-Duce A, Lu SC, et al. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18;100(6):3065-70. PubMed PMID: 12631701. Pubmed Central PMCID: 152247. Epub 2003/03/13. eng.
29. Hendy GN, Canaff L, Cole DE. The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jun;27(3):285-301. PubMed PMID: 23856260. Epub 2013/07/17. eng.
30. Olauson H, Lindberg K, Amin R, Sato T, Jia T, Goetz R, et al. Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. *PLoS Genet*. 2013;9(12):e1003975. PubMed PMID: 24348262. Pubmed Central PMCID: 3861040. Epub 2013/12/19. eng.
31. Studer H, & Derwahl M. Mechanisms of nonneoplastic endocrine hyperplasia--a changing concept: a review focused on the thyroid gland. *Endocrinology Rev*. 16: 411-26, 1995.
32. Ratel D, Ravanat JL, Wion D. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays*. Mar; 28(3): 309-15, 2006.