



Universidad de Oviedo

Programa de doctorado: Ciencias de la Salud

**Klotho soluble como biomarcador de daño  
renal y vascular en la enfermedad renal  
crónica clínica y experimental**

Julia Martín Vírgala





Universidad de Oviedo

## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Klotho soluble como biomarcador de daño renal y vascular en la enfermedad renal crónica clínica y experimental	Inglés: Soluble Klotho as biomarker of kidney and vascular damage in clinical and experimental chronic kidney disease
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: Julia Martín Virgala	DNI/Pasaporte/NIE: 507210001
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

#### Objetivo:

Esta tesis pretende investigar el papel de la forma soluble de la proteína Klotho (sKlotho) como posible biomarcador de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral asociadas a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD), así como la aplicación de técnicas sencillas y no invasivas para detectar daño vascular en la enfermedad renal crónica (ERC).

#### Metodología y resultados:

**Estudio en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5.** Se evaluaron la bioquímica general, marcadores del metabolismo óseo y mineral y sKlotho. Además, se utilizaron técnicas no invasivas para evaluar rigidez aórtica (velocidad de onda de pulso, VOP) y neovascularización de la capa adventicia en carótida y femoral (ecografía ultrasensible para la detección de microflujo, SMI).

En la ERC, sKlotho sérico disminuyó antes de que FGF23 aumentara. Además, con la progresión de la ERC, sKlotho sérico mostró tendencia a la reducción. En la ERC, sKlotho urinario aumentó y no se correlacionó con sKlotho sérico.

Los pacientes en ERC-5 mostraron aumento tanto de la rigidez aórtica como del grosor íntima-media carotídeo. En la ERC se encontró correlación negativa entre sKlotho sérico y el grosor íntima-media carotídeo. En ERC-4 se observó aumento de la neovascularización de la capa adventicia carotídea. Se encontró correlación positiva entre rigidez aórtica y neovascularización de la capa adventicia carotídea.

**Modelo de insuficiencia renal crónica (IRC) en ratón.** Se evaluó la bioquímica general y del metabolismo óseo y mineral, así como sKlotho sérico y urinario. También se extrajeron el riñón, la aorta torácico-abdominal y la tibia izquierda. Frente al grupo de referencia (grupo Sham para IRC), se estableció un grupo con IRC 5/6 con dieta normal (IRC+PN) y un grupo con IRC 5/6 alimentado con dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) para estudiar daño renal, vascular y óseo inducido por el fósforo.

FGF23 aumentó en el grupo IRC+PA, sKlotho sérico disminuyó en los grupos IRC+PN e IRC+PA y sKlotho urinario disminuyó en IRC+PA. No se encontró correlación entre sKlotho sérico y urinario.

Los grupos IRC mostraron correlación positiva entre la expresión renal de Klotho y los valores de sKlotho sérico. En estos mismos ratones se observó aumento de la fibrosis y de los depósitos de calcio a nivel renal y menor expresión génica de  $\alpha$ -actina y Sost en aorta.

Los ratones IRC+PN mostraron niveles séricos elevados de P1NP (formación ósea) y CTX-I



Universidad de Oviedo

(resorción ósea) y el grupo IRC+PA mostró aumentos únicamente de P1NP. Ambos grupos IRC presentaron una tendencia de disminución en los niveles séricos de RANKL y aumento de OPG. Mediante análisis de microtomografía computarizada ( $\mu$ CT) e histomorfometría ósea se observó que los ratones IRC+PN presentaron aumentos de osteoide y de la superficie osteoblástica. El grupo IRC+PA mostró mayor porosidad cortical y menor grosor y volumen corticales.

**Modelo *in vitro* de calcificación vascular en células de músculo liso vascular (CMLV).**

Tras 72 horas, la adición de sKlotho previno la transición osteogénica inducida por las condiciones calcificantes. Además, tras 24 horas, sKlotho indujo autofagia en condiciones calcificantes.

**Conclusiones:**

sKlotho sérico fue un biomarcador temprano de CKD-MBD. Podría ser útil para predecir la expresión renal de Klotho y un potencial biomarcador del aumento del grosor íntima-media carotídeo en la ERC.

Aunque la VOP y la ecografía SMI detectaron daño vascular en estadios avanzados de ERC, estas técnicas podrían tener utilidad clínica para diagnosticar daño vascular de manera sencilla y no invasiva antes de la entrada en diálisis.

El modelo de IRC en ratón mostró que el exceso de fósforo podría alterar el remodelado óseo. La adición de sKlotho previno la diferenciación osteogénica en condiciones calcificantes *in vitro*, por lo que sKlotho podría ser una potencial herramienta terapéutica frente a la calcificación vascular, pudiendo ser la autofagia un mecanismo implicado en la acción protectora de sKlotho sobre la vasculatura.

**RESUMEN (en Inglés)**

**Aims:**

This study aims to investigate the role of soluble Klotho (sKlotho) as possible biomarker of chronic kidney disease & mineral bone disorders (CKD-MBD), as well as the application of simple and non-invasive techniques to detect vascular damage in chronic kidney disease (CKD).

**Methodology and results:**

**CKD patients on stages CKD-2/3a to CKD-5.** General biochemistry, markers of bone and mineral metabolism, and sKlotho were evaluated. In addition, non-invasive techniques were employed to assess aortic stiffness (pulse wave velocity, PWV) and adventitial neovascularization in the carotid and femoral arteries (superb microvascular imaging, SMI).

In CKD, serum sKlotho decreased before FGF23 increased. Furthermore, with the progression of CKD, serum sKlotho exhibited a decreasing trend. In CKD, urinary sKlotho increased and did not correlate with serum sKlotho values.

Patients in CKD-5 showed an increase in both aortic stiffness and carotid intima-media thickness. In CKD, a negative correlation was found between serum sKlotho and carotid intima-media thickness. In CKD-4, an increase in carotid adventitial neovascularization was observed. Additionally, a positive correlation was found between aortic stiffness and carotid adventitial neovascularization.

**Chronic kidney disease mice model.** General biochemistry, bone and mineral metabolism markers, as well as serum and urinary sKlotho were assessed. Furthermore, the kidney, the thoraco-abdominal aorta and the left tibia were collected. In addition to the reference group (Sham group for CKD), two experimental groups were established, one fed a normal diet (CKD+NP) and another one fed a high-phosphorus diet (CKD+HP) to evaluate kidney, vascular and bone damage induced by phosphorus.



Universidad de Oviedo

FGF23 levels increased in the CKD+HD group, while serum sKlotho decreased in both CKD+NP and CKD+HP mice. Urinary sKlotho decreased in the CKD+HP group, but no significant correlation was found between serum and urinary sKlotho values.

CKD groups exhibited a positive correlation between kidney Klotho expression and serum sKlotho. These same mice displayed increased kidney fibrosis and calcium deposits, along with reduced gene expression of  $\alpha$ -actin and Sost in the aorta.

CKD+NP mice showed higher serum levels of P1NP (bone formation) and CTX-I (bone resorption), whereas the CKD+HP group exhibited an increase only in P1NP. Both CKD groups displayed a trend of decreased serum levels of RANKL and an increase in OPG. Microcomputed tomography ( $\mu$ CT) and bone histomorphometry analysis showed that CKD+NP mice displayed increased osteoid and osteoblastic surface. CKD+HD mice revealed greater cortical porosity and reduced cortical thickness and volume.

***In vitro* vascular calcification model in vascular smooth muscle cells (VSMCs).** After 72 hours, the addition of sKlotho prevented the osteogenic transition induced by calcifying conditions. Additionally, after 24 hours, sKlotho induced autophagy under calcifying conditions.

**Conclusions:**

Serum sKlotho was identified as an early biomarker of CKD-MBD. It holds potential for predicting kidney Klotho expression and could serve as a biomarker to predict increased carotid intima-media thickness in CKD.

While PWV and SMI ultrasound detected vascular damage in advanced CKD stages, these techniques may have clinical application for non-invasive and straightforward diagnosis of vascular damage before entering dialysis.

The CKD mice model showed that excessive phosphorus could disrupt bone remodeling.

The addition of sKlotho prevented osteogenic differentiation under calcifying conditions *in vitro*. Therefore, sKlotho could be a potential therapeutic tool against vascular calcification, with autophagy potentially playing a role in the protective effects of sKlotho on the vasculature.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN \_\_\_\_\_



## Abreviaturas

<b>μCT</b>	microtomografía computarizada
<b>ADH</b>	hormona antidiurética
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato
<b>BMP6</b>	proteína morfogenética ósea 6
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>BUN</b>	nitrógeno ureico plasmático
<b>BV/TV</b>	volumen óseo total
<b>CaSR</b>	receptor sensor de calcio
<b>CEUS</b>	ecografía con contraste intravenoso
<b>CK1</b>	caseína quinasa 1
<b>CKD-MBD</b>	alteraciones del metabolismo mineral y óseo en la enfermedad renal crónica
<b>CMLV</b>	células de músculo liso vascular
<b>Ct. BS/BV</b>	porosidad cortical
<b>Ct. Th.</b>	grosor cortical
<b>Ct. V</b>	volumen cortical
<b>CT-1</b>	cardiotrofina 1
<b>CTGF</b>	factor de crecimiento del tejido conectivo
<b>CTX-I</b>	telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DEXA</b>	absorciometría de rayos X dual
<b>Dkk</b>	dickkopfs
<b>DMEM</b>	medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium
<b>DMO</b>	densidad mineral ósea

## Abreviaturas

---

<b>ERC</b>	enfermedad renal crónica
<b>FBS</b>	suero fetal bovino
<b>FGF23</b>	factor de crecimiento fibroblástico 23
<b>FGFR1</b>	receptor 1 para el factor de crecimiento fibroblástico
<b>Frz</b>	Frizzled
<b>GAPDH</b>	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GSK3</b>	glicógeno sintasa quinasa 3
<b>HCl</b>	ácido clorhídrico
<b>IF</b>	inmunofluorescencia
<b>IHC</b>	inmunohistoquímica
<b>IL-13</b>	interleuquina 13
<b>IL-6</b>	interleuquina 6
<b>IMC</b>	índice de masa corporal
<b>IRC</b>	insuficiencia renal crónica
<b>LGR4</b>	receptor 4 acoplado a proteína G con repeticiones ricas en leucina
<b>LRP5/6</b>	proteína 5/6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
<b>MAP1LC3B</b>	isoforma B de la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos
<b>MC</b>	medio calcificante
<b>N.Ob/B.Pm</b>	número de osteoblastos
<b>N.Oc/B.Pm</b>	número de osteoclastos
<b>NaPi-2a</b>	transportador de sodio y fosfato 2a
<b>NaPi-2c</b>	transportador de sodio y fosfato 2c
<b>NF</b>	medio de cultivo sin nutrientes
<b>Ob.S/BS</b>	superficie osteoblástica
<b>Oc.S/BS</b>	superficie osteoclástica
<b>OPG</b>	osteoprotegerina
<b>OS/BS</b>	superficie de osteoide
<b>OV/BV</b>	volumen de osteoide
<b>P1NP</b>	propéptido amino-terminal del procolágeno tipo 1
<b>PA</b>	dieta con alto contenido en fósforo
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa

<b>PN</b>	dieta normal en fósforo
<b>PTH</b>	parathormona
<b>PTH1R</b>	receptor 1 para la PTH
<b>PVDF</b>	difluoruro de polivinilideno
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RAAS</b>	sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>RANK</b>	receptor activador del factor nuclear $\kappa$ B
<b>RANKL</b>	ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa$ B
<b>RIPA</b>	tampón de extracción de proteínas
<b>Sfrps</b>	proteínas secretadas relacionadas con frizzled
<b>sKlotho</b>	klotho soluble
<b>SMI</b>	ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo
<b>Sost</b>	esclerostina
<b>SP1</b>	esfingosina 1 fosfato
<b>TAC</b>	tomografía axial computarizada
<b>Tb. N</b>	número de trabéculas
<b>Tb. Th.</b>	grosor trabecular
<b>Tb.Sp.</b>	separación trabecular
<b>TBST</b>	tampón salino Tris-Tween 20
<b>TFG</b>	tasa de filtración glomerular
<b>TFGe</b>	tasa de filtración glomerular estimada
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>VEGFA</b>	factor de crecimiento endotelial vascular A
<b>VOP</b>	velocidad de la onda de pulso
<b>WB</b>	western blot
<b>Wnt</b>	wingless integrated



---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>Características generales de las alteraciones asociadas a la enfermedad renal crónica</b> .....	<b>3</b>
Fisiología renal.....	3
Enfermedad renal crónica .....	5
Etiopatogenia de la CKD-MBD .....	9
Calcificación vascular.....	17
Alteraciones óseas.....	25
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>33</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>34</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>1. Estudio en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5</b> .....	<b>37</b>
Diseño del estudio.....	38
Parámetros clínicos y marcadores bioquímicos.....	38
Daño vascular: velocidad de onda de pulso (VOP) y ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI).....	39
Confidencialidad y sistema de tratamiento de los datos .....	40
<b>2. Modelo de IRC moderada en ratón</b> .....	<b>41</b>
Diseño experimental .....	42
Marcadores bioquímicos .....	43
Procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina .....	44
Inmunohistoquímica de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina y Klotho en riñón.....	45
Cuantificación de los depósitos de calcio en tejidos blandos.....	47
Fibrosis intersticial en riñón .....	47
Inmunofluorescencia en aorta para el análisis de la autofagia.....	47
Análisis <i>ex vivo</i> de la microarquitectura ósea .....	48
<b>3. Estudio <i>in vitro</i> en CMLV</b> .....	<b>53</b>

Obtención del cultivo primario de CMLV de rata .....	53
Efecto de sKlotho sobre la diferenciación osteogénica en CMLV .....	54
sKlotho, diferenciación osteogénica en CMLV y autofagia .....	54
Cuantificación del depósito de calcio en las CMLV .....	56
<b>4. Metodología común a los tres modelos.....</b>	<b>56</b>
Extracción de ARN.....	56
Síntesis de ADN complementario .....	56
PCR cuantitativa (qPCR) .....	57
Extracción de proteínas .....	58
Western blot.....	59
<b>Análisis estadísticos .....</b>	<b>60</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>Estudio en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 y controles .....</b>	<b>63</b>
Klotho soluble en la progresión de la ERC .....	63
Marcadores de daño vascular en la ERC .....	65
<b>Niveles de sKlotho y daño renal y vascular en un modelo de IRC moderada en ratón.....</b>	<b>70</b>
Parámetros bioquímicos y función renal .....	70
Expresión de Klotho en riñón .....	73
Fibrosis renal .....	74
Vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en riñón.....	75
Depósitos de calcio en riñón y diferenciación osteogénica en aorta.....	76
<b>Marcadores séricos y alteraciones en la histología y microarquitectura ósea en un modelo de IRC moderada en ratón .....</b>	<b>78</b>
<b>Efecto de sKlotho sobre la calcificación vascular <i>in vitro</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>Autofagia y daño vascular .....</b>	<b>82</b>
Modelo de IRC en ratón: niveles de autofagia en aorta.....	82
Modelo de calcificación vascular <i>in vitro</i> : sKlotho como inductor de la autofagia .....	83

---

<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>87</b>
<b>1. Niveles de sKlotho sérico y urinario en CKD-MBD</b> .....	<b>89</b>
sKlotho sérico y urinario en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 .....	89
sKlotho sérico y urinario en un modelo de IRC en ratón.....	91
sKlotho sérico y Klotho renal en un modelo de IRC en ratón.....	91
Daño renal en el modelo de IRC en ratón: vía de Wnt .....	92
<b>2. Daño vascular y niveles de sKlotho en CKD-MBD</b> .....	<b>93</b>
Rigidez aórtica en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 .....	93
Aterosclerosis, grosor íntima-media carotídeo y neovascularización de la capa adventicia en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5.....	94
Diferenciación osteogénica en un modelo de IRC en ratón .....	96
<b>3. Alteraciones óseas en un modelo de IRC en ratón</b> .....	<b>97</b>
<b>4. sKlotho y daño vascular: posibles mecanismos implicados</b> .....	<b>99</b>
<b>Limitaciones y fortalezas del estudio</b> .....	<b>100</b>
<b>RETOS PARA EL FUTURO</b> .....	<b>101</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>109</b>
<b>PUBLICACIONES</b> .....	<b>135</b>



## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas en Western Blot, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. ....	46
<b>Tabla 2:</b> Ensayos pre-diseñados para la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). 58	
<b>Tabla 3:</b> Parámetros clínicos, bioquímicos y sKlotho en los pacientes con ERC. .	64
<b>Tabla 4:</b> Presencia de placas de ateroma en las arterias carótida y femoral en el grupo control y pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5. ....	68
<b>Tabla 5:</b> Peso y marcadores de daño renal en el modelo de IRC en ratón.....	72
<b>Tabla 6.</b> Valores de $\mu$ CT e histomorfometría ósea en el modelo de IRC en ratón.	80

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Regulación de la vía de Wnt. ....	9
<b>Figura 2:</b> Interacción entre los reguladores del metabolismo óseo y mineral.....	11
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo de las acciones de FGF23 y $\alpha$ Klotho en el riñón.. .....	15
<b>Figura 4:</b> Estructura de la pared arterial mediante una imagen esquemática. ....	18
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo del proceso de calcificación vascular. ....	20
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo del proceso de autofagia.....	22
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo del estudio de la velocidad de onda de pulso (VOP) entre la arteria carótida y femoral. ....	24
<b>Figura 8:</b> Imagen de la arteria carótida obtenida mediante ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI).....	25
<b>Figura 9:</b> Esquema representativo del procesamiento de una tibia de ratón. ....	29
<b>Figura 10:</b> Esquema del diseño experimental del estudio in vivo. ....	41
<b>Figura 11:</b> sKlotho sérico, FGF23 y creatinina en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO.....	65
<b>Figura 12:</b> Daño vascular en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO.....	67
<b>Figura 13:</b> Correlación entre los niveles de sKlotho sérico y el grosor íntima-media carotídeo en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del	

---

estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO.....	69
<b>Figura 14:</b> Correlación entre el IMC y el área de neovascularización de la capa adventicia carotídea en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO.....	70
<b>Figura 15:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre la expresión renal de Klotho en el modelo murino. ....	74
<b>Figura 16:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre la fibrosis renal en el modelo murino.....	75
<b>Figura 17:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los componentes de la vía en Wnt/ $\beta$ -catenina en el riñón en el modelo murino.....	76
<b>Figura 18:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre la formación de depósitos de calcio en el riñón en el modelo murino. ....	77
<b>Figura 19:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre el proceso de diferenciación osteogénica en la aorta del modelo murino. ....	78
<b>Figura 20:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los marcadores séricos de formación (P1NP) y resorción (CTX-I) ósea en el modelo murino.....	78
<b>Figura 21:</b> Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los niveles séricos de los reguladores de la vía RANK/RANKL/OPG en el modelo murino. ....	79

- Figura 22:** Efecto de sKlotho sobre la diferenciación osteogénica de células de músculo liso vascular de cultivo primario (CMLV) expuestas a medio control, medio calcificante (MC) y MC+sKlotho durante 72 horas. .... 82
- Figura 23:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los niveles de autofagia en la aorta del modelo murino. .... 83
- Figura 24:** Efecto de sKlotho sobre la autofagia en células de músculo liso vascular de cultivo primario (CMLV) expuestas a medio control, medio calcificante (MC) y MC+sKlotho durante 24 horas. .... 84
- Figura 25:** Efecto de sKlotho sobre la autofagia en células de músculo liso vascular de rata de la línea comercial A7r5 expuestas a medio control, medio calcificante (MC) y MC+sKlotho durante 24 horas. .... 85
- Figura 26:** Esquema que integra los resultados del estudio en pacientes con ERC, modelo de IRC en ratón y modelo de calcificación in vitro en CMLV acerca del papel de sKlotho en la ERC. .... 92
- Figura 27:** Uso de las técnicas no invasivas VOP -evaluación de la rigidez aórtica- y SMI -detección de neovascularización de la capa adventicia- para detectar daño vascular en la ERC en etapas avanzadas de la enfermedad, pero antes de que el paciente entre en diálisis ..... 94

## **INTRODUCCIÓN**



## **Características generales de las alteraciones asociadas a la enfermedad renal crónica**

### **Fisiología renal**

El riñón es el órgano encargado de filtrar la sangre, eliminando sustancias que el organismo no necesita, moléculas tóxicas y agua. Pero el riñón no sólo se encarga de la depuración de la sangre; su función de reabsorción tanto de agua como de electrolitos, glucosa, aminoácidos y proteínas es imprescindible para mantener la homeostasis. Además, el riñón cumple una importante tarea como órgano endocrino, produciendo hormonas, como la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (calcitriol), renina y eritropoyetina (1).

La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona, la cual está compuesta de un glomérulo y un túbulo contorneado que desemboca en el túbulo colector. El glomérulo se compone de una red de capilares sanguíneos en estrecho contacto con el mesangio, todo ello rodeado de la cápsula de Bowman (1).

La filtración en el capilar glomerular ocurre a través de los poros endoteliales y la membrana glomerular basal. Estas estructuras son altamente permeables al agua, pequeños solutos e iones. La permeabilidad a las macromoléculas depende de su tamaño, forma y carga (2).

El plasma que ha atravesado la barrera glomerular pasa al túbulo proximal, donde tiene lugar la primera fase de reabsorción. Aquí se reabsorben distintos iones (sodio, potasio, cloro, bicarbonato), la mayor parte de la glucosa, aminoácidos y proteínas de pequeño tamaño. El túbulo proximal presenta adaptaciones específicas para optimizar la reabsorción, como la estructura de borde en cepillo y la interdigitación basolateral, la cual aumenta la superficie de contacto entre una célula y otra. El proceso de reabsorción ocurre a través de mecanismos de endocitosis y por transporte activo y pasivo. La nefrona continúa en el asa de Henle, donde su segmento ascendente está especializado en la concentración de la orina gracias a la reabsorción masiva de agua. Esto se consigue mediante la generación de un

gradiente de concentración de distintos solutos y en el que la urea juega un papel esencial. Finalmente, en el túbulo distal se lleva a cabo la reabsorción final de sodio (1).

La orina que ha llegado hasta el túbulo distal pasa al túbulo colector. Los túbulos colectores de cada nefrona acaban confluyendo, transportando la orina hacia la pelvis renal, que desemboca en los uréteres, ya comunicados con la vejiga (1).

Todo el proceso comentado anteriormente está regulado por distintas hormonas:

- Hormona antidiurética (ADH, del inglés antidiuretic hormone): Se libera desde la glándula pituitaria en respuesta a un aumento de la osmolaridad de la sangre o de una bajada de la presión arterial. La ADH es reconocida por los receptores V2 en los túbulos renales, de manera que se activa una cascada de transducción que da lugar a la expresión de acuaporinas para promover la reabsorción de agua (3).
- Aldosterona: Se libera en las glándulas suprarrenales como respuesta a una bajada de la presión arterial o aumento de la osmolaridad de la sangre. Esta hormona actúa sobre el receptor mineralocorticoide en las células del túbulo distal (4), activando la bomba sodio-potasio y permitiendo la reabsorción de sodio y consecuentemente de agua (5).
- Péptido natriurético atrial: Se sintetiza fundamentalmente en los miocitos auriculares y ventriculares como respuesta a un aumento de la presión arterial. Esta hormona promueve la vasodilatación de la arteriola aferente, inhibe los transportadores de sodio y disminuye la expresión de acuaporinas en los túbulos renales (6).
- Parathormona (PTH, del inglés parathyroid hormone): Es sintetizada por la glándula paratiroides como respuesta a concentraciones bajas de calcio y elevadas de fósforo en la sangre. La PTH aumenta la reabsorción de calcio, la excreción de fósforo y la expresión de la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa para la síntesis de calcitriol (7). La PTH es la hormona más importante en la regulación del metabolismo óseo y mineral, por lo que tendrá un apartado específico en este trabajo.

## **Enfermedad renal crónica**

La tasa de filtración glomerular (TFG) es el producto de la tasa de filtración media de cada nefrona, multiplicado por el número de nefronas en ambos riñones. Los niveles normales para la TFG son de aproximadamente 130 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> en hombres y de 120 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> en mujeres. Sin embargo, existe una gran variación interindividual según la edad, sexo, peso, actividad física, dieta, farmacoterapia y ciertos estados fisiológicos, como el embarazo. Para estandarizar el valor de función renal, la TFG se ajusta según la superficie total del cuerpo, dependiente de la altura y peso, y se expresa por 1,73 m<sup>2</sup>, que es la superficie corporal media en hombres y mujeres jóvenes. Existen diversas fórmulas para estimar la TFG, las cuales presentan distintos factores de corrección, pero todas están basadas en el valor sérico de la creatinina o de la cisteína, debido a que estas moléculas apenas sufren reabsorción tubular (2).

La reducción de la TFG ocurre por la pérdida de nefronas o bien por la disminución en la TFG individual de cada nefrona por alteraciones fisiológicas o hemodinámicas. La pérdida de nefronas puede verse compensada por una hipertrofia glomerular o un aumento en la presión capilar glomerular. Es por ello que un daño renal importante puede tardar en reflejarse en la TFG (8).

La función renal disminuye con la edad y por distintas enfermedades. La diabetes, hipertensión y distintos tipos de glomerulopatías dan lugar a la enfermedad renal crónica (ERC), que se define como un daño renal, asociado a una reducción de la TFG y/o albuminuria durante más de tres meses. La incidencia y prevalencia de la ERC varía en función de la región geográfica, pero se puede afirmar que su incidencia oscila entre el 10 y 13% (9-11).

Debido al desequilibrio en los reguladores del metabolismo óseo y mineral que ocurre en la ERC, esta enfermedad se asocia con alteraciones óseas (aumento de la fragilidad y fracturas) y vasculares (calcificación y rigidez vascular), que aumentan la morbilidad y mortalidad de estos pacientes, además de suponerles una pérdida de la calidad de vida (12). Inicialmente, las alteraciones óseas se agruparon bajo el nombre

de osteodistrofia renal. Sin embargo, en 2006 se acuñó un nuevo término, “*Alteraciones del metabolismo mineral y óseo en la enfermedad renal crónica*” (CKD-MBD, del inglés *Chronic kidney disease-mineral & bone disorders*) (13), que incluye tanto las alteraciones bioquímicas y óseas, como las alteraciones del recambio óseo y las fracturas por fragilidad, la calcificación vascular y otras alteraciones cardiovasculares (12, 14, 15). En este trabajo se utilizará el término derivado del inglés CKD-MBD para referirse a estas alteraciones.

Existe una gran variedad de alteraciones que tienen lugar en el riñón durante la ERC, como inflamación, daño en los podocitos, hipertrofia glomerular o depósitos anormales de proteínas, que son factores que llevan a la fibrosis renal (1). El siguiente apartado se centrará en la fibrosis renal y en el papel que juega la vía de Wnt en este proceso.

### **Fibrosis renal**

La matriz extracelular es una estructura tridimensional acelular presente en todos los tejidos y que es esencial para el organismo. Su función va más allá del soporte físico del tejido, ya que es una estructura dinámica que es remodelada constantemente (16). La matriz extracelular se compone de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas (lamina, fibronectina). Todos estos componentes son sintetizados por las células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos (17), los cuales también sintetizan moléculas implicadas en la degradación de la matriz, como las metaloproteinasas (18). Cuando el equilibrio se altera y las células productoras proliferan en exceso, se diferencian o se desequilibra la producción y degradación de matriz extracelular, tienen lugar procesos patológicos, como la fibrosis (17).

La pérdida de nefronas durante la progresión de la ERC activa una serie de respuestas de reparación no específicas que derivan en fibrosis intersticial. De esta manera se va perdiendo tejido funcional mientras avanza el proceso de cicatrización (19). La fibrosis renal es la causa principal de la pérdida de función renal y el elemento común de las distintas causas de la ERC (19).

El daño renal implica la infiltración de células inflamatorias, albuminuria o glucosuria, los cuales activan a las células tubulares, que secretarán mediadores proinflamatorios y profibróticos. Por otro lado, la fibrosis implica la pérdida de la vascularización y la consecuente isquemia, por lo que las nefronas restantes incrementan su tamaño para compensar la pérdida de función renal. La sobrecarga de estas nefronas acelera el daño, dando lugar a un círculo vicioso que promueve la progresión de la ERC (20).

Desde el punto de vista molecular, la fibrosis comienza cuando los fibroblastos se activan y proliferan o bien otros tipos celulares sintetizan matriz extracelular de manera descontrolada (21-23). Entre los factores activadores de los fibroblastos se encuentra el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , del inglés transforming growth factor  $\beta$ ) (24), interleuquinas como la IL-13 (23) y la IL-6 (25), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, del inglés connective tissue growth factor) (26) o los ligandos Wnt (del inglés wingless integrated) (27). Los fibroblastos, y otros tipos celulares, como los macrófagos, pueden diferenciarse a miofibroblastos, que poseen características intermedias entre los fibroblastos y las células de músculo liso y están especializados en procesos de reparación y cicatrización (23). La interacción entre miofibroblastos, células inflamatorias y células epiteliales tubulares da lugar a la progresión de la fibrosis renal (28-31).

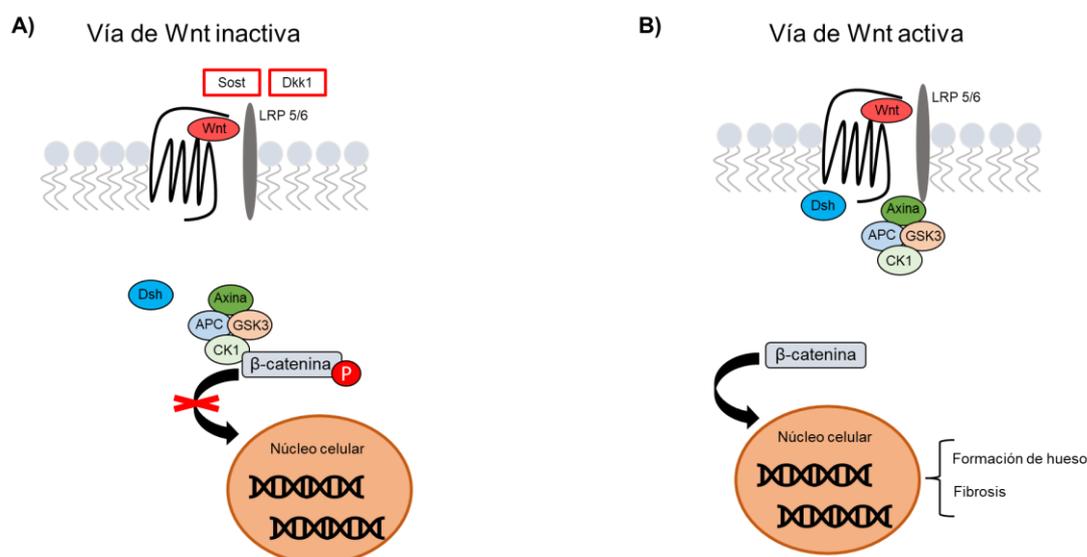
Un elemento importante en la génesis de la fibrosis renal es la vía de Wnt. La vía de Wnt participa en múltiples procesos celulares, así como en distintas vías de señalización durante el desarrollo embrionario. En el adulto, la vía de Wnt está implicada en la formación de hueso, pero su reactivación también se asocia a procesos patológicos, como el cáncer o la fibrosis (32).

Esta vía consta de un receptor transmembrana denominado Frizzled (Frz), un correceptor denominado proteína 5/6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5/6, del inglés low-density-lipoprotein receptor-related protein 5/6) y una serie de ligandos Wnt, 19 en el caso de los mamíferos. Cuando la cascada está inactiva, el complejo proteico Dishevelled-Axina-APC se encuentra libre en el citoplasma y la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3, del inglés glycogen synthase

kinase-3) y la caseína quinasa 1 (CK1, del inglés casein kinase-1) fosforilan a la  $\beta$ -catenina. De esta forma la  $\beta$ -catenina se degrada y no se transloca al núcleo celular (33) (**Figura 1A**).

En cambio, cuando cualquier ligando Wnt se une al receptor Frz, el complejo proteico queda bloqueado, la  $\beta$ -catenina no se fosforila ni se degrada, y entra al núcleo, donde actúa como factor de transcripción (33) (**Figura 1B**).

Como casi todas las vías de señalización, la vía de Wnt presenta inhibidores. Algunos de los más importantes son los Dickkopfs (Dkk) (34) y la esclerostina (Sost) (35), los cuales bloquean la vía al unirse al correceptor LRP5/6 (**Figura 1A**). Existen cuatro proteínas en la familia de los Dkk, denominadas Dkk1, Dkk2, Dkk3 y Dkk4 (36). Los más estudiados en el ámbito de la CKD-MBD son Dkk1, sintetizado principalmente por los osteocitos e implicado en la formación de hueso (37) y Dkk3, sintetizado por las células tubulares del riñón en situaciones patológicas y que participa en el desarrollo de la fibrosis (38, 39). Existen otros inhibidores de la vía de Wnt que han sido menos estudiados, como las proteínas secretadas relacionadas con frizzled (Sfrps, del inglés secreted frizzled related proteins), que capturan a los ligandos Wnt (32), o la proteína  $\alpha$ Klotho, que también puede participar en la inhibición de la vía al unirse al ligando Wnt3a (40, 41). Varios estudios en modelos animales han mostrado cómo  $\alpha$ Klotho protege frente a la fibrosis renal (42, 43).



**Figura 1:** Regulación de la vía de Wnt. A) Vía de Wnt inactiva. En ausencia de ligandos Wnt o bien por la acción de inhibidores (Sost y Dkk1, entre otros), el complejo proteico Dsh-Axina-APC-GSK3-CK1 se encuentra libre en el citoplasma y fosforila a la  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina fosforilada es degradada, de manera que no puede entrar al núcleo celular. B) Vía de Wnt activa. Cuando el ligando Wnt se une al receptor Frizzled y al correceptor LRP5/6, el complejo Dsh-Axina-APC-GSK3-CK1 queda retenido en la membrana plasmática y las quinasas no pueden ejercer su acción, de manera que la  $\beta$ -catenina se encuentra libre en el citoplasma y entra al núcleo celular, donde actúa de factor de transcripción.

Los fibroblastos se pueden activar por acción de los ligandos Wnt, liberados por los propios fibroblastos, por las células tubulares epiteliales o por los macrófagos y otras células inflamatorias en el riñón (44). Distintos estudios han relacionado la sobreactivación de la vía de Wnt con un incremento de fibrosis renal (43, 45, 46).

En resumen, la vía de Wnt tiene un papel crucial en la fibrosis renal, por lo que sus componentes e inhibidores podrían llegar a ser posibles dianas terapéuticas para atenuar la fibrosis y reducir la progresión de la ERC (42, 47, 48).

### Etiopatogenia de la CKD-MBD

Actualmente la creatinina es el marcador de referencia para medir la función renal, ya que al no reabsorberse a nivel tubular, toda la creatinina filtrada es excretada, correlacionándose de manera precisa con la TFG (2). Debido a las alteraciones del metabolismo óseo y mineral asociadas a la ERC, en estos pacientes también se

cuantifican los biomarcadores del metabolismo mineral, como el calcio, fósforo, PTH, vitamina D y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23, del inglés fibroblast growth factor 23), que además pueden aportar información indirecta del estado del hueso (12).

Hasta ahora no existen biomarcadores de daño vascular temprano en la CKD-MBD y la calcificación vascular se diagnostica cuando ya está establecida (49-52) mediante técnicas clásicas como la radiología simple, utilizando para su cuantificación algoritmos como los índices de Kauppila (53) y de Adragao (54), así como otras estrategias para cuantificar la magnitud de la calcificación vascular.

A continuación, se analizan aspectos de interés de los principales elementos reguladores del metabolismo óseo y mineral, cómo se ven afectados sus niveles en la ERC y qué influencia tienen en la aparición de la CKD-MBD.

## **Calcio**

El calcio es uno de los principales componentes del hueso, constituyendo la matriz mineral de hidroxapatita junto con el fósforo (55). Además, el calcio participa en importantes procesos biológicos, siendo esencial para la contracción muscular, la señalización neuronal (55) o las cascadas de coagulación sanguínea (56).

El calcio del organismo proviene de la dieta y se absorbe a través del intestino. Esta absorción está regulada por una de las principales hormonas del metabolismo óseo y mineral, el calcitriol. Además, el metabolismo del calcio también está regulado por la PTH, liberada por la glándula paratiroides. Ambas hormonas son sintetizadas en situaciones de hipocalcemia: el calcitriol promueve la absorción del calcio a nivel intestinal y la PTH provoca la liberación de calcio desde el hueso y la síntesis de calcitriol en el riñón (57) (**Figura 2A**).

Los pacientes con ERC presentan hipocalcemia, pero cuando la enfermedad progresa y la liberación de PTH se descontrola puede dar lugar a una hipercalcemia (12, 58-60). En pacientes con ERC severa en diálisis la hipocalcemia puede ser favorecida por el uso de calcimiméticos, que inhiben la síntesis de PTH (12) (**Figura 2C**).



proteína sintetizada principalmente en el riñón y de la que se hablará más detenidamente en apartados posteriores, mostraron hiperfosfatemia debido a una menor excreción de fósforo. Estos ratones nulos para FGF23, nulos para  $\alpha$ Klotho o bien el doble mutante, presentaron un fenotipo de envejecimiento acelerado que incluía crecimiento retardado, atrofia en distintos tejidos y órganos, sarcopenia, calcificación vascular (65-68), osteopenia (69), hipertrofia cardíaca y fibrosis (70, 71), disfunción cognitiva (72) y una menor esperanza de vida (73, 74). En pacientes en estadios avanzados de ERC se ha observado que la retención de fósforo, junto con niveles elevados de FGF23 y bajos de  $\alpha$ Klotho, se puede asociar con signos de envejecimiento prematuro, hecho que ha motivado que se sugiera la dieta restringida en fósforo como herramienta efectiva para mejorar las alteraciones asociadas al envejecimiento (75, 76).

### **Parathormona (PTH)**

La PTH es una hormona fundamental en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico. Se sintetiza y libera en la glándula paratiroides como respuesta a la bajada en los niveles séricos de calcio y al aumento de fósforo. El aumento del calcio extracelular y la reducción de fósforo disminuyen su síntesis (77-79) (**Figura 2A**). Este proceso está regulado por el receptor sensor de calcio (CaSR, del inglés calcium sensing receptor) expresado en las células paratiroides (78, 80, 81).

En el hueso, la PTH regula el remodelado óseo. Ésta llega a su receptor, el receptor 1 de la PTH (PTH1R, del inglés parathyroid hormone 1 receptor), que se expresa en los osteoblastos. De esta manera los osteoblastos son activados, estimulándose la liberación del ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANKL, del inglés receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  B ligand), que será detectado por los osteoclastos mediante su receptor activador del factor nuclear  $\kappa$  B (RANK, del inglés receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B), promoviendo la resorción ósea y liberando calcio y fósforo a la sangre (82-84). La PTH también actúa a nivel renal, induciendo la expresión de la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa y aumentando consecuentemente la síntesis de calcitriol (57). En el riñón, la PTH además de promover la reabsorción de calcio (63), ejerce acciones fosfatúricas mediante la regulación de la expresión de los

transportadores de sodio y fosfato 2a y 2c (NaPi-2a y NaPi-2c) (**Figura 2A**). Finalmente, estudios recientes sugieren que la PTH también puede ejercer acciones directas sobre la vasculatura, participando en el proceso de calcificación vascular (85-87).

El avance de la ERC se asocia con un aumento progresivo de los niveles de PTH, que da lugar a hiperparatiroidismo secundario, caracterizado por un aumento en la tasa de remodelado óseo, con un exceso de resorción y formación defectuosa de la matriz ósea, dando lugar a pérdida de hueso y fragilidad (12, 88). La salida de calcio y fósforo del hueso también puede promover su depósito en los vasos, causando calcificación vascular (89-91) (**Figura 2C**).

### **Vitamina D**

La vitamina D, cuya forma activa es la 1,25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, también denominada calcitriol, es otra hormona esencial en la regulación del metabolismo óseo y mineral. La vitamina D regula la homeostasis mineral y del hueso, facilita la absorción intestinal del fósforo y del calcio, así como la reabsorción renal de este último, además de inhibir la síntesis de PTH (**Figura 2A-B**). Todas estas acciones son conocidas como “acciones clásicas” de la vitamina D, pero la vitamina D presenta además una serie de “acciones no clásicas”, entre las que se encuentran la protección renal y cardiovascular, la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), la reducción de la proteinuria o el control de la inflamación sistémica (57, 92-94).

El daño renal producido durante la progresión de la ERC da lugar a una deficiencia de calcitriol, no sólo por la pérdida de masa renal funcional, sino también por el aumento de los niveles de FGF23 (59, 79) (**Figura 2B-C**).

### **Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23)**

El FGF23 es una hormona fosfatúrica sintetizada principalmente por los osteocitos como respuesta a un aumento en la concentración sérica de fósforo (62). No está claro cómo los osteocitos detectan el fósforo sérico, pero estudios recientes sugieren que el transportador de sodio fosfato PiT2 (95) y el receptor 1 para el factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1) podrían estar implicados (96).

El FGF23 se une a los receptores FGFR1c, FGFR3c o FGFR4 renales, situados principalmente en el túbulo contorneado proximal. En esta interacción es necesario que  $\alpha$ Klotho actúe como correceptor (97). Esto desencadena una vía de señalización que promueve la internalización y degradación del transportador de fósforo NaPi2a, provocando una disminución en su reabsorción y por lo tanto aumentando su excreción (98) (**Figura 2B**). En condiciones fisiológicas el FGF23 también actúa sobre la glándula paratiroides, inhibiendo la síntesis de PTH (76). Además, el FGF23 podría actuar a nivel cardiaco de manera independiente de  $\alpha$ Klotho (70).

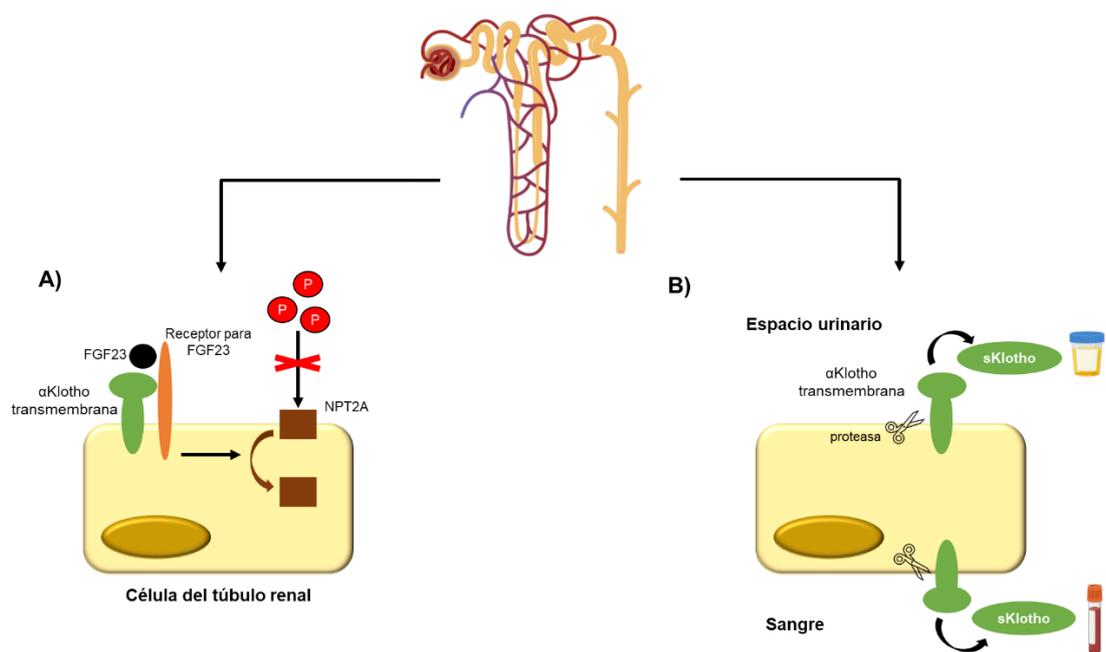
Los niveles de FGF23 se incrementan en estadios tempranos de la ERC (**Figura 2C**) y se alcanzan valores elevados en etapas avanzadas de la enfermedad (99, 100). Esto se asocia a daño sistémico, calcificación vascular y aumento de la mortalidad (70, 101, 102).

### **$\alpha$ Klotho**

En 1997, el grupo japonés liderado por Kuro-o descubrió el gen de  $\alpha$ Klotho durante la generación de una línea de ratones transgénicos. Observaron que esos ratones mostraban un fenotipo con características asociadas a un envejecimiento acelerado, que no se correspondían con el fenotipo de los ratones transgénicos que pretendían generar (73). Esta coincidencia dio lugar al descubrimiento de un nuevo gen, denominado  $\alpha$ Klotho, que más tarde se confirmó como un gen “anti-envejecimiento” (103). La proteína  $\alpha$ Klotho actúa como correceptor del receptor de FGF23 en los túbulos renales (97) (**Figura 2B**). Aunque existen tres isoformas de la proteína Klotho

( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), esta tesis se centrará en  $\alpha$ Klotho, por su implicación en la ERC (76). En el resto de la tesis se hará referencia a la proteína  $\alpha$ Klotho como Klotho.

La forma transmembrana de la proteína Klotho se expresa principalmente en el riñón. Su dominio extracelular puede secretarse (104) o ser escindido por proteasas (ADAM-10 y ADAM-17), de manera que se libera a la circulación sanguínea y a la orina, en forma de Klotho soluble (sKlotho), con un peso molecular de 130 kDa (105) (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema representativo de las acciones de FGF23 y  $\alpha$ Klotho en el riñón. A) El FGF23 se une a su receptor y a  $\alpha$ Klotho, que actúa de coreceptor. Esto desencadena una cascada de transducción que da lugar a la interiorización de los transportadores de fósforo NaPi2a, de manera que el fósforo no es reabsorbido y su excreción aumenta. B) La proteína  $\alpha$ Klotho transmembrana puede ser escindida por acción de proteasas o bien secretada, liberándose a la circulación sanguínea y a la orina en forma de sKlotho.

Varios estudios han postulado que sKlotho presenta acciones sistémicas beneficiosas e independientes de FGF23, como son los efectos anti-fibróticos en el riñón (106), protección frente a la calcificación vascular (65, 66), efectos anti-

apoptóticos en células endoteliales (107, 108), inducción de la autofagia en el corazón y riñón (109), acciones anti-tumorales (110) y protección cardiaca (111-113).

#### sKlotho como biomarcador en la CKD-MBD

La identificación de Klotho como correceptor para el receptor de FGF23 en el riñón generó gran interés por estudiar su papel en la ERC (114). Actualmente se acepta que los niveles séricos de sKlotho se ven reducidos en la ERC (65, 115-118). Lo mismo ocurre con sKlotho urinario (65, 116, 119-122), aunque la interpretación de los valores de sKlotho en orina es todavía un tema controvertido, debido a que no está claro su mecanismo de eliminación a través del riñón (104). Una de las posibles causas de la reducción de sKlotho en la ERC es el propio daño renal, ya que el riñón es la principal fuente de sKlotho (73). También se han propuesto otras causas, como los niveles altos de albuminuria (121), la hiperfosfatemia o la regulación epigenética del promotor del gen Klotho por distintas citoquinas y toxinas urémicas (123).

La disminución de Klotho en la ERC impide que el FGF23 realice su función por falta de correceptor, por lo que se genera una resistencia al FGF23, promoviendo el aumento en sus niveles (124) (**Figura 2C**). A pesar de estas afirmaciones, existe controversia acerca del potencial papel de sKlotho como biomarcador de las alteraciones asociadas a la CKD-MBD y de la progresión de la ERC (125, 126). Algunas de las causas de la inconsistencia de los resultados son la heterogeneidad de los estudios (bajo nivel muestral, imprecisión en el diagnóstico y clasificación de los pacientes) (116-118, 125, 127, 128), la falta de un ensayo estandarizado para evaluar la concentración de sKlotho (129-131) y la ausencia de consenso para el procesamiento de las muestras (132).

En la ERC, el desequilibrio progresivo de los principales elementos reguladores del metabolismo óseo y mineral mencionados con anterioridad (calcio, fósforo, PTH, vitamina D, FGF23 y Klotho) acabará dando lugar a la CKD-MBD. Esto incluye alteraciones óseas de bajo o alto remodelado, que se traducen en fragilidad y fracturas, y alteraciones vasculares, en especial calcificación vascular, que ocasionará rigidez en los vasos, facilitando la aparición de insuficiencia cardíaca (12).

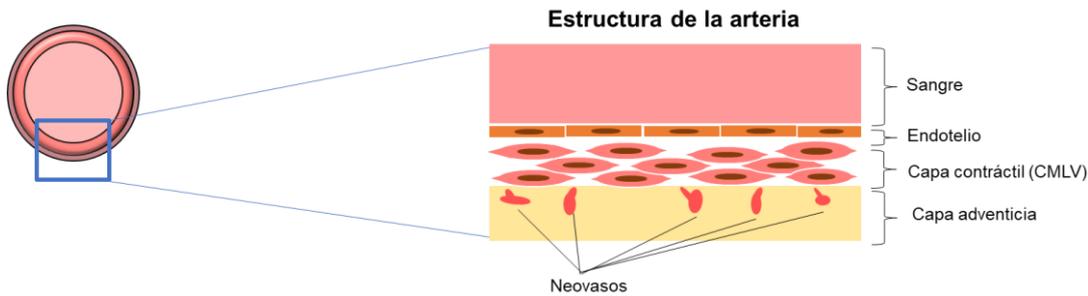
## **Calcificación vascular**

La enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad temprana en la ERC (133) siendo el infarto de miocardio (20) y la enfermedad cerebrovascular (134, 135) muy frecuentes en estos pacientes. De hecho, se considera que un filtrado glomerular por debajo de 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> implica una probabilidad de mortalidad de un 57% mayor que el de la población general (136).

Causada por el desequilibrio del metabolismo óseo y mineral, la calcificación vascular es un daño vascular grave que se asocia a la CKD-MBD (89, 137). Actualmente el diagnóstico de la CKD-MBD incluye el estudio y detección de la calcificación vascular, aunque no existe demasiado margen de actuación para evitar la progresión de la misma una vez establecida. En los pacientes con CKD-MBD se intenta evitar la aparición de calcificación vascular mediante hábitos saludables, como dieta equilibrada, ejercicio y evitando el tabaquismo (138, 139).

## **Tipos y estructura de las arterias**

Las arterias están compuestas de tres capas o tunicas. La capa adventicia es la más externa y está formada principalmente por fibras de colágeno, que mantienen la integridad del vaso y la resistencia a la presión mecánica. Esta capa presenta además vasos y nervios que nutren y controlan la pared arterial. Situaciones patológicas promueven la formación de nuevos vasos en la capa adventicia, denominados neovasos (140), que serán comentados con posterioridad (**Figura 4**). La túnica media está situada entre la adventicia y el endotelio y se compone de fibras de músculo liso que regulan la vasodilatación y vasoconstricción. Está rodeada de fibras elásticas, que componen la membrana elástica externa. En tercer lugar y ya en contacto con la sangre, se encuentra la túnica íntima, compuesta de una única capa de células endoteliales. Por debajo se encuentra la lámina basal, rodeada a su vez de la membrana elástica interna (141) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Estructura de la pared arterial mediante una imagen esquemática. En la capa adventicia se representan los neovasos. CMLV, células de músculo liso vascular.

Según el tipo de arteria, el grosor de estas capas varía:

- Arterias elásticas o de gran calibre. Presentan una túnica media gruesa, con más fibras elásticas que musculares, mientras que la adventicia queda reducida a una fina capa. Un ejemplo es la aorta y las arterias carotídeas (142).
- Arterias musculares o de medio calibre. Presentan una alta proporción de fibras musculares para regular el diámetro del vaso. La arteria braquial y la femoral se encuentran dentro de este grupo (142).
- Arterias de pequeño calibre. Su túnica media se compone únicamente de músculo. Estas arterias regulan el flujo sanguíneo a nivel local. Un ejemplo son las arterias digitales (142).

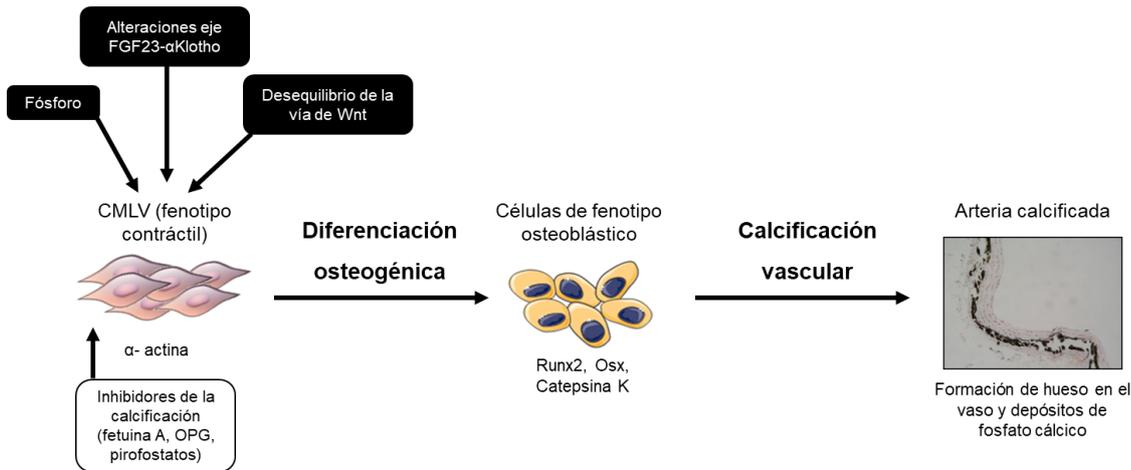
### La calcificación vascular como proceso activo y complejo

La calcificación vascular se produce en las válvulas cardíacas y en las arterias, concretamente en la túnica íntima y en la media. La calcificación de la túnica íntima está asociada a la inflamación arterial crónica, la hipertensión, la diabetes y la hipercolesterolemia, dando lugar a aterosclerosis. Su aparición y prevalencia se asocia a factores genéticos y hábitos de vida poco saludables (85). La calcificación de la túnica media está frecuentemente asociada con la CKD-MBD, como consecuencia del desequilibrio del metabolismo óseo y mineral y la inflamación crónica. Además, existen otros factores que aumentan el riesgo de desarrollar

calcificación vascular, como la edad, la diabetes, las dislipidemias o el tiempo en diálisis (12).

Durante mucho tiempo se consideró la calcificación vascular como un proceso pasivo, en el que el calcio y el fósforo precipitan y se depositan en los vasos. Actualmente se sabe que, además de la precipitación del fosfato de calcio, ocurren procesos muy complejos y regulados a nivel molecular, en los que participan múltiples factores y que implican una pérdida del fenotipo contráctil de las células de músculo liso vascular (CMLV), las cuales van adquiriendo características de células óseas, denominándose células de fenotipo osteoblástico. Esta transformación celular previa a la calcificación vascular se denomina diferenciación osteogénica (90, 143-145) (**Figura 5**). La calcificación vascular ocurre cuando aumentan los promotores de la calcificación y/o disminuyen los inhibidores. Además, las CMLV liberan vesículas calcificantes, extendiendo la calcificación a las células adyacentes (146). Es importante tener en cuenta que la calcificación vascular está estrechamente relacionada con las alteraciones óseas de la CKD-MBD, por lo que la mayoría de los factores que desequilibran el metabolismo óseo también influirán en el desarrollo de calcificación vascular (147). La liberación de calcio y fósforo del hueso y el consecuente aumento de sus niveles séricos promoverá el depósito de estos minerales en la pared de los vasos (89-91, 147).

El fósforo es uno de los principales factores que promueven la calcificación vascular. Cuando sus niveles séricos están elevados, el fósforo es detectado por los transportadores Pit de las CMLV. Esto desencadena una serie de vías de señalización que confluyen en la inducción de la expresión de genes característicos de las células óseas (Runx2, osterix, catepsina K) y a la inhibición de genes característicos del fenotipo contráctil de las CMLV ( $\alpha$ -actina), iniciando los cambios fenotípicos de la diferenciación osteogénica (148-150) (**Figura 5**).



**Figura 5:** Esquema representativo del proceso de calcificación vascular. Cuando los niveles de los promotores o inhibidores de la calcificación vascular se ven alterados, se produce la diferenciación osteogénica: las CMLV comienzan a perder la expresión de genes característicos del fenotipo contráctil y expresan genes característicos de las células osteoblásticas. Cuando el proceso se extiende a las células adyacentes y se forman depósitos de fosfato cálcico en la pared arterial, se habla de calcificación vascular. OPG, osteoprotegerina; Osx, osterix.

El eje FGF23-Klotho también está implicado en los mecanismos que provocan calcificación vascular. En ratones nulos para FGF23 o Klotho se observó un envejecimiento acelerado que implicaba una pérdida de hueso asociada a calcificación vascular (65-68).

La vía de Wnt, que participa en la formación de hueso, está cobrando importancia en la investigación de la génesis de calcificación vascular, ya que su activación y el desequilibrio de sus inhibidores en el curso de la CKD-MBD también podrían afectar a la formación de hueso en el interior del vaso (151, 152). Un modelo murino de ERC y mutante nulo para Sost, uno de los más conocidos inhibidores de la vía de Wnt, mostró que los ratones mutantes nulos desarrollaban más calcificación vascular que los ratones salvajes (153). Aunque en algunos estudios se ha observado una asociación entre la ERC y niveles séricos elevados de Sost, el papel de este inhibidor de Wnt sobre la calcificación vascular aún se desconoce (154).

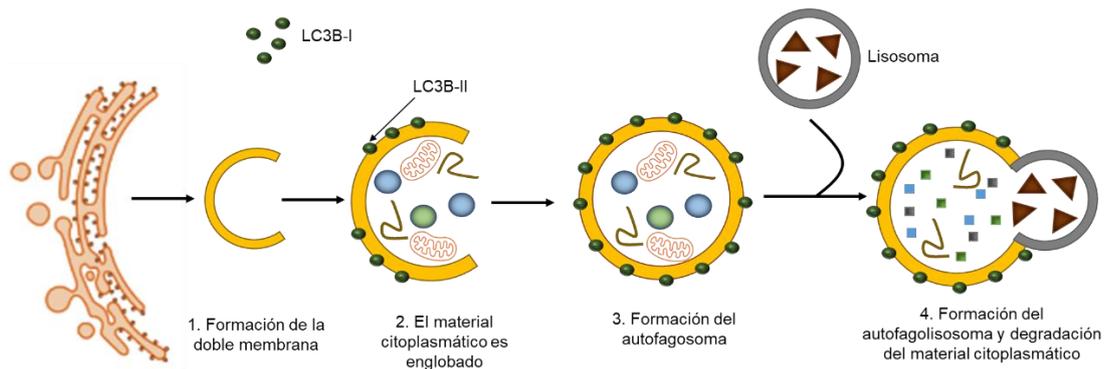
Entre los numerosos inhibidores de la calcificación vascular destacan los pirofosfatos, los cuales inhiben la formación de cristales de hidroxiapatita en las CMLV (144, 145); la fetuina A, una proteína inhibidora de la osteogénesis (155, 156); la

osteoprotegerina (OPG), una proteína que se une a RANKL, impidiendo su unión a RANK en los osteoclastos (90) y el receptor 4 acoplado a proteína G con repeticiones ricas en leucina (LGR4, del inglés leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4), otro receptor de RANK descubierto recientemente (85).

### **Autofagia y calcificación vascular**

La autofagia es un proceso fisiológico que implica la degradación y reciclaje de desechos celulares y material dañado, como proteínas mal plegadas, para renovar y mantener la homeostasis celular (157, 158). La autofagia comienza con la formación de una doble membrana procedente del retículo endoplasmático. Esta membrana engloba el material celular que va a ser degradado, dando lugar al autofagosoma, que a continuación se fusiona con el lisosoma, generando lo que se conoce como autofagolisosoma, en cuyo interior las enzimas hidrolíticas degradarán el material celular u orgánulo englobado (**Figura 6**). Es un proceso altamente regulado, en el que participan muchas proteínas. Entre ellas destaca la isoforma B de la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (MAP1LC3B, en inglés microtubule-associated protein 1 light chain 3B, denominada normalmente LC3B) implicada en la formación del autofagosoma: las moléculas de LC3B-I se unen a la doble membrana en formación, dando lugar a complejos de LC3B-II (158) (**Figura 6**). La proteína LC3B-II es una de las principales moléculas analizadas para evaluar la autofagia a nivel experimental (159).

Aunque la autofagia es un proceso fisiológico, su desequilibrio se relaciona con el envejecimiento (160) y con distintos tipos de patologías, como cáncer (161, 162), enfermedades neurodegenerativas (163), infecciones (164) o enfermedades cardiovasculares (165). Varios estudios han propuesto la autofagia como un posible mecanismo protector frente a la calcificación vascular (166-168), si bien estas acciones deben ser confirmadas.



**Figura 6:** Esquema representativo del proceso de autofagia. Inicialmente se genera una doble membrana a partir del retículo endoplasmático rugoso, que, con la participación de las proteínas LC3B-II, se pliega y engloba material citoplasmático, dando lugar al autofagosoma. El autofagosoma se fusiona con el lisosoma, de manera que el material englobado se degrada en el interior del autofagolisosoma.

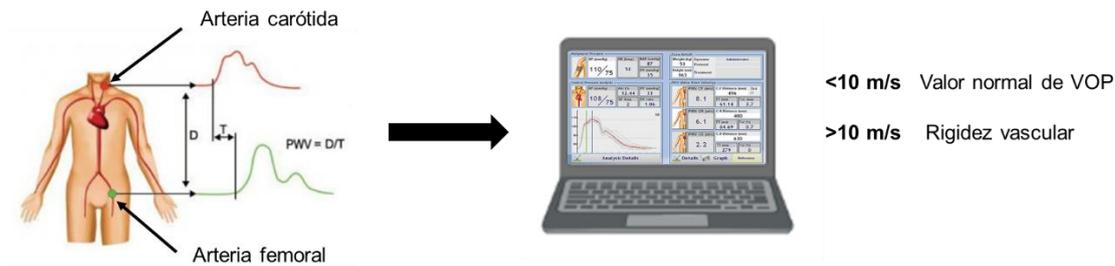
### Técnicas para el diagnóstico y estudio del daño vascular

La calcificación vascular es uno de los principales daños vasculares de la CKD-MBD y produce rigidez en la pared de los vasos, lo que se denomina arteriosclerosis. En la ERC la calcificación vascular se asienta fundamentalmente en la capa media de las arterias, pero también puede localizarse en la íntima como consecuencia de la calcificación de las placas ateromatosas (aterosclerosis). Tanto la arteriosclerosis como la aterosclerosis, pero especialmente la primera, ocasionan un mayor esfuerzo cardíaco para mantener una adecuada irrigación tisular (169). La presencia e impacto de la calcificación vascular se pueden evaluar mediante distintas técnicas:

- **Placas de ateroma carotídeas.** Se detectan mediante ecografía. Consisten en el engrosamiento de la capa íntima-media de la arteria carótida debido a depósitos de lípidos y células inflamatorias (170). Cuando el grosor íntima-media carotídeo supera los 1,5 mm y protruye hacia la luz del vaso se considera placa de ateroma (171).
- **Calcificación de la aorta lumbar.** Se detecta mediante una radiografía lateral simple de abdomen para establecer un valor según el índice de Kauppila (53). Un índice de Kauppila mayor de 5 indica presencia de calcificación vascular en la aorta (172). No permite distinguir si la calcificación vascular está localizada en la media o en la íntima de las arterias (173).

- **Calcio coronario.** Se detecta mediante tomografía axial computarizada (TAC) y permite cuantificar el contenido de calcio coronario, habitualmente secundario a la calcificación de placas en la íntima. Es útil para predecir el riesgo de eventos cardiovasculares (174, 175).
- **Índice tobillo-brazo.** Es el cociente de las presiones sistólicas del tobillo y la arteria braquial para las dos extremidades (176). Ha mostrado ser un indicador de arteriosclerosis y aterosclerosis y un factor pronóstico de otros eventos cardiovasculares (177, 178).
- **Cuantificación de la rigidez arterial mediante la medición de la velocidad de la onda de pulso (VOP) entre carótida y femoral.** Es la técnica de referencia para determinar el grado de rigidez arterial (52, 179). La VOP se calcula como la distancia recorrida por la sangre dividida entre el tiempo de tránsito ( $VOP = \text{distancia} / \text{tiempo} = \text{m/s}$ ). De esta manera, el aparato detecta el tiempo que tarda la onda de pulso en llegar desde la arteria carótida común hasta la arteria femoral común y esta medida se divide por la distancia que hay entre ambos puntos (52, 180) (**Figura 7**).

Un valor elevado de VOP indica que la sangre viaja más rápido entre el punto de referencia de la arteria carótida hasta la femoral, aportando información indirecta sobre la rigidez arterial. A mayor VOP, mayor rigidez arterial, fundamentalmente de la aorta. Se considera que una VOP mayor de 10 m/s indica rigidez arterial y se asocia con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (180).



**Figura 7:** Esquema representativo del estudio de la velocidad de onda de pulso (VOP) entre la arteria carótida y femoral. Los sensores colocados sobre un punto de cada arteria detectan el tiempo que tarda en llegar el pulso desde la carótida a la femoral. Conociendo la distancia entre ambos puntos, se calculan las medidas de la VOP, dividiendo la distancia entre el tiempo. Unos valores de VOP por encima de 10 m/s se consideran patológicos. (Adaptado de Complior Analyze, ALAM Medical).

### Estudio de la neovascularización de la capa adventicia

La capa adventicia de las arterias presenta una red de *vasa vasorum*, encargados de llevar nutrientes y oxígeno a las células de la pared arterial. Bajo condiciones de estrés, como en casos de isquemia o inflamación, la red de *vasa vasorum* se incrementa para hacer frente a esta situación sin que suponga la muerte de las células. Estos neovasos (**Figura 4**) presentan características de vaso inmaduro, con una pared fina y sin pericitos, lo cual contribuye a la infiltración leucocitaria, favoreciendo la progresión de la lesión (140).

El aumento de neovasos se ha relacionado con disfunción endotelial y aterosclerosis. De hecho, los neovasos son muy frecuentes en las placas de ateroma (181, 182). Un estudio reciente sugiere que la formación de neovasos podría ser un proceso previo a estos daños e independiente de la aterosclerosis (183, 184).

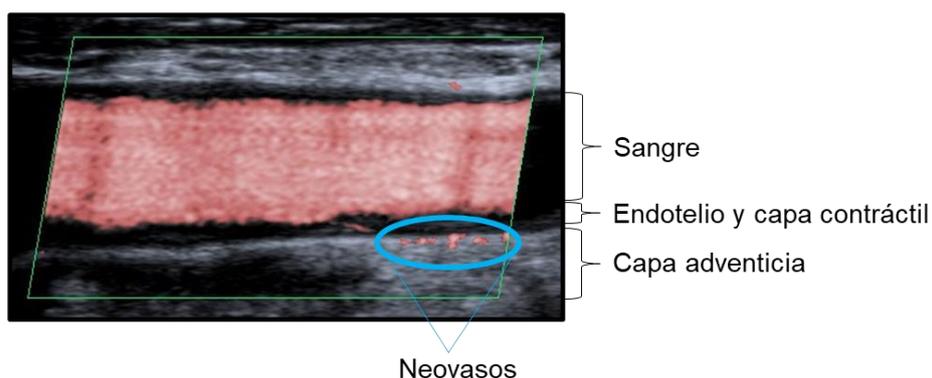
La ecografía con contraste intravenoso CEUS (del inglés contrast enhanced ultrasound) y de manera experimental, la ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI, del inglés superb microvascular imaging), permiten la detección de neovasos en la capa adventicia de las arterias carótida y femoral.

- **CEUS.** Inicialmente se desarrolló para tomar imágenes de la vasculatura. Estudios recientes han utilizado esta técnica para detectar el grado de neovascularización en la capa adventicia de la carótida como marcador de

daño vascular, sugiriendo que estos cambios preceden al desarrollo de aterosclerosis (183, 184).

- **Ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI).** Se trata de una técnica reciente que utiliza ultrasonidos para captar la imagen del flujo sanguíneo con una gran sensibilidad, resolución y bajo nivel de artefactos. Esta herramienta es capaz de separar las señales del flujo sanguíneo y los artefactos producidos por el movimiento del tejido, de manera que detecta de forma muy precisa las señales del flujo sanguíneo de baja velocidad (185). Esta tecnología ha permitido la reciente detección de los neovasos presentes en la capa adventicia de las arterias carótida y femoral (185, 186) (**Figura 8**). La gran ventaja de esta técnica es que no necesita contraste, con el que siempre existe el riesgo de reacciones de hipersensibilidad o anafilaxis (187).

#### Ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI)



**Figura 8:** Imagen de la arteria carótida obtenida mediante ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI). Se indican las distintas capas de la arteria, así como la neovascularización de la capa adventicia.

#### Alteraciones óseas

Las alteraciones óseas son una de las principales consecuencias de la CKD-MBD y frecuentemente derivan en fragilidad ósea y fracturas, disminuyendo de manera importante la calidad de vida de estos pacientes (179, 188) e influyendo en la elevada mortalidad respecto a la población general (14, 91, 142). Todo ello supone un gran

coste económico por las altas tasas de hospitalización (189, 190). En pacientes con una TFG estimada (TFGe) menor de 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, el riesgo de fractura es varias veces superior (de 3 a 6 veces) que el observado en individuos con una TFGe por encima de 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (191).

### **Biología del hueso**

El hueso es un tejido que da soporte al organismo y protege múltiples órganos, pero no presenta únicamente funciones estructurales. Es el principal reservorio de calcio y fósforo y es un tejido dinámico en constante remodelado, con un importante papel secretor de factores reguladores del metabolismo óseo y de otros sistemas (192, 193).

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar el colágeno de la matriz ósea. Liberan RANKL, OPG y distintos ligandos de la vía de Wnt, involucrada en la formación de hueso, regulando así la osteoclastogénesis (194). Estas células también sintetizan el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA, del inglés vascular endothelial growth factor A), que participa en la osteoblastogénesis y angiogénesis (195), y la osteocalcina, implicada en la regulación del metabolismo energético y de la glucosa (196, 197). Cuando se ha completado la síntesis de la matriz ósea, la mayoría de los osteoblastos quedan atrapados en la matriz mineralizada, convirtiéndose en osteocitos, que son células de aspecto estrellado, conectadas a los osteoblastos (194) y que sintetizan FGF23 (198) y distintos inhibidores de la vía de Wnt, como Sost (199) o Dkk1 (200).

Los osteoclastos son células grandes y multinucleadas que se encargan de degradar la matriz ósea, siendo los responsables de la resorción ósea (194). Los osteoclastos sintetizan distintas moléculas, como la catepsina K, que degrada las fibras de colágeno (201); la proteína morfogenética ósea 6 (BMP6, del inglés bone morphogenetic protein 6), que promueve el reclutamiento y proliferación de los osteoblastos (202); la esfingosina 1 fosfato (SP1, del inglés sphingosine 1-phosphate), una quinasa que regula la osteoclastogénesis (203); Wnt10b, un ligando de la vía de Wnt (204), o la cardiotrofina 1 (CT-1, del inglés cardiotrophin-1), una interleuquina esencial en el proceso de resorción (205).

A nivel macroscópico, el hueso está organizado en corteza y trabéculas (206). La región cortical se compone de un sistema de osteonas, en el que se van depositando láminas concéntricas de colágeno alrededor de un canal central, donde se localizan los vasos sanguíneos y nervios. Constituye la parte externa del hueso y tiene un importante papel de soporte mecánico (206). La región trabecular constituye la parte interna, compuesta de una red de trabéculas en la que se embebe la médula ósea. Aunque las trabéculas son importantes para el soporte, destacan sobre todo por su actividad metabólica (12, 206).

### **Principales alteraciones óseas en la CKD-MBD**

Los niveles alterados de los principales reguladores del metabolismo óseo y mineral (calcio, fósforo, PTH, vitamina D, FGF23) dan lugar al desequilibrio en los procesos de formación y resorción ósea. Esto ocasiona pérdida de hueso y una formación inadecuada del mismo, que resulta en un hueso con características mecánicas alteradas, dando lugar a fragilidad ósea y fracturas (14). Es importante destacar que, muchas veces, las alteraciones óseas en la CKD-MBD también se ven influidas por el envejecimiento (207), otras enfermedades, como la diabetes (208), o por fármacos (209), lo cual hace aún más complejo su tratamiento y prevención. Es necesario resaltar de nuevo la estrecha relación que tienen las alteraciones óseas y vasculares en la CKD-MBD, ya que la génesis y progresión de calcificación vascular se asocia frecuentemente con una mayor pérdida de hueso (91, 142, 210, 211).

Si bien los pacientes con ERC van a tener, al igual que la población general, una pérdida de hueso secundaria a los cambios hormonales y al envejecimiento, la característica fundamental de las alteraciones óseas de la CKD-MBD son las alteraciones del recambio óseo, que se definen como: a) Incremento del remodelado óseo (high bone turnover) y b) Reducción del remodelado óseo (low bone turnover) (212, 213). Aunque las causas de los dos tipos de alteraciones son distintas, las consecuencias son las mismas: un hueso de mala calidad, frágil y con gran riesgo de fractura (213).

## Evaluación del riesgo de fractura

- **Marcadores bioquímicos de remodelado óseo.**

La PTH sérica es el marcador bioquímico por excelencia para evaluar indirectamente el remodelado óseo en la ERC. Tanto los valores elevados como reducidos de PTH se asocian con mayor riesgo de fractura y mortalidad (214-216). Existen otros marcadores circulantes que aportan información adicional acerca de la tasa de recambio y microarquitectura óseos (217), como el propéptido amino-terminal del procolágeno tipo 1 (P1NP, del inglés procollagen type I N-terminal pro-peptide), un residuo de colágeno liberado durante la formación de la matriz ósea que indica formación de hueso (218) y el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX-I, del inglés cross-linked collagen type I peptide), un residuo de colágeno liberado durante la degradación de la matriz ósea que indica resorción (218).

- **Técnicas de imagen.**

La densidad mineral ósea se puede estudiar mediante la absorciometría de rayos X dual (DEXA) (218) y por tomografía computarizada cuantitativa (206).

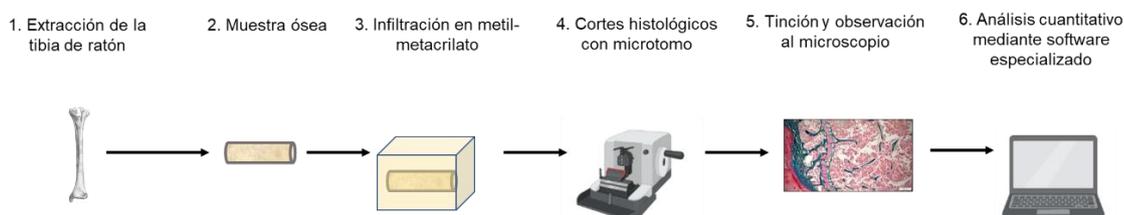
- **Histología e histomorfometría ósea.**

El estudio de la histología ósea a partir de una biopsia de la cresta ilíaca permite analizar de manera directa y precisa los procesos patológicos que pueden tener lugar en el hueso. Actualmente, la biopsia ósea es la técnica de referencia para evaluar las alteraciones óseas en la CKD-MBD. Además, es la única herramienta que posibilita el estudio simultáneo de la región cortical y trabecular, permitiendo también la identificación y cuantificación de las células óseas e informando acerca del proceso de mineralización (219). A pesar de ello, la biopsia ósea no es un procedimiento que se realice de forma rutinaria, debido a que se trata de una técnica invasiva cuya interpretación y cuantificación requiere de personal altamente especializado (14, 219).

Una vez extraída la biopsia, ésta es procesada, cortada y teñida con tinciones específicas para la identificación cualitativa de los distintos elementos de la histología

ósea. Es importante observar el número de trabéculas, su grosor, determinar si forman una red o están dispuestas de manera aislada, la cantidad y distribución de osteoide, así como la abundancia de osteoblastos y osteoclastos. Respecto a la región cortical, los elementos más relevantes para la interpretación de su histología son el grosor y la porosidad (206, 219, 220).

En la práctica clínica habitual es posible interpretar la histología y diagnosticar la alteración ósea mediante la observación del corte histológico y la aplicación de tinciones específicas. Sin embargo, cuando existen dudas o bien se necesita un dato numérico, es preciso un análisis cuantitativo de la misma, que es llevado a cabo con ayuda de *softwares* especializados (220, 221). Este estudio cuantitativo se denomina histomorfometría ósea (219) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Esquema representativo del procesamiento de una tibia de ratón. Tras la obtención de la muestra, el hueso es procesado y embebido en metil-metacrilato. A continuación, el bloque de metil-metacrilato es pulido y cortado mediante un microtomo. Los cortes histológicos son teñidos para su posterior observación e interpretación al microscopio. Finalmente, se puede llevar a cabo un análisis cuantitativo de la histología ósea (histomorfometría ósea) con ayuda de *softwares* especializados.

Existen dos tipos de parámetros que pueden ser estudiados con la histomorfometría ósea. Los parámetros estáticos están relacionados con la estructura, y se refieren a los volúmenes, superficies y grosor de las trabéculas, corteza y osteoide, además de la cuantificación de osteoblastos y osteoclastos (206). Por otro lado, se encuentran los parámetros dinámicos, que miden los cambios ocurridos en el hueso a lo largo del tiempo. Para ello, se administra a los pacientes dos dosis de tetraciclinas a distintos tiempos. Las tetraciclinas se depositan en el frente de mineralización y emiten fluorescencia, de manera que la distancia entre las bandas puede ser analizada al microscopio para el posterior cálculo de los parámetros dinámicos (206).



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **Hipótesis**

Aunque en la ERC se afirma que los niveles de sKlotho se ven reducidos en estadios iniciales, la utilidad de sKlotho como biomarcador de las alteraciones asociadas a la CKD-MBD es un tema controvertido. No está definitivamente establecido cómo cambian los niveles de sKlotho durante la progresión de la enfermedad, ni su relación con los marcadores clásicos de CKD-MBD, como PTH o FGF23. Además, el papel de sKlotho como biomarcador de las alteraciones vasculares y óseas de la ERC presenta todavía muchas incógnitas. Si bien algunos autores consideran que sKlotho urinario podría ser un biomarcador más temprano que sKlotho sérico, este concepto no está totalmente validado. Además, hay pocos trabajos centrados en el análisis conjunto de sKlotho en suero y orina en la ERC.

Las alteraciones vasculares de la ERC se detectan cuando el daño ya está establecido y habitualmente avanzado: la incorporación de nuevos marcadores o técnicas no invasivas de detección temprana del daño vascular presenta gran interés.

## Objetivos

- **Estudiar los niveles séricos y urinarios de sKlotho en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 y en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica (IRC) en ratón:**
  - Investigar el potencial de sKlotho como biomarcador temprano de CKD-MBD respecto a otros biomarcadores, como PTH y FGF23.
  - Investigar si sKlotho podría ser de utilidad en el estudio de la progresión de CKD-MBD.
- **Estudiar el daño vascular asociado a CKD-MBD y su posible correlación con los niveles de sKlotho:**
  - Evaluar en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5: a) la rigidez aórtica mediante VOP y b) la neovascularización de la capa adventicia de las arterias carótida y femoral mediante ecografía SMI.
  - Evaluar en un modelo experimental de IRC en ratón la calcificación vascular y expresión génica de marcadores de diferenciación osteogénica en aorta.
- **Estudiar en un modelo de IRC en ratón las alteraciones de la microarquitectura ósea y su posible correlación con sKlotho.**
- **Estudiar el potencial efecto de sKlotho sobre la calcificación vascular en un modelo *in vitro* de CMLV y la posible implicación de la autofagia en el daño vascular.**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



La presente tesis doctoral se compone de tres fases independientes pero complementarias. Cada una tiene su metodología específica, pero los tres bloques comparten aspectos metodológicos, que se explican en último lugar.

1. En primer lugar, se detallará el diseño experimental del estudio en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5, junto con los marcadores bioquímicos y técnicas de detección de daño vascular.
2. En segundo lugar, se detallará el diseño experimental y técnicas quirúrgicas utilizadas para el modelo de insuficiencia renal crónica (IRC) en ratón, para después especificar los marcadores bioquímicos utilizados y las técnicas de procesamiento y análisis de los tejidos.
3. En tercer lugar se detallará la metodología utilizada en los experimentos *in vitro*, centrándose en el diseño experimental, el efecto de sKlotho sobre la calcificación vascular y la evaluación de la autofagia.
4. Finalmente, se describirá la metodología común utilizada en las tres fases detalladas anteriormente (extracción de ARN, qPCR y western blot), así como los análisis estadísticos utilizados.

## **1. Estudio en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5**

Con el objetivo de estudiar el posible papel de sKlotho en la CKD-MBD, y en especial determinar si es un biomarcador temprano de CKD-MBD y si se correlaciona con el daño vascular en la ERC, se diseñó un estudio con pacientes en distintos estadios de ERC. En estos pacientes se evaluaron: A) Los marcadores bioquímicos generales, del metabolismo mineral y sKlotho y B) El daño vascular mediante las técnicas de velocidad de onda de pulso (VOP) y la ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI) en las arterias carótida y femoral.

## Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo en 43 pacientes con ERC (25 hombres y 18 mujeres) de la consulta del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y sus correspondientes 38 controles pareados por edad y sexo (18 hombres y 20 mujeres). La media de edad fue de  $66,6 \pm 8,6$  años en los pacientes y de  $66,5 \pm 4,6$  en los controles. Los pacientes con ERC se clasificaron según su TFGe, siguiendo la guía de práctica clínica KDIGO del 2017 (222), en cuatro grupos: ERC-2/3a (TFGe entre 45 y 89 mL/min/1,73m<sup>2</sup>), ERC-3b (TFGe entre 30 y 44 mL/min/1,73m<sup>2</sup>), ERC-4 (TFGe entre 15 y 29 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) y ERC-5 (TFGe < 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup>).

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: a) tratamiento inmunosupresor; b) enfermedad inmunológica o diagnóstico de cáncer; c) infección reciente; d) aneurisma abdominal o claudicación intermitente; e) cirugía carotídea previa; f) embarazo o g) Diabetes Mellitus. El protocolo del estudio se diseñó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y todos los participantes firmaron el documento de consentimiento informado. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (CEImPA 140/19).

## Parámetros clínicos y marcadores bioquímicos

Se registró la edad, sexo e índice de masa corporal (IMC) de cada participante. También se registraron los siguientes parámetros bioquímicos séricos: creatinina, proteínas totales, calcio, fósforo, PTH, calcitriol, FGF23 y sKlotho, además de proteinuria, creatinina y sKlotho urinarios.

La creatinina se determinó mediante el equipo IDMS-cobas 702 y las proteínas totales mediante NIST SRM 927-cobas 702 (ambos de Roche Diagnostics, Viena, Austria). El calcio y el fósforo fueron determinados mediante el equipo NIST SRM 956c-cobas 702 y NERL-cobas 702, respectivamente (ambos de Roche Diagnostics), la PTH mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el analizador cobas e801 (Roche Diagnostics) y el FGF23 y calcitriol se analizaron con un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) en analizador Liaison XL (DiaSorin, Saluggia, Italia). Finalmente, la concentración de sKlotho, tanto en suero como en

orina, se evaluó mediante un ensayo de ELISA específico (Immuno-Biological Laboratories, IBL, Minneapolis, MN, EE.UU).

### **Daño vascular: velocidad de onda de pulso (VOP) y ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI)**

Con el fin de determinar el daño vascular en la progresión de la ERC se llevaron a cabo dos técnicas no invasivas, VOP y SMI.

#### **Velocidad de onda de pulso (VOP)**

Para evaluar la VOP se utilizó el instrumento Complior Analyze (ALAM Medical, Saint-Quentin-Fallavier, Francia) y determinar de esta manera la rigidez aórtica. La prueba se realizó con el sujeto en posición supina, para a continuación medir la distancia entre los puntos de medida de pulso de la carótida (detección del pulso bajo la mandíbula) y la femoral (detección del pulso en la ingle). Después se colocaron los electrodos de detección del pulso en los puntos anteriormente mencionados para tomar las medidas de VOP (**Figura 7**). Se realizaron tres medidas de una calidad de onda superior al 90% en cada sujeto, de las que se calculó la media.

#### **Ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo (SMI)**

Se utilizó esta técnica como una estrategia innovadora para detectar el daño vascular mediante la medida de la neovascularización de la capa adventicia de las arterias carótida y femoral, sin necesidad de usar contraste, como es el caso de la técnica de ultrasonidos clásica CEUS (183, 184).

Los sujetos se dispusieron en posición supina y se realizó la ecografía en la arteria carótida y femoral izquierdas mediante el ecógrafo Toshiba-Aplio 500 (Toshiba American Medical Systems, Tustin, CA, EE.UU). El estudio se realizó en las arterias carótida y femoral izquierdas debido a que trabajos previos encontraron mayor daño en la arteria carótida izquierda (183, 223). Esta diferencia estaría causada probablemente por las distintas condiciones hemodinámicas de las carótidas izquierda y derecha, ya que la carótida izquierda se origina directamente desde el arco aórtico y está sometida a mayor estrés mecánico (224).

Para detectar la neovascularización de la capa adventicia se utilizó el modo Doppler Superb Microvascular Imaging (SMI). Se obtuvieron varias imágenes de cada una de las arterias, en las que se valoró la neovascularización de la capa adventicia, el grosor íntima-media carotídeo y presencia de placas de ateroma.

Se analizó una imagen de cada arteria por cada participante del estudio. El primer paso fue identificar las tres capas de la arteria: la capa íntima se encuentra en contacto con la sangre; a continuación se encuentra la capa muscular, de color oscuro en la imagen de la ecografía y debajo se localiza la capa adventicia, de color grisáceo en la imagen. Esta última es la capa donde se localiza la neovascularización. Se consideraron neovasos los puntos agrupados de color rojo (indican flujo sanguíneo), los cuales se infiltran hacia la capa muscular (**Figura 8**). Los neovasos situados dentro de las placas de ateroma no fueron cuantificados, dado que la neovascularización es una característica habitual de las placas.

Se cuantificó el número y área de los neovasos mediante el *software* de análisis de imagen ImageJ. El análisis fue realizado por dos personas de manera independiente. Para la cuantificación final de los neovasos se llegó a un consenso de los dos lectores junto con el investigador principal del proyecto. Para el análisis final de imagen se realizó la media de las medidas realizadas de forma independiente por los dos lectores.

### **Confidencialidad y sistema de tratamiento de los datos**

En este estudio no se han recogido datos de carácter personal ni aquellos que permiten la identificación de los pacientes incluidos. Tal y como se establece en el Reglamento (UE) 2016/679, del Parlamento Europeo y del Consejo, del 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos (Reglamento General de Protección de Datos RGPD) y según la Ley Orgánica 3/2018, del 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, se informó al paciente que los datos que éste facilita han sido sometidos a un

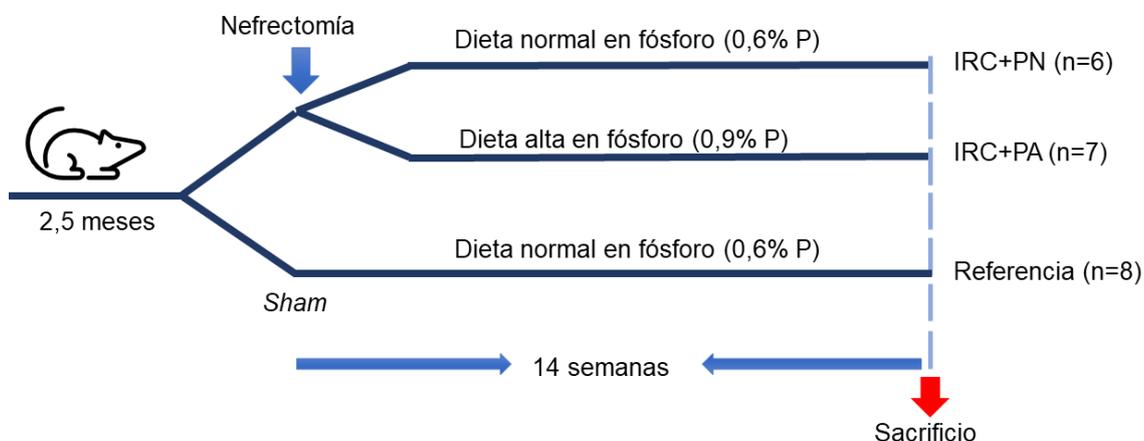
procedimiento de disociación, de tal forma que es imposible su identificación por otra persona a excepción de su médico.

El estudio se realizó según la práctica clínica del médico participante sin interferir con los hábitos de prescripción. La decisión de prescribir o cambiar cualquier medicación fue previa e independiente de la posible participación del paciente en el estudio, y vino únicamente determinada por el juicio clínico y la práctica habitual del médico.

Los datos registrados en el cuaderno de recogida del estudio fueron almacenados en una base de datos. Esta base de datos incluyó rangos y reglas de coherencia interna, para controlar la correcta cumplimentación de los datos y su calidad. Posteriormente, se procedió al cierre de la base de datos para iniciar el análisis estadístico.

## 2. Modelo de IRC moderada en ratón

Con el objetivo de estudiar el papel de sKlotho como biomarcador en el contexto de la CKD-MBD, así como validar y completar los resultados obtenidos en el estudio en pacientes ERC-2/3a a ERC-5, se diseñó un modelo experimental de IRC en ratón (**Figura 10**).



**Figura 10:** Esquema del diseño experimental del estudio in vivo. IRC, insuficiencia renal crónica; PN, dieta normal en fósforo; PA, dieta con alto contenido en fósforo.

## Diseño experimental

Para inducir la IRC, se sometió a ratones FBV/N macho de dos meses y medio de edad (n=13) a una reducción del 75% de la masa renal, mediante una nefrectomía en dos pasos. La primera intervención consistió en la decapsulación del riñón izquierdo y en la posterior cauterización de los dos polos renales. Una semana después se les realizó la segunda intervención para conseguir la reducción de la masa renal del 75%, que consistió en la extirpación del riñón sano (el derecho). El anestésico utilizado fue el isoflurano por inhalación. Cuatro horas antes de cada intervención quirúrgica y en las 48 horas posteriores a la cirugía, se administró cada 8 horas buprenorfina para controlar el dolor.

Desde el inicio del estudio los ratones fueron alimentados con una dieta normal en fósforo (PN, 0,6% fósforo y 0,6% calcio) (Panlab, Barcelona, España). Una semana después de la segunda intervención quirúrgica, los ratones fueron divididos en dos grupos experimentales: un grupo recibió la dieta PN (n=6) y el otro grupo (n=7) fue alimentado con una dieta con alto contenido en fósforo (PA, 0,9% fósforo y 0,6% calcio). El objetivo de la dieta con alto contenido en fósforo fue aumentar el daño renal y vascular: se podría considerar que el grupo de ratones IRC+PN equivaldría aproximadamente a un estadio ERC-3a en humanos, mientras que el grupo IRC+PA se asemejaría a un estadio ERC-3b.

Un tercer grupo de ratones *sham* (sometidos a la cirugía, pero sin sufrir la reducción de la masa renal) alimentados con la dieta PN fueron utilizados como referencia. Todos los ratones recibieron la dieta durante un período de 14 semanas, tras las cuales fueron introducidos en jaulas metabólicas durante 24 horas para recoger la orina antes del sacrificio (**Figura 10**). En el momento del sacrificio se registró el peso final de los ratones y se extrajeron muestras de sangre para su posterior centrifugación y obtención de suero, así como un fragmento de la aorta toraco-abdominal, los riñones (los sanos en el grupo *sham* y el cauterizado en el caso de los grupos IRC) y las dos tibias.

El suero y la orina, así como las muestras de tejido destinadas a la extracción de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras de tejido utilizadas para las tinciones, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia fueron incluidas en parafina para posteriormente cortarlas y teñirlas. La tibia izquierda se analizó por microtomografía computarizada ( $\mu$ CT) y posteriormente se incluyó en metacrilato para realizar el estudio de la histomorfometría ósea.

Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética para animales de laboratorio de la Universidad de Oviedo (PROAE 03/2017).

### **Marcadores bioquímicos**

Las muestras de sangre fueron centrifugadas para obtener suero. En el suero se midieron parámetros bioquímicos generales y del metabolismo mineral. Como estimadores de la función renal se analizaron la creatinina sérica y el nitrógeno ureico sérico (BUN, del inglés blood urea nitrogen), ambos evaluados mediante el ensayo colorimétrico Quanti-Chrom™ Specific Assay Kits (Bioassay Systems, Hayward, CA, EE.UU), al igual que el calcio y el fósforo séricos. Finalmente, se utilizaron ensayos de ELISA específicos para evaluar las concentraciones séricas de PTH (Immutopics Inc., San Clemente, CA, EE.UU), FGF23 (Immutopics; sensibilidad: 6 pg/mL; coeficiente de variación inter-ensayo: 4%), calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Elabscience Biotechnology Inc., Wuhan, China), sKlotho (Cusabio Technology LLC, Houston, TX, EE.UU; sensibilidad: 0,78 pg/mL; coeficiente de variación inter-ensayo <10%), los marcadores de formación y resorción ósea, respectivamente, P1NP y CTX-I (ambos de Immunodiagnostic Systems, West Boldon, Reino Unido) y los niveles séricos de RANKL y OPG (ambos de RyD Systems, Minneapolis, MN, EE.UU).

Para evaluar la creatinina, el fósforo y el calcio en orina se utilizó el ensayo colorimétrico Quanti-Chrom™ Specific Assay Kits (Bioassay Systems). Se utilizaron ensayos específicos de ELISA para cuantificar la albúmina (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, EE.UU) y sKlotho (IBL; sensibilidad: 6,15 pg/mL; coeficiente de variación inter-ensayo: 6,5%).

## **Procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina**

### **Inclusión de tejidos en parafina**

La inclusión en parafina permite conservar los tejidos para posteriormente realizar cortes y llevar a cabo las tinciones específicas, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Una vez extraído el órgano o tejido, el primer paso es la fijación, para que el tejido no se disgregue y mantenga su estructura. Para ello se introdujo el tejido en un tampón de formaldehído al 4% durante 24 horas a temperatura ambiente. Después se lavó con agua del grifo durante una hora, para a continuación pasar a la deshidratación. Este paso consiste en someter el tejido a concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 95%) durante 45 minutos cada uno, para terminar haciendo tres lavados de una hora en etanol al 100%. Posteriormente se realizaron dos lavados con xilol, de una hora cada uno.

La inclusión en parafina se realizó en tres cambios de una hora cada uno. Una vez incluido en el bloque de parafina, el tejido se cortó con el grosor deseado mediante un microtomo. Los cortes se dejaron flotando en un baño en agua destilada a 40°C. Posteriormente se transfirieron las secciones de tejido en parafina a los portaobjetos con ayuda de unas pinzas y se dejaron secar toda la noche, quedando listos para teñir.

### **Desparafinación y rehidratación**

Para poder realizar las tinciones es necesario desparafinar y rehidratar la muestra. Para ello, se dejaron los portaobjetos con el corte en parafina a 37°C durante 24 horas, de manera que el tejido se adhiriese al cristal. Para desparafinar se realizaron dos lavados de cinco minutos en xilol, para a continuación rehidratar con lavados en concentraciones decrecientes de etanol (dos lavados en etanol 100%, etanol 95% y etanol 70% durante cinco minutos) para terminar con un lavado de cinco minutos en agua destilada.

En los casos en que fue necesario se llevó a cabo el desenmascaramiento mediante un tampón citrato comercial (DAKO, Santa Clara, CA, EE.UU) durante 20 minutos a

95°C. Durante el proceso de fijación, los antígenos pueden quedar “escondidos”, por lo que es necesario un proceso de desenmascaramiento para hacerlos más accesibles a los anticuerpos.

En el caso de la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia es necesario bloquear las muestras. Se realizó en seroalbúmina bovina (BSA, del inglés bovine serum albumin) al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

### **Inmunohistoquímica de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina y Klotho en riñón**

La vía de Wnt/ $\beta$ -catenina se evaluó mediante inmunohistoquímica, identificando la  $\beta$ -catenina no fosforilada ( $\beta$ -catenina activa) mediante el *kit* comercial EnVision FLEX Mini Kit (DAKO) y el sistema Dako Autostainer. Se utilizaron secciones de riñón de 2,5  $\mu$ m de grosor, que fueron desparafinadas y rehidratadas según se explicó en el apartado de Material y Métodos “Procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina”. Se llevó a cabo el desenmascaramiento de epítomos mediante inducción por calor a 95°C (HIER, del inglés heat induced epitope retrieval) durante 20 minutos y pH 9 (DAKO) en el módulo de pre-tratamiento PT-LINK (DAKO).

Las secciones de riñón se incubaron con el anticuerpo contra la  $\beta$ -catenina no fosforilada (**Tabla 1**) diluido en el reactivo comercial EnVision™ FLEX (DAKO) durante 60 minutos, después de haber bloqueado la peroxidasa endógena mediante el reactivo comercial EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO). La señal se detectó utilizando como sustrato la diaminobencidina (DAKO) en el tampón comercial EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DAKO) y añadiendo la enzima peroxidasa de Dako EnVision™ FLEX /HRP (DAKO). Junto con las muestras del estudio también se tiñeron los respectivos controles negativos.

Para la detección de Klotho renal mediante inmunohistoquímica se llevó a cabo el mismo protocolo que para la  $\beta$ -catenina no fosforilada, utilizando un anticuerpo específico para Klotho (**Tabla 1**).

La cuantificación de la  $\beta$ -catenina activa y Klotho en riñón por inmunohistoquímica se llevó a cabo con el *software* de análisis de imagen ImageJ.

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas en Western Blot, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Técnica	Dilución	Referencia	Anticuerpo secundario	Dilución
anti-β-Catenina no fosforilada (activa)	IHC	1:100	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU (#8814)	Frente a conejo	1:100
anti-Klotho	IHC, WB	1:200	R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU (#AF1819)	Frente a cabra	1:2500
anti-Sost	WB	1:100	R&D Systems (#AF1589)	Frente a cabra	1:2500
anti-Dkk1	WB	1:500	R&D Systems (#MAB1765)	Frente a rata	1:2500
anti-MAP1LC3B	IF	1:100	MBL Life Sciences, Woburn, MA (#M152-3)	Frente a ratón	1:200
anti-MAP1LC3B	WB	1:1000	Novus Biologicals, Centennial, CO, EE.UU (#NB600-1384)	Frente a conejo	1:10000
anti-GAPDH	WB	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU (#sc-25778)	Frente a conejo	1:5000
anti-β-actina	WB	1:2500	Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU (#A2228)	Frente a ratón	1:3000

IHC, inmunohistoquímica; WB, Western blot; IF, inmunofluorescencia; Sost, esclerostina; Dkk1, Dickkopf 1; MAP1LC3B, en inglés microtubule-associated protein 1 light chain 3B; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.

### **Cuantificación de los depósitos de calcio en tejidos blandos**

Los depósitos de calcio se evaluaron en dos tipos de tejidos blandos, la aorta y el riñón. Para la detección de la calcificación vascular se utilizaron secciones de aorta de 2,5  $\mu\text{m}$  que se desparafinaron y procesaron según lo explicado en el apartado “Procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina”. Estos cortes de aorta se tiñeron con rojo de alizarina, que marca los depósitos de calcio en color rojo (225).

La detección de los depósitos de calcio renal se llevó a cabo en secciones de 2,5  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron desparafinadas e hidratadas según lo explicado en el apartado “Procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina”. Se utilizó la tinción de Von Kossa, que destaca el calcio en color negro (226). La cuantificación de la tinción de Von Kossa se realizó mediante el *software* de análisis de imagen ImageJ. Los resultados se expresaron como el porcentaje de área con depósitos de calcio respecto al área total de tejido.

### **Fibrosis intersticial en riñón**

La fibrosis renal intersticial se determinó en secciones de tejido de 2,5  $\mu\text{m}$  de grosor, mediante la tinción de tricrómico de Masson, la cual tiñe de color azulado las fibras de colágeno (227). Se utilizó un microscopio óptico (modelo DMRXA2, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara digital (modelo Dc-100, Leica Microsystems). La cuantificación se realizó mediante el *software* de análisis de imagen ImageJ. Los resultados se expresaron como el porcentaje de área de color azul respecto al área total del riñón, excluyendo la tinción azul de las áreas periglomerulares y peri-vasculares.

### **Inmunofluorescencia en aorta para el análisis de la autofagia**

Para estudiar los niveles de autofagia en aorta se utilizaron muestras incluidas en parafina, que fueron cortadas en secciones de 2,5  $\mu\text{m}$  de grosor y desparafinadas e hidratadas según lo explicado en el apartado “Procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina”. Las secciones fueron desenmascaradas en un tampón citrato (DAKO) durante 20 minutos a 95°C.

Como marcador de autofagia se utilizó la proteína LC3B-II (228), detectada por inmunofluorescencia mediante la incubación con un anticuerpo específico (**Tabla 1**) a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente frente a ratón durante 60 minutos en cámara húmeda y oscuridad. Finalmente, las muestras fueron montadas en los portaobjetos utilizando un pegamento con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar los núcleos celulares (SlowFade Diamond Antifade, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU). Las imágenes se tomaron en el microscopio Axio Observer Z1 platform con Plan-Apochromat y el objetivo de 40x.

El área de señal de LC3B-II se midió como el porcentaje de células positivas para LC3B-II, mediante el *software* de análisis de imagen ImageJ.

### **Análisis ex vivo de la microarquitectura ósea**

Con el fin de estudiar la microarquitectura del hueso, se llevaron a cabo dos tipos de análisis en la tibia izquierda de cada ratón, el  $\mu$ CT y la histomorfometría ósea.

Los parámetros estáticos y estructurales mostrados en este trabajo se obtuvieron mediante la técnica de  $\mu$ CT tanto para el hueso trabecular como para el hueso cortical. En el caso del hueso trabecular, los parámetros estáticos y estructurales se confirmaron por histomorfometría, utilizando además esta técnica para las medidas referentes al osteoide, número de osteoblastos y osteoclastos y de superficie osteoblástica y osteoclástica. Todas las medidas se mostraron según las recomendaciones de Parfitt *et al* (229).

Con el fin de aprovechar la tibia para realizar ambas técnicas se realizó inicialmente el  $\mu$ CT, que permite realizar la cuantificación sin destruir la muestra, para después llevar a cabo la histomorfometría.

### **Parámetros óseos mediante $\mu$ CT**

Para obtener con esta técnica los valores trabeculares y corticales, se estudió la región de la tibia situada entre la metáfisis proximal y la diáfisis media, que fue escaneada por  $\mu$ CT (Bruker SkyScan 1174, Billerica, MA, EE.UU). Se utilizó un

soporte específico para sujetar la muestra de manera que quedara perpendicular a la base del soporte y de la fuente de rayos X. Las imágenes se obtuvieron mediante un tubo de rayos X de 50 kV de voltaje y una corriente de 800  $\mu$ A.

Todas las muestras se escanearon utilizando un filtro de aluminio a una resolución de 12  $\mu$ m. Para cada tibia se obtuvo una serie de 1300 imágenes con una rotación de 0,3°. El tiempo de escaneado para cada muestra fue de siete horas con una exposición de 9650 ms. La corrección de campo plano (relacionada con el sombreado de la imagen y que puede generar artefactos) se realizó al inicio del análisis de cada muestra.

Las imágenes obtenidas se reconstruyeron mediante el *software* NRecon (Bruker SkyScan) y los artefactos se corrigieron con el mismo coeficiente en todas las imágenes.

Los análisis morfométricos en 2D y 3D se llevaron a cabo utilizando el *software* proporcionado por el fabricante (CTAn, Bruker). La región de interés (ROI, del inglés region of interest) se delimitó manualmente. Para el estudio tanto de la región cortical de la diáfisis como de la región trabecular se escogieron 150 láminas de imagen.

Se analizaron los siguientes parámetros óseos estáticos, que también fueron confirmados por histomorfometría ósea (206, 230, 231):

Densidad mineral ósea, DMO ( $g/cm^3$ ): Es la medida de la cantidad de minerales (principalmente calcio y fósforo) contenidos en un volumen concreto de hueso.

Volumen óseo total, BV/TV (del inglés bone volume/tissue volume) (%): Es la proporción entre el volumen óseo trabecular (BV) y el volumen de tejido total (TV, que incluye la médula ósea).

$BV/TV = \text{Área trabecular} / \text{Área total del tejido} \times 100 (\%)$

Grosor trabecular, Tb.Th. (del inglés trabecular thickness) (mm): Grosor de las trabéculas, calculado a partir del área y perímetro óseos multiplicado por un coeficiente de corrección.

Tb. Th. = Área total trabecular/Perímetro trabecular  $\times$  2000  $\times$   $\pi/4$

Separación trabecular, Tb.Sp. (del inglés trabecular separation) (mm): Distancia media entre trabéculas, calculada a partir del número y grosor trabecular.

Tb.Sp = 1/Número de trabéculas  $\times$  1000 – Tb.Th (mm)

Número de trabéculas, Tb.N. (del inglés trabecular number) (1/mm): Número de trabéculas que una línea atravesaría por cada milímetro de un compartimento trabecular.

Tb.N = (Área total hueso/Área trabecular)/Grosor trabecular (nº/mm)

Ct. BS/BV (del inglés cortical bone surface/bone volume) (1/mm<sup>3</sup>): Porosidad cortical, definida como la relación entre la superficie y el volumen óseo. Una mayor superficie respecto del volumen indica una porosidad más elevada.

Grosor cortical, Ct. Th. (del inglés cortical thickness) (1/mm): Grosor de la región cortical del hueso. Se mide directamente mediante un radio de 90° desde el centro de gravedad de la sección de hueso.

Volumen cortical, Ct. V. (del inglés cortical volume) (mm<sup>3</sup>): Volumen de la región cortical del hueso.

### **Inclusión en metacrilato e histomorfometría ósea**

En el modelo de IRC en ratón se evaluaron únicamente los parámetros estáticos; los parámetros dinámicos no fueron analizados, dado que a los ratones no se les administró tetraciclinas para poder realizar la cuantificación. El análisis histomorfométrico se llevó a cabo en el tercio proximal de la tibia izquierda del ratón. A continuación se describe el procesamiento del tejido:

Fijación: Las muestras se sumergen en formaldehído en tampón fosfato salino (PBS) al 4% durante 24 horas a 4°C y posteriormente se cubren con etanol al 70%, manteniéndose a temperatura ambiente hasta el momento de procesarlas.

Preparación de los reactivos para la solución de polimerización:

- Metil-metacrilato I: 60 ml de metil-metacrilato+35 ml de butil-metacrilato+5 ml de metil-benzoato+1,2 ml de polyetilen-glycol 400.
- Metil-metacrilato II: 100 ml de metil-metacrilato I+0,4 g de peróxido de benzoilo.
- Metil-metacrilato III: 100 ml de metil-metacrilato I+0,8 g de peróxido de benzoilo.

Deshidratación e infiltración en metil-metacrilato: Se deshidrata la muestra en concentraciones crecientes de etanol (70, 90 y 100%). Después se infiltran las muestras en metacrilato, pasando por la solución metil-metacrilato I, metil-metacrilato II y metil-metacrilato-III, tres días en cada solución. Finalmente se prepara la solución de polimerización, que proviene de la mezcla de metil-metacrilato III y de N, N dimetil-p-toluidina. Esta solución se mantiene en hielo y es necesario agitarla durante 15 minutos antes de su utilización. Se añade esta mezcla a los viales de vidrio donde se encuentran las tibias, se elimina el oxígeno con nitrógeno líquido, se tapa y se mantiene 5 ó 6 días a 4°C para que los bloques de metacrilato polimericen.

Cortes histológicos: Para liberar el bloque polimerizado, se rompe el vial de vidrio y se pule el bloque. Luego se realizaron los cortes, en este caso, en secciones de 5 µm de grosor mediante un microtomo Polycut S (Reichert-Jung, Depew, NY, EE.UU). Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos tratados previamente con gelatina y a continuación fueron reblandecidos con etanol al 95% para poder estirarlos y aplanarlos con un pincel. Después se recubrieron con una lámina de polietileno y se colocaron en una prensa durante 1-2 días a 37°C.

Desplastificación: Los cortes se desplastificaron en metil-acetato durante 30 minutos y después se hidrataron en soluciones decrecientes de etanol hasta llegar a agua destilada.

El osteoide se detectó mediante la tinción de tricrómico de Masson y se examinaron al menos dos secciones no consecutivas de cada muestra. Las medidas se tomaron en el área estandarizada para este tipo de análisis, debajo de la placa de crecimiento

de la tibia, en la zona denominada esponjosa secundaria (230). Para la observación de los cortes histológicos se utilizó un microscopio óptico Leica DMRXA2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) acoplado a una cámara digital (Mod. Dc-100, Leica Microsystems) a su vez conectada al sistema de análisis de imagen Osteomeasure™ (OsteoMetrics, Inc. Decatur, GA, USA).

A continuación se mencionan los parámetros analizados por histomorfometría ósea (206):

Número de osteoblastos, N.Ob/B.Pm (del inglés number of osteoblasts/bone perimeter) (nº/mm): Número de osteoblastos en relación al perímetro trabecular.

Superficie osteoblástica, Ob.S/BS (del inglés osteoblast surface/bone surface) (%): Es la relación entre la superficie trabecular con osteoide recubierto por osteoblastos y la superficie trabecular total. Se calcula dividiendo la longitud de todos los ribetes de osteoide recubiertos por osteoblastos entre el perímetro trabecular total.

$$\text{Ob.S/BS} = \text{Longitud total de osteoide recubierto de osteoblastos} / \text{Perímetro trabecular total} \times 100 (\%)$$

Número de osteoclastos, N.Oc/B.Pm (del inglés number of osteoclasts/bone perimeter) (nº/mm): Número de osteoclastos en relación al perímetro trabecular.

Superficie osteoclástica, Oc.S/BS (del inglés osteoclast surface/bone surface) (%): Es la relación entre la superficie trabecular recubierta por osteoclastos y la superficie trabecular total. Se calcula dividiendo la longitud de las lagunas de Howship recubiertas por osteoclastos entre el perímetro trabecular total.

$$\text{Oc.S/BS} = \text{Longitud total de lagunas de Howship con osteoclastos} / \text{Perímetro trabecular total} \times 100 (\%)$$

Superficie de osteoide, OS/BS (del inglés osteoid surface/bone surface) (%): Es la relación entre la superficie ocupada por el osteoide trabecular y la superficie trabecular total. Se calcula a partir de la medida del perímetro del osteoide y del perímetro del hueso trabecular total.

OS/BS = Perímetro del osteoide/Perímetro trabecular × 100 (%)

Volumen de osteoide, OV/BV (del inglés osteoid volume/bone volume) (%): Es la relación entre el volumen ocupado por el osteoide trabecular y el volumen trabecular total. Se obtiene dividiendo el área total del osteoide trabecular y el área trabecular total.

OV/BV = Área osteoide/Área trabecular total × 100 (%)

### 3. Estudio *in vitro* en CMLV

Con el objetivo de estudiar el papel de sKlotho en la calcificación vascular, se plantearon dos estudios *in vitro*: A) Estudiar el posible efecto de sKlotho sobre la diferenciación osteogénica en CMLV tras 24 y 72 horas de incubación en medio calcificante y B) Estudiar si la autofagia tiene algún papel en el proceso de diferenciación osteogénica en CMLV. Se utilizaron CMLV provenientes de cultivo primario de aorta de rata y de la línea celular inmortalizada de rata A7r5 (ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU).

#### Obtención del cultivo primario de CMLV de rata

Se sacrificaron mediante isoflurano ratas Wistar normales no manipuladas de dos meses de edad. En primer lugar, se localizó la aorta sobre la columna vertebral, separándola de la misma con ayuda de las pinzas. Al mismo tiempo se retiró la capa adventicia de la aorta deslizando una pinza sobre su superficie. Finalmente, se cortó la aorta por ambos extremos, para lavarla posteriormente en PBS estéril y 1% de penicilina/estreptomicina en frío.

Las aortas se procesaron en condiciones de esterilidad en la campana de cultivos. En primer lugar, se colocó la aorta en una placa de Petri y se abrió longitudinalmente, como una lámina, para a continuación cortarla en pequeños cuadrados. Después se colocaron los fragmentos de tejido en pocillos cubiertos con fibronectina y se cubrieron con *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM, Lonza, Alsacia, Francia) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS, del inglés fetal bovine serum).

Las CMLV fueron creciendo a partir de los explantes. Cuando alcanzaron la subconfluencia se tripsinizaron y crecieron para llevar a cabo los experimentos.

### **Efecto de sKlotho sobre la diferenciación osteogénica en CMLV**

Para los experimentos de diferenciación osteogénica y calcificación vascular se sembraron las CMLV de cultivo primario en placas de 6 pocillos (Corning Costar, NY, EE.UU) a una densidad de 100.000 células/pocillo. Las células se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomina (Lonza) hasta la subconfluencia.

El medio control se compuso de una concentración de calcio 1,8 mM y de fósforo 1 mM, mientras que el medio calcificante (MC) presentó una concentración de calcio de 1,8 mM y fósforo 3 mM, el cual induce el proceso osteogénico o la calcificación cuando es captado por las células (85, 87, 232). La tercera condición experimental consistió en añadir sKlotho (50 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU) al MC. Esta proteína recombinante es biológicamente activa (233-235) y efectiva a esta concentración en cultivos celulares de osteoblastos (234). Se llevaron a cabo tres experimentos, con cada condición por triplicado, durante 24 y 72 horas, en este último caso renovando el medio de cultivo diariamente. Al finalizar los experimentos las células se recogieron y almacenaron a -80°C hasta evaluar el contenido en calcio y realizar la extracción de ARN.

### **sKlotho, diferenciación osteogénica en CMLV y autofagia**

Con el fin de determinar si sKlotho induce autofagia y si este proceso podría estar implicado en los mecanismos mediante los cuales sKlotho regula la calcificación vascular, se sembraron CMLV de cultivo primario y de la línea celular A7r5 en placas de 96 pocillos (1.000 células/pocillo; BD Falcon, Sparks, NV, EE.UU) o en placas de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) para realizar inmunofluorescencia y western blot, respectivamente.

Como marcador de autofagia se utilizó la proteína LC3B-II (228). La autofagia se evaluó mediante western blot e inmunofluorescencia. En el primer caso se calculó la

proporción LC3B-II/LC3B-I y mediante la inmunofluorescencia se cuantificaron los puntos de LC3B-II en cada célula.

Las CMLV de cultivo primario y la línea celular A7r5 se expusieron durante 24 horas a medio control, MC y a MC+sKlotho.

Debido a que la autofagia es un proceso complejo de medir, es necesario llevar a cabo los experimentos con controles positivos específicos y con inhibidores de la autofagia. Es muy importante añadir un control positivo de autofagia para confirmar si las condiciones experimentales inducen o no el proceso autofágico. Se trata de un medio de cultivo sin nutrientes (NF, del inglés nutrient free), ya que las condiciones de “ayuno” (starvation, en inglés) promueven la autofagia.

Además, como la autofagia es un proceso muy rápido, los componentes que participan en él se degradan también rápidamente, por lo que existe la posibilidad de que no se puedan detectar los cambios mediante un western blot estándar. Por ello es necesario utilizar bafilomicina, que actúa como inhibidor de la autofagia, de manera que las proteínas que participan en el proceso se acumulan temporalmente, pudiéndose detectar los cambios en autofagia ocurridos en los experimentos. Tanto el medio NF como la bafilomicina se añadieron cuatro horas antes de recoger el experimento final.

### **Inmunofluorescencia para LC3B-II en CMLV y A7r5**

Se utilizaron placas de 96 pocillos, se sembraron 1.000 células/pocillo y las condiciones experimentales se realizaron por triplicado. Al finalizar el experimento las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. A continuación, se bloquearon en BSA al 5% en tampón salino Tris-Tween 20 (TBST, del inglés tris buffered saline with tween 20 buffer) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se incubaron con un anticuerpo contra LC3B-II (**Tabla 1**) a 4°C durante la noche. Tras tres lavados con PBS, las células se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente frente a ratón durante 40 minutos. Finalmente, se volvió a lavar con PBS y se tiñeron las células con DAPI para visualizar los núcleos. Los

puntos de LC3B-II se identificaron y cuantificaron con la ayuda del *software* de análisis de imagen ImageJ.

### **Cuantificación del depósito de calcio en las CMLV**

Para la cuantificación del contenido en calcio, las células se homogeneizaron en ácido clorhídrico (HCl) 0,6 N y se agitaron suavemente a 4°C durante la noche. El calcio fue determinado en el sobrenadante mediante el método de la o-cresolftaleína complexona (236) (Sigma-Aldrich). Después de centrifugar las células recogidas, el *pellet* se resuspendió en un tampón de lisis (125 mM Tris, 2% SDS, pH 6,8) para extraer la proteína, la cual se cuantificó por el método DC (BioRad, Hercules, CA, EE.UU). El contenido en calcio se normalizó por la cantidad de proteína total y se expresó como µg calcio/mg proteína.

## **4. Metodología común a los tres modelos**

### **Extracción de ARN**

Se extrajo el ARN de riñón y aorta de ratón y de las CMLV. En el caso de los tejidos, la extracción de ARN se realizó a partir de fragmentos representativos: un trozo que contuviera corteza y médula en el caso del riñón y un fragmento central de la aorta.

Tanto los tejidos como las CMLV se homogeneizaron en un reactivo compuesto de isotiocianato de guanidina y fenol en una solución monofásica (TRI REAGENT™, Sigma-Aldrich). Una vez aislado el ARN, se precipitó con isopropanol y finalmente se lavó con etanol frío al 70%. La concentración de ARN se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU).

### **Síntesis de ADN complementario**

Se utilizaron 2 µg de ARN de cada muestra para la retrotranscripción a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), mediante el *kit* comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) en el

termociclador GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

### PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una técnica que permite conocer la expresión relativa de un determinado gen en una muestra. Como en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés polymerase chain reaction) estándar, se añade a las muestras de ADNc la ADN polimerasa y los nucleótidos, para amplificar la secuencia de interés. En el caso de la qPCR, los oligonucleótidos, que permiten la amplificación específica del gen de interés, actúan junto con sondas. Éstas llevan unidos un fluoróforo y una molécula apantalladora de esa fluorescencia, de tal forma que cuando la sonda se une a su secuencia de ADNc, el fluoróforo y la molécula apantalladora se separan y se puede detectar la fluorescencia.

A medida que avanza la reacción de PCR, las copias del gen de interés aumentan exponencialmente y por lo tanto cada vez habrá mayor fluorescencia, la cual llega a un límite, al agotarse los productos de la reacción. Cuando un segmento es más abundante en una muestra que en otra, la amplificación alcanza antes un determinado umbral. Este umbral se denomina Ct y corresponde al número de ciclos a partir de los cuales se empieza a detectar la fluorescencia (237).

La qPCR se llevó a cabo en duplicados utilizando el equipo Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) mediante los reactivos Fast Start Universal Probe Master (Roche Diagnostics) y ensayos prediseñados para analizar la expresión de los genes problema (**Tabla 2**). La cuantificación relativa de los genes diana se realizó por comparación de los ciclos umbral usando el método de  $\Delta\Delta Ct$ , el cual consiste en comparar los valores Ct del gen de interés con los valores Ct de un gen constitutivo, en este caso GAPDH, para normalizar. A continuación, se compararon estos últimos valores con los Ct de las muestras control, para finalmente utilizar la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (237).

**Tabla 2:** Ensayos pre-diseñados para la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Gen	Símbolo	Referencia
Colágeno tipo I (ratón)	Coll1a1	Mm00801666_g1 (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE.UU)
Dickkopf 3 (ratón)	Dkk3	Mm00443800_m1 (Thermo Fisher)
$\alpha$ -Klotho (ratón)	Kl	Mm00502002_m1 (Thermo Fisher)
Esclerostina (ratón)	Sost	Mm04208528_m1 (Thermo Fisher)
Esclerostina (rata)	Sost	Rn00577971_m1 (Thermo Fisher)
Dickkopf 1 (ratón)	Dkk1	Mm00438422_m1 (Thermo Fisher)
$\alpha$ -actina (ratón)	Acta2	Mm00725412_s1 (Thermo Fisher)
$\alpha$ -actina (rata)	Acta2	Rn01759928_g1 (Thermo Fisher)
Osterix (rata)	Sp7	Rn02769744_s1 (Thermo Fisher)
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ratón)	Gapdh	Mm99999915_g1 (Thermo Fisher)
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (rata)	Gapdh	Rn99999916_s1 (Thermo Fisher)

### Extracción de proteínas

Para la extracción de proteína del riñón, se cortó un trozo representativo de corteza y médula, para a continuación triturarlo con Ultraturax™ (OMNI International, Kennesaw, GA, EE.UU) y resuspenderlo en el tampón de extracción de proteínas RIPA (del inglés radioimmunoprecipitation analysis) con inhibidor de proteasas. Para

la extracción de proteínas, las muestras se sonicaron y centrifugaron a 4°C para recoger finalmente el sobrenadante.

Para la extracción de proteínas de CMLV, se tripsinizaron las células y tras una centrifugación y lavado en PBS, se resuspendieron en RIPA con inhibidor de proteasas.

La concentración de proteína se determinó mediante el método DC o Bradford.

### **Western blot**

Para detectar las proteínas de interés en las muestras de riñón, se utilizaron 40 µg de proteína. Se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) al 8% de acrilamida a 120 V para separar las proteínas en función de su peso molecular. Posteriormente se transfirieron a una membrana Hybond™ P (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU) siguiendo los protocolos estandarizados (238) a 100 V durante una hora. Tras la transferencia y bloqueo de una hora en leche al 5% en TBST para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, la membrana se incubó durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos (**Tabla 1**). Al día siguiente y tras tres lavados de diez minutos en TBST, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (**Tabla 1**) durante una hora a temperatura ambiente. La detección quimioluminiscente de las bandas se realizó mediante el *kit* comercial ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham BiosciencesK, Amersham, Reino Unido) y el sistema de detección de imagen ChemiDoc Gel Imaging system (BioRad). Para cuantificar las bandas de la proteína de interés se utilizó el *software* Image Lab™.

En el caso de las CMLV, un total de 15 µg de proteína fueron utilizados para el western blot. Se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE con acrilamida al 15% para separar las proteínas de menor tamaño. A continuación, fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore, Burlington, MA, EE.UU). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en la **Tabla 1**. La detección quimioluminiscente de las bandas se realizó mediante el reactivo

Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) y el sistema de detección de imagen Odyssey. Fc Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE, EE.UU).

Como indicador del peso molecular se utilizó Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker (Merck, Darmstadt, Alemania) y la GAPDH o la  $\beta$ -actina (**Tabla 1**) fueron utilizadas como control de carga.

## Análisis estadísticos

Los resultados se muestran como mediana [rango intercuartil] o media $\pm$ desviación estándar para los datos con distribución no normal y normal, respectivamente. Para comparar los grupos experimentales se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (análisis no paramétrico) o ANOVA (análisis paramétrico) y las pruebas estadísticas de Dunn o Tukey (para calcular las diferencias específicas entre todos los grupos) como análisis *post hoc*. Las correlaciones fueron realizadas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). En el estudio humano se llevaron a cabo análisis multivariantes de regresión lineal, ajustados por edad, sexo e IMC. Se consideró como estadísticamente significativa una  $p$  menor de 0,05. Todos los cálculos y gráficos se realizaron con el paquete de análisis estadístico R (versión 4.1.1).

## **RESULTADOS**



## Estudio en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 y controles

### Klotho soluble en la progresión de la ERC

En la **Tabla 3** se muestran los datos sociodemográficos, antropométricos y marcadores bioquímicos del estudio llevado a cabo en pacientes desde el estadio ERC-2/3a al estadio ERC-5 y sus respectivos controles. No se encontraron diferencias en la edad ni en el IMC entre controles y pacientes, y tampoco entre los distintos grupos de ERC. Desde el estadio ERC-2/3a hasta el ERC-5 la creatinina sérica mostró un incremento progresivo, en consonancia con la reducción significativa de la TFGe y la creatinina urinaria (**Tabla 3**). La proteinuria aumentó significativamente entre los estadios ERC-2/3a y ERC-5 (**Tabla 3**).

No se observaron cambios en el calcio sérico, mientras que el fósforo mostró un aumento significativo sólo en ERC-5 (**Tabla 3**). Los niveles séricos de PTH y FGF23 mostraron un incremento progresivo que comenzó en ERC-3b (**Tabla 3 y Figura 11A**), mientras que sKlotho sérico mostró una disminución progresiva que comenzó en ERC-2/3a (**Tabla 3 y Figura 11A**). En los pacientes con ERC, los niveles urinarios de sKlotho mostraron un aumento temprano significativo (estadio ERC-2/3a, **Tabla 3**) manteniéndose en niveles similares con la progresión de la enfermedad.

Los niveles de sKlotho sérico se correlacionaron negativamente con la creatinina sérica ( $r=-0,394$ ;  $p=0,0003$ ). Esta misma correlación también se analizó por separado en el grupo control ( $r=-0,307$ ;  $p=0,060$ ) y en los pacientes con ERC ( $r=-0,179$ ;  $p=0,249$ ) (**Figuras 11B y 11C**).

Los niveles de sKlotho urinario se correlacionaron con la TFGe ( $r=-0,439$ ;  $p<0,001$ ), correlación que se mantuvo tras ajustar por edad, sexo e IMC (coeficiente  $\beta=-18,822$ ;  $p=0,011$ ). Se estudió esta correlación separando el grupo control ( $r=0,182$ ;  $p=0,281$ ) de los pacientes con ERC ( $r=-0,085$ ;  $p=0,603$ ), perdiéndose en ambos casos la correlación.

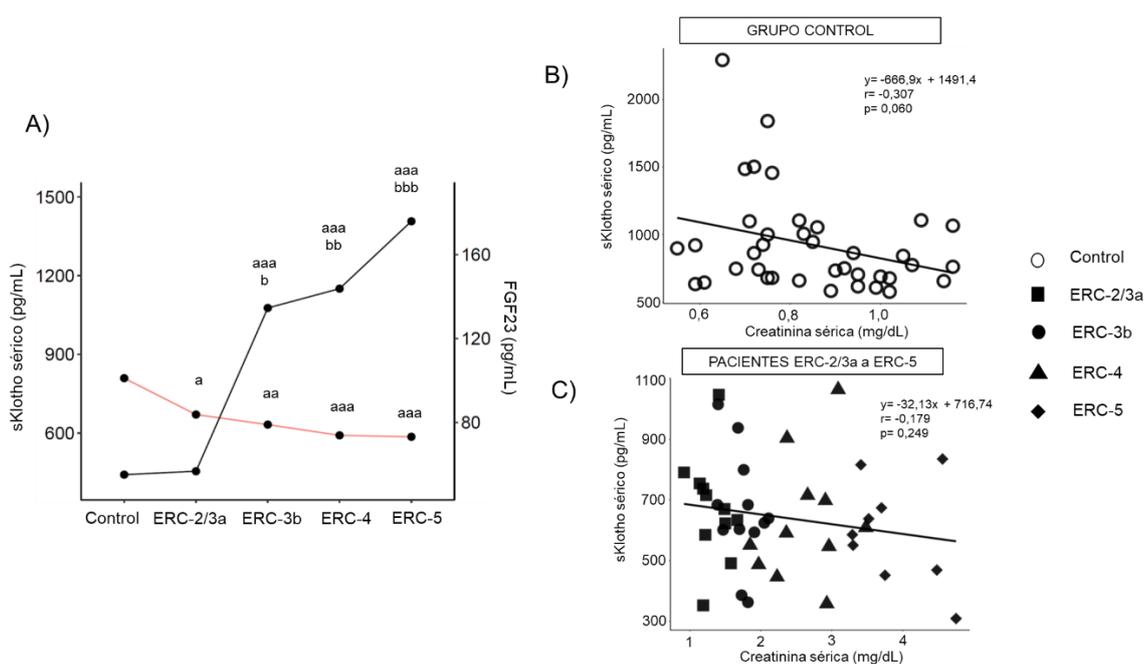
## Resultados

Finalmente, no se observó asociación entre sKlotho sérico y urinario ( $r=-0,095$ ;  $p=0,411$ ).

**Tabla 3:** Parámetros clínicos, bioquímicos y sKlotho en los pacientes con ERC y sus controles.

	Control (n=38)	ERC-2/3a (n=11)	ERC-3b (n=12)	ERC-4 (n=11)	ERC-5 (n=9)
Edad (años)	66,5±4,6	61,7±10,1	67,3±7,4	69,1±8,9	68,8±6,0
Sexo (%)	H: 47,4 M: 52,6	H: 54,5 M: 45,5	H: 75 M: 25	H: 72,7 M: 27,3	H: 22,2 M: 77,8
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,20±4,57	31,30±4,70	26,80±2,84	30,50±6,60	26,70±3,99
Creatinina (mg/dL)	0,83 [0,72-0,98]	<b>1,23 [1,19-1,50]<sup>aaa</sup></b>	<b>1,75 [1,63-1,84]<sup>aaa</sup></b>	<b>2,66 [2,30-2,95]<sup>aaa,b</sup></b>	<b>3,70 [3,41-4,48]<sup>aaa,bbb,c</sup></b>
TFGe (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	81,5 [75,0-87,8]	<b>49,0 [47,0-53,0]<sup>aaa</sup></b>	<b>39,0 [33,8-40,3]<sup>aaa</sup></b>	<b>23,0 [20,5-24,5]<sup>aaa,b</sup></b>	<b>12,0 [12,0-13,0]<sup>aaa,bbb,c</sup></b>
Proteínas totales (g/L)	70,70±3,49	71,20±3,08	69,40±2,88	69,00±3,56	68,50±5,96
Calcio (mg/dL)	9,53±0,27	9,53±0,32	9,55±0,37	9,66±0,60	9,35±0,45
Fósforo (mg/dL)	3,64 [3,54-4,00]	<b>3,16 [3,54-3,53]<sup>a</sup></b>	<b>3,30 [2,69-3,47]<sup>aaa</sup></b>	3,41 [3,10-3,88]	<b>4,09 [3,84-4,87]<sup>a,bbb,ccc,ddd</sup></b>
PTH (pg/mL)	52,0 [41,5-60,5]	56,0 [43,0-75,0]	<b>86,5 [71,8-117,0]<sup>aaa</sup></b>	<b>114,0 [71,5-198,0]<sup>aaa,bb</sup></b>	<b>176,0 [155,0-212,0]<sup>aaa,bbb,c</sup></b>
Calcitriol (pg/mL)	45,6±11,5	38,8±11,5	<b>29,1±10,3<sup>aaa</sup></b>	38,6±17,9	<b>24,0±12,1<sup>aaa</sup></b>
FGF23 (pg/mL)	55,2 [46,3-64,7]	56,8 [52,1-62,8]	<b>134,0 [80,7-166,0]<sup>aaa,b</sup></b>	<b>144,0 [101,0-241,0]<sup>aaa,bb</sup></b>	<b>176,0 [141,0-1689,0]<sup>aaa,bbb</sup></b>
sKlotho (pg/mL)	809 [680-1042]	<b>671 [604-746]<sup>a</sup></b>	<b>632 [600-713]<sup>aa</sup></b>	<b>591 [517-707]<sup>aaa</sup></b>	<b>585 [469-674]<sup>aaa</sup></b>
Creatinina urinaria (mg/dL)	106,0 [74,6-15,0]	<b>44,8 [35,2-100,0]<sup>a</sup></b>	95,9 [57,6-114,0]	82,7 [56,7-95,7]	<b>47,2 [46,6-71,3]<sup>aaa</sup></b>
Proteinuria (g/L)	0,07 [0,05-0,09]	0,05 [0,03-0,16]	<b>0,44 [0,15-0,77]<sup>aaa,bb</sup></b>	<b>0,32 [0,09-0,94]<sup>aaa,bb</sup></b>	<b>0,58 [0,26-1,06]<sup>aaa,bbb</sup></b>
sKlotho urinario (pg/mg creatinina)	433 [189-727]	<b>1143 [539-2220]<sup>aa</sup></b>	<b>1055 [911-2103]<sup>aaa</sup></b>	<b>1003 [849-2819]<sup>aaa</sup></b>	<b>1100 [906-1503]<sup>aaa</sup></b>

ERC, Enfermedad Renal Crónica; H, Hombres; M, Mujeres; IMC, Índice de Masa Corporal; TFGe, Tasa de Filtración Glomerular estimada; PTH, parathormona; FGF23, Factor de Crecimiento Fibroblástico 23; sKlotho, Klotho soluble. <sup>a</sup> $p<0,05$ , <sup>aa</sup> $p<0,01$  y <sup>aaa</sup> $p<0,005$  vs Control; <sup>b</sup> $p<0,05$ , <sup>bb</sup> $p<0,01$ , <sup>bbb</sup> $p<0,005$  vs ERC-2/3a; <sup>c</sup> $p<0,05$ , <sup>cc</sup> $p<0,01$ , <sup>ccc</sup> $p<0,005$  vs ERC-3b; <sup>ddd</sup> $p<0,005$  vs ERC-4. Los valores se expresan como mediana [rango intercuartil] o media±desviación estándar.



**Figura 11:** sKlotho sérico, FGF23 y creatinina en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO. A) Niveles séricos de sKlotho y FGF23. Se muestran las medianas de cada grupo. <sup>a</sup>p<0,05; <sup>aa</sup>p<0,01; <sup>aaa</sup>p<0,005 vs. Control, <sup>b</sup>p<0,05; <sup>bb</sup>p<0,01; <sup>bbb</sup>p<0,005 vs. ERC-2/3a. B) Correlación entre los niveles séricos de sKlotho y creatinina en el grupo control y C) en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos. Los símbolos representan el grupo control (○), ERC-2/3a (■), ERC-3b (●), ERC-4 (▲) y ERC-5 (◆).

## Marcadores de daño vascular en la ERC

### Presión arterial

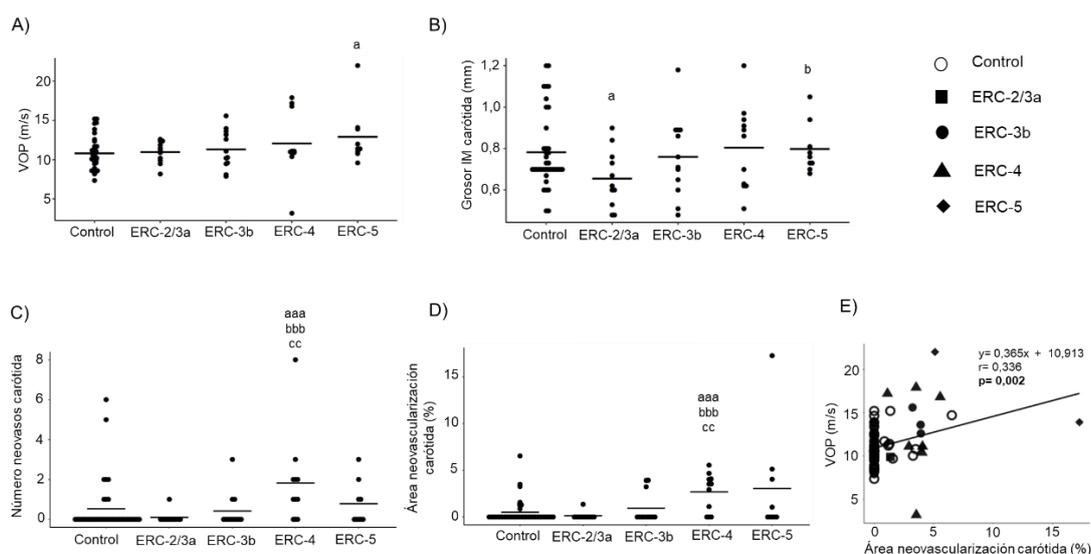
Los pacientes con ERC mostraron aumento de la presión sistólica (Control: 132 [121-143,5] mmHg y ERC: 140 [132,25-158,5] mmHg;  $p=0,009$ ), presión diastólica (Control: 74,58±9,67 mmHg y ERC= 78,98±13,35 mmHg;  $p=0,004$ ) y presión de pulso, aunque esta última no alcanzó la significación estadística (Control: 54,50 [47,25-65,50] mmHg y ERC: 62,00 [51,25-76,75] mmHg;  $p=0,089$ ).

### **Daño vascular y edad**

Considerando en conjunto pacientes con ERC y controles, se observó una correlación positiva entre daño vascular y edad: rigidez aórtica ( $r=0,272$ ;  $p=0,015$ ), grosor íntima-media carotídeo ( $r=0,306$ ;  $p=0,005$ ) y área de neovascularización de la capa adventicia carotídea ( $r=0,308$ ;  $p=0,005$ ). Cuando se separó el grupo control de los pacientes con ERC, la correlación entre daño vascular y edad sólo se mantuvo en la ERC: rigidez aórtica (Control:  $r=0,152$ ;  $p=0,364$  y ERC:  $r=0,317$ ;  $p=0,040$ ), grosor íntima-media carotídeo (Control:  $r=-0,003$ ;  $p=0,986$  y ERC:  $r=0,482$ ;  $p=0,001$ ) y área de neovascularización de la capa adventicia carotídea (Control:  $r=-0,096$ ;  $p=0,567$  y ERC:  $r=0,398$ ;  $p=0,008$ ). Sin embargo, tras ajustar el modelo por sexo, IMC y TFGe, sólo el grosor íntima-media carotídeo mantuvo correlación con la edad (coeficiente  $\beta=0,008$ ;  $p=0,01$ ).

### **Rigidez aórtica**

Los pacientes en ERC-5 presentaron mayor rigidez aórtica, evaluada por VOP (**Figura 12A**). La rigidez aórtica no se correlacionó con sKlotho sérico (Control:  $r=0,026$ ;  $p=0,877$  y ERC:  $r=0,031$ ,  $p=0,843$ ) ni urinario (Control:  $r=-0,234$ ;  $p=0,164$  y ERC:  $r=0,178$ ;  $p=0,279$ ).



**Figura 12:** Daño vascular en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO. A) Valores de rigidez aórtica medida mediante la velocidad de onda de pulso (VOP). B) Grosor íntima-media de la arteria carótida. C) Número de neovasos de la capa adventicia de la arteria carótida. D) Área de neovascularización de la capa adventicia de la arteria carótida. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Control, <sup>b</sup> $p < 0,05$ ; <sup>bbb</sup> $p < 0,005$  vs. ERC-2/3a; <sup>cc</sup> $p < 0,01$  vs ERC-3b. E) Correlación entre el área de neovascularización de la capa adventicia carotídea y la rigidez aórtica medida mediante la velocidad de onda de pulso (VOP). Los símbolos representan el grupo control (○), ERC-2/3a (■), ERC-3b (●), ERC-4 (▲) y ERC-5 (◆).

### Placas de ateroma

El 47,4% de los controles presentó placas de ateroma en la arteria carótida, frente al 60,5% de los pacientes con ERC, aunque la diferencia no fue significativa. Sin embargo, tras eliminar el estadio ERC-2/3a del análisis, el aumento de presencia de placas de ateroma en los pacientes con ERC sí fue significativo ( $p=0,040$ ). Los pacientes en estadios más avanzados de ERC mostraron mayor presencia de placas de ateroma en la carótida (**Tabla 4**). El 55,3% de los controles presentó placas de ateroma en la arteria femoral, frente al 76,7% de los pacientes con ERC ( $p=0,042$ ). Los pacientes en estadios más avanzados de ERC mostraron mayor presencia de placas de ateroma en la arteria femoral (**Tabla 4**).

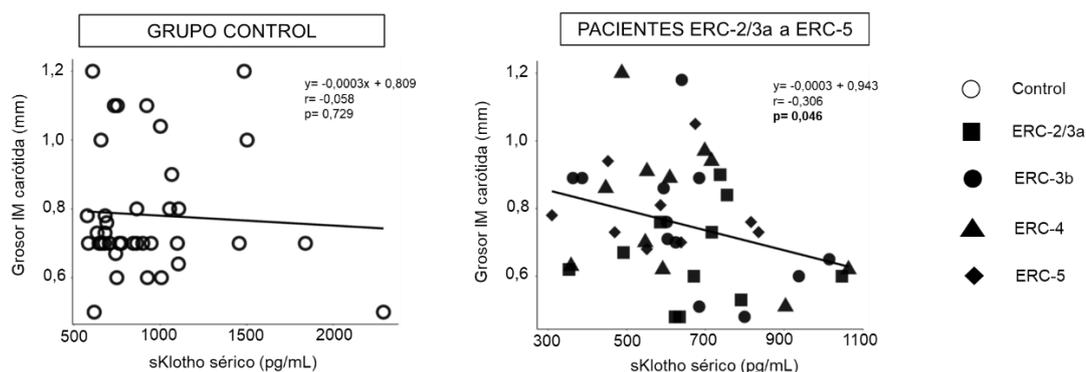
**Tabla 4:** Presencia de placas de ateroma en las arterias carótida y femoral en el grupo control y pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5.

		Arteria carótida	Arteria femoral
<b>Presencia de placas de ateroma (%)</b>	Control	47,4	55,3
	ERC-2/3a	27,3	54,5
	ERC-3b	66,7	83,3
	ERC-4	72,7 <sup>b</sup>	90,9 <sup>a</sup>
	ERC-5	77,8 <sup>b</sup>	77,8

ERC, Enfermedad Renal Crónica. <sup>a</sup>p<0,05 vs Control; <sup>b</sup>p<0,05 vs ERC-2/3a. Los valores se expresan como porcentaje.

### Grosor íntima-media carotídeo

Los pacientes en ERC-5 presentaron mayor grosor íntima-media carotídeo en comparación con el estadio ERC-2/3a (**Figura 12B**). En los pacientes con ERC, el grosor íntima-media carotídeo se correlacionó negativamente con los niveles séricos de sKlotho ( $r=-0,306$ ;  $p=0,046$ ); también tras ajustar el modelo por edad, sexo, IMC y TFGe (coeficiente  $\beta=-0,0004$ ;  $p=0,007$ ). En los controles no se encontró esta correlación ( $r=-0,058$ ;  $p=0,729$ ) (**Figura 13**). No se encontró correlación entre el grosor íntima-media carotídeo y sKlotho urinario en controles ( $r=-0,111$ ;  $p=0,513$ ) ni en pacientes con ERC ( $r=0,165$ ;  $p=0,310$ ).



**Figura 13:** Correlación entre los niveles de sKlotho sérico y el grosor íntima-media carotídeo en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO. Los símbolos representan el grupo control (○), ERC-2/3a (■), ERC-3b (●), ERC-4 (▲) y ERC-5 (◆).

### Neovascularización de la capa adventicia

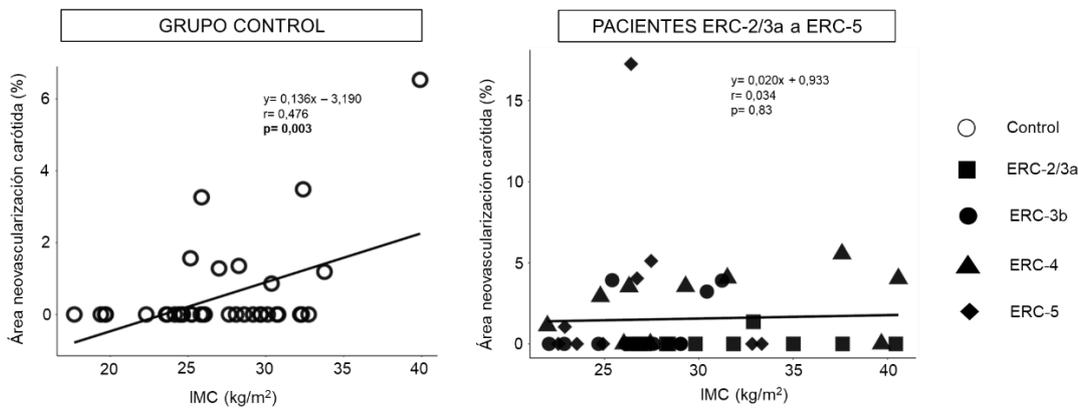
En la arteria femoral, la ecografía SMI no consiguió facilitar imágenes con la suficiente resolución para la identificación y cuantificación precisa de los neovasos, por lo que los resultados se centraron únicamente en la neovascularización carotídea. Los pacientes en el estadio ERC-4 mostraron un aumento significativo del número de neovasos y área de neovascularización de la capa adventicia carotídea. En ERC-5, este aumento de la neovascularización de la capa adventicia carotídea no fue estadísticamente significativo (**Figura 12C-D**).

Ni los controles ni los pacientes con ERC mostraron correlación entre el área de neovascularización de la capa adventicia carotídea y sKlotho sérico (Control:  $r=-0,019$ ;  $p=0,911$  y ERC:  $r=-0,086$ ;  $p=0,585$ ). Los niveles de sKlotho urinario tampoco se correlacionaron con la neovascularización de la capa adventicia carotídea (Control:  $r=-0,178$ ;  $p=0,262$  y ERC:  $r=-0,037$ ;  $p=0,822$ ).

Además, se observó una correlación positiva entre el área de neovascularización de la capa adventicia carotídea y la rigidez aórtica ( $r=0,336$ ;  $p=0,002$ ) (**Figura 12E**), que se mantuvo tras ajustar por edad, sexo e IMC (coeficiente  $\beta=0,293$ ;  $p=0,021$ ).

En el grupo control se observó una correlación positiva entre el área de neovascularización de la capa adventicia carotídea y el IMC ( $r=0,476$ ;  $p=0,003$ ), que

se mantuvo tras ajustar por edad y sexo (coeficiente  $\beta=0,115$ ;  $p=0,014$ ). Los pacientes con ERC no mostraron esta correlación ( $r=0,034$ ;  $p=0,830$ ) (**Figura 14**).



**Figura 14:** Correlación entre el IMC y el área de neovascularización de la capa adventicia carotídea en el grupo control y en los distintos estadios de ERC del estudio en humanos según la clasificación de las guías de práctica clínica KDIGO. Los símbolos representan el grupo control (○), ERC-2/3a (■), ERC-3b (●), ERC-4 (▲) y ERC-5 (◆).

## Niveles de sKlotho y daño renal y vascular en un modelo de IRC moderada en ratón

### Parámetros bioquímicos y función renal

Tras 14 semanas, ambos grupos de ratones nefrectomizados (IRC+PN y IRC+PA) mostraron valores significativamente más elevados de creatinina sérica y BUN en comparación con el grupo de referencia (Sham+PN), pero sin diferencias entre los grupos IRC. Asimismo, los ratones IRC+PA presentaron menor peso, mayores niveles séricos de fósforo, PTH y FGF23, además de una menor concentración de sKlotho sérico (**Tabla 5**). Se encontró una correlación negativa entre sKlotho sérico y la creatinina sérica ( $r= -0,690$ ;  $p<0,001$ ). Se estudió esta misma asociación en el grupo de referencia ( $r=-0,670$ ;  $p=0,069$ ) y en los ratones IRC ( $r=0,021$ ;  $p=0,945$ ). Además, sKlotho sérico se correlacionó con el BUN, calcio, PTH, FGF23 y la fosfatúria (BUN:  $r= -0,573$ ,  $p=0,007$ ; calcio:  $r=-0,453$ ,  $p=0,039$ ; PTH:  $r=-0,549$ ,  $p=0,012$ ; FGF23:  $r=-0,471$ ,  $p=0,031$  y fosfatúria:  $r= -0,468$ ,  $p=0,037$ ).

Respecto a los parámetros urinarios, el grupo IRC+PA mostró menores niveles de calcio y sKlotho y niveles más elevados de fósforo y albúmina en comparación con el grupo IRC+PN (**Tabla 5**). No se encontró correlación entre sKlotho urinario y sKlotho sérico, ni entre sKlotho urinario y el resto de parámetros séricos o urinarios analizados.

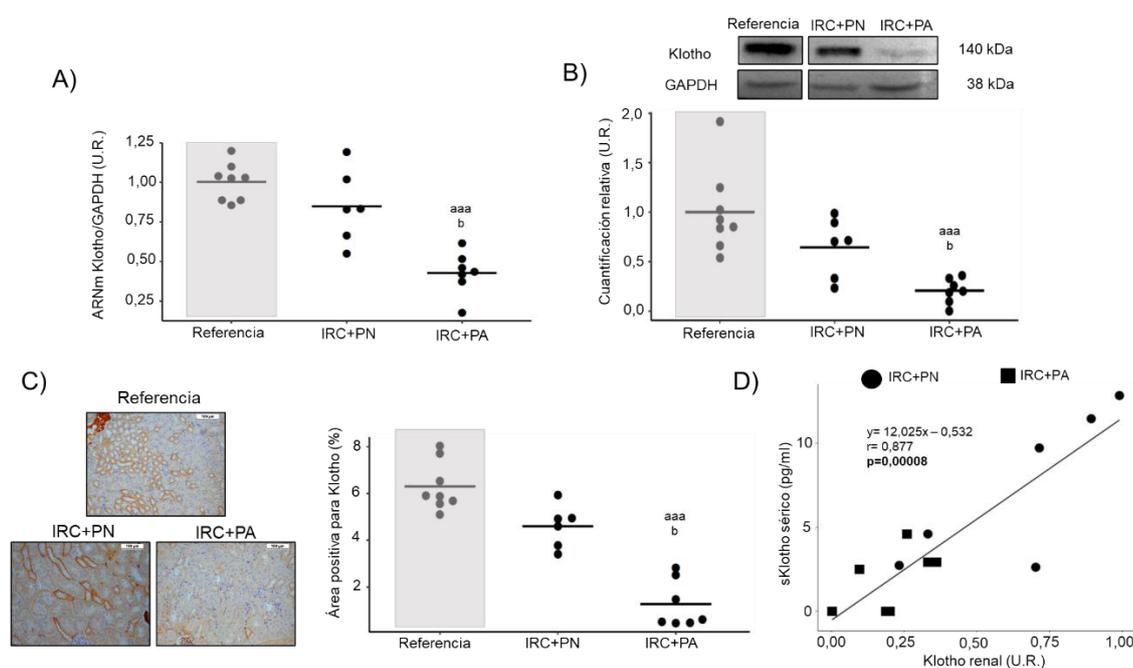
**Tabla 5:** Peso y marcadores de daño renal en el modelo de IRC en ratón.

	Referencia (n=8)	IRC+PN (n=6)	IRC+PA (n=7)
<b>Peso final (g)</b>	32,21±5,73	27,23±1,89	<b>25,54±2,86<sup>aa</sup></b>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,25±0,04	<b>0,34±0,06<sup>a</sup></b>	<b>0,37±0,06<sup>aaa</sup></b>
<b>BUN (mg/dL)</b>	23,19±4,46	<b>41,67±7,14<sup>aaa</sup></b>	<b>36,45±8,86<sup>aaa</sup></b>
<b>Calcio (mg/dL)</b>	9,13±0,56	9,56±0,73	9,67±0,46
<b>Fósforo (mg/dL)</b>	5,29±1,23	5,81±0,79	<b>7,21±1,66<sup>a</sup></b>
<b>PTH (pg/mL)</b>	172,68±58,35	<b>353,29±121,95<sup>a</sup></b>	<b>442,04±219,37<sup>aaa</sup></b>
<b>FGF23 (pg/mL)</b>	196,75±132,13	186,00±75,42	<b>1643,86±892,96<sup>aaa,bbb</sup></b>
<b>Calcitriol (pg/mL)</b>	88,00±29,25	104,71±15,91	109,76±20,30
<b>sKlotho (pg/mL)</b>	36,78±14,81	<b>7,33±4,56<sup>aa</sup></b>	<b>1,85±1,85<sup>aaa</sup></b>
<b>Calciuria (mg/24 hours)</b>	23,50±15,41	26,50±13,00	<b>9,90±6,82<sup>aaa,bb</sup></b>
<b>Fosfaturia (mg/24 hours)</b>	7,20±7,54	2,90±6,40	<b>788,20±483,95<sup>aa,bbb</sup></b>
<b>Albúmina urinaria (µg/24 horas)</b>	32,14 [14,35-49,75]	12,96 [8,37-29,19]	<b>100,85 [37,62-118,32]<sup>b</sup></b>
<b>sKlotho urinario (pg/24 horas)</b>	2269 [1801-13052]	1592 [1158-24249]	<b>537 [373-857]<sup>a,b</sup></b>

IRC, Insuficiencia Renal Crónica; PN, dieta normal en fósforo; PA, dieta con alto contenido en fósforo; BUN, nitrógeno ureico plasmático; PTH, parathormona; FGF23, Factor de Crecimiento Fibroblástico 23; sKlotho, Klotho soluble. <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01 y <sup>aaa</sup>p<0,005 vs Referencia; <sup>b</sup>p<0,05, <sup>bb</sup>p<0,01, <sup>bbb</sup>p<0,005 vs IRC+PN. Los valores se expresan como mediana [rango intercuartil] o media±desviación estándar.

### **Expresión de Klotho en riñón**

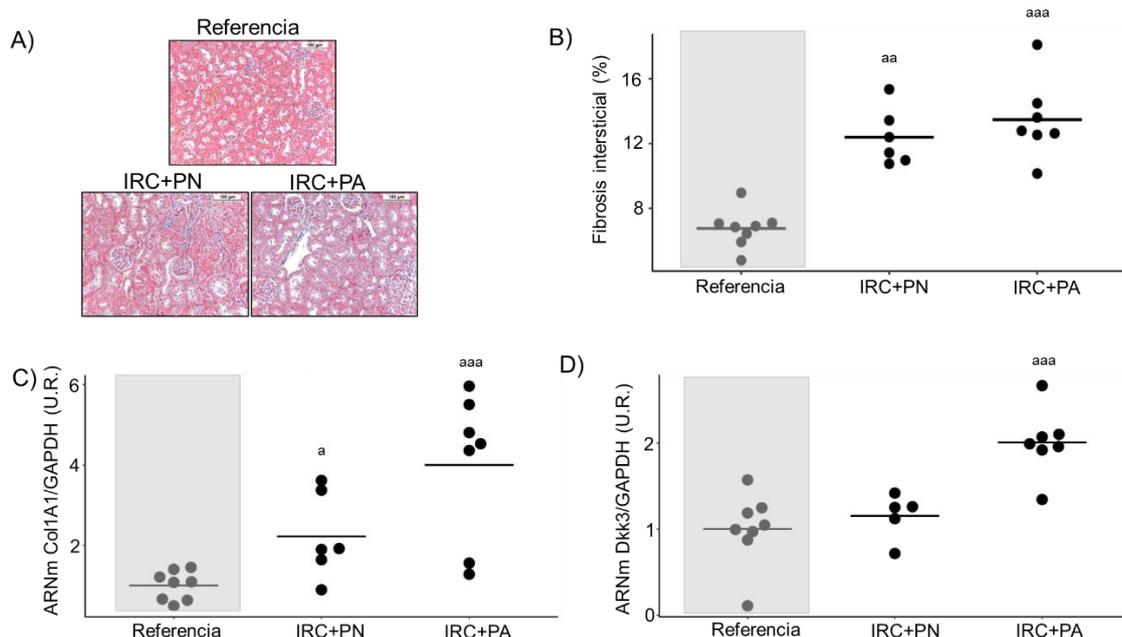
En el grupo IRC+PA, la expresión génica de Klotho en riñón fue significativamente más baja en comparación con los grupos de referencia e IRC+PN (**Figura 15A**). Además, la expresión proteica de Klotho, medida por western blot e inmunohistoquímica, siguió el mismo patrón que su expresión génica (**Figura 15B-C**). En la IRC, la concentración de sKlotho sérico se correlacionó de manera positiva y significativa con el contenido de Klotho renal ( $r=0,877$ ;  $p<0,001$ , **Figura 15D**). Esta correlación también se observó cuando se incluyó el grupo de referencia en el análisis ( $r=0,600$ ;  $p=0,004$ ). En los grupos IRC, los niveles de sKlotho urinario disminuyeron, pero en este caso no se encontró correlación con la expresión de Klotho en riñón ( $r=0,194$ ;  $p=0,40$ ).



**Figura 15:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre la expresión renal de Klotho en el modelo murino. A) Expresión génica de Klotho en riñón en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Referencia, <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. IRC+PN. B) Imagen representativa de Western Blot y cuantificación relativa de la expresión proteica de Klotho en riñón. Todos los valores se expresan en unidades relativas respecto del grupo de Referencia. U.R., unidades relativas. <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Referencia, <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. IRC+PN. C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de Klotho renal y su cuantificación. En cada imagen se indica la escala relativa en  $\mu\text{m}$ . <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Referencia, <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. IRC+PN. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. Se utilizó GAPDH como gen constitutivo o control de carga. D) Correlación entre la expresión proteica de Klotho en riñón y sKlotho sérico en los grupos IRC. Los símbolos representan el grupo IRC+PN (●) e IRC+PA (■).

## Fibrosis renal

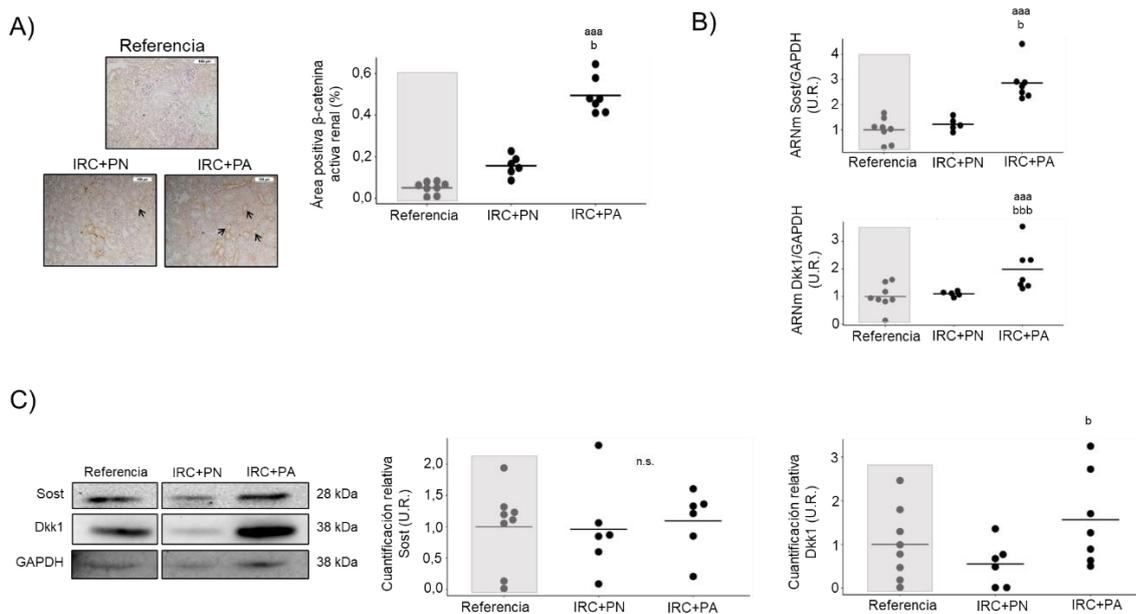
En los grupos IRC, la tinción con tricrómico de Masson en riñón mostró un mayor grado de fibrosis en comparación con el grupo de referencia (**Figura 16A-B**). Además, en los ratones con IRC y especialmente en el grupo IRC+PA, la expresión génica en riñón de colágeno I y Dkk3, ambos marcadores de fibrosis, fue significativamente mayor (**Figura 16C-D**).



**Figura 16:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre la fibrosis renal en el modelo murino. A) Imágenes representativas de la fibrosis renal intersticial y B) su cuantificación en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. En cada imagen se indica la escala relativa en  $\mu\text{m}$ . Se representan los valores individuales y la media de cada grupo.  $^{aa}p < 0,01$  y  $^{aaa}p < 0,005$  vs. Referencia. C) Expresión génica del colágeno I en riñón. D) Expresión génica de Dkk3 en riñón. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. Todos los valores se expresan en unidades relativas respecto del grupo de Referencia.  $^ap < 0,05$  y  $^{aaa}p < 0,005$  vs. Referencia. U.R., unidades relativas. Se utilizó GAPDH como gen constitutivo.

### Vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en riñón

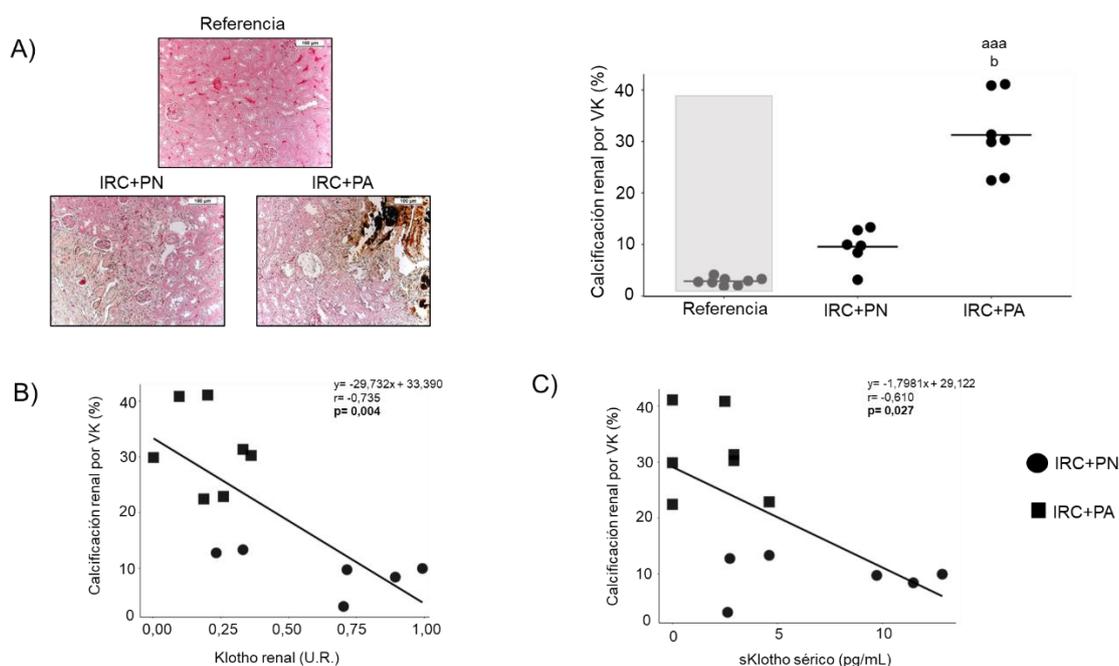
El grupo IRC+PA mostró activación de la vía de Wnt en riñón (**Figura 17A**), que coincidió con una expresión génica significativamente mayor de Sost y Dkk1 en comparación con el grupo IRC+PN (**Figura 17B**). Respecto a la expresión proteica, no se observaron cambios significativos en Sost, pero el grupo IRC+PA mostró niveles de Dkk1 significativamente más elevados que los ratones IRC+PN (**Figura 17C**).



**Figura 17:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los componentes de la vía en Wnt/β-catenina en el riñón en el modelo murino. A) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de la expresión de la β-catenina activa y su cuantificación en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. En cada imagen se indica la escala relativa en μm. B) Expresión génica de Sost y Dkk1 en riñón. <sup>aaa</sup>p<0,005 vs. Referencia, <sup>b</sup>p<0,05 y <sup>bbb</sup>p<0,005 vs. IRC+PN. C) Imagen representativa de western blot y cuantificación relativa de la expresión proteica de Sost y Dkk1 en riñón. <sup>b</sup>p<0,05 vs. IRC+PN. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. Todos los valores se expresan en unidades relativas respecto del grupo de Referencia. U.R., unidades relativas. Se utilizó GAPDH como gen constitutivo o control de carga.

### Depósitos de calcio en riñón y diferenciación osteogénica en aorta

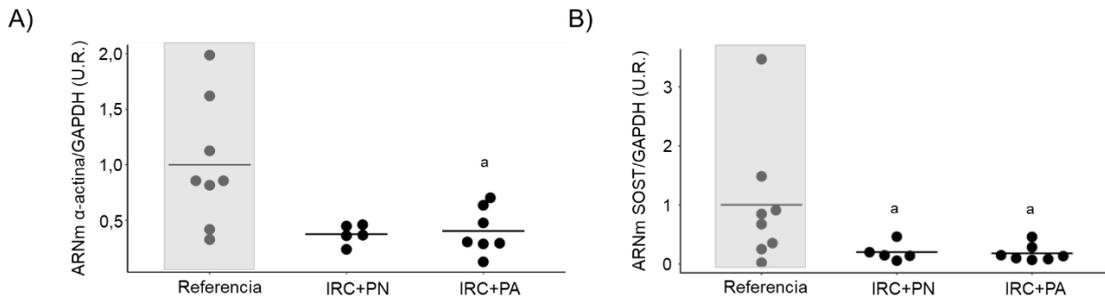
El grupo IRC+PA mostró aumento de los depósitos de calcio renales en comparación con el grupo IRC+PN (**Figura 18A**). Además, en la IRC, se observó una correlación negativa entre los niveles de Klotho renal y los depósitos de calcio ( $r=-0,735$ ;  $p=0,004$ , **Figura 18B**). Esta correlación se mantuvo cuando se añadió el grupo de referencia ( $r=-0,725$ ;  $p<0,001$ ). En la IRC también se encontró una correlación negativa y significativa entre sKlotho sérico y los depósitos de calcio renales ( $r=-0,610$ ;  $p=0,027$ , **Figura 18C**), correlación que se mantuvo cuando se añadió el grupo de referencia al análisis ( $r=-0,671$ ;  $p<0,001$ ).



**Figura 18:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre la formación de depósitos de calcio en el riñón en el modelo murino. A) Imágenes representativas de los depósitos de calcio renales y su cuantificación en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. En cada imagen se indica la escala relativa en  $\mu\text{m}$ . Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Referencia y <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. IRC+PN. B) Correlación entre la expresión proteica de Klotho y los depósitos de calcio renales en los grupos IRC. C) Correlación entre los niveles de sKlotho sérico y los depósitos de calcio renales en los grupos IRC. Los símbolos representan el grupo IRC+PN (●) e IRC+PA (■). VK, tinción Von Kossa.

Ninguno de los grupos experimentales mostró calcificación vascular, evaluada mediante la tinción de rojo de Alizarina. Sin embargo, la aorta de los ratones con IRC presentó menor expresión génica de  $\alpha$ -actina (**Figura 19A**) y Sost (**Figura 19B**).

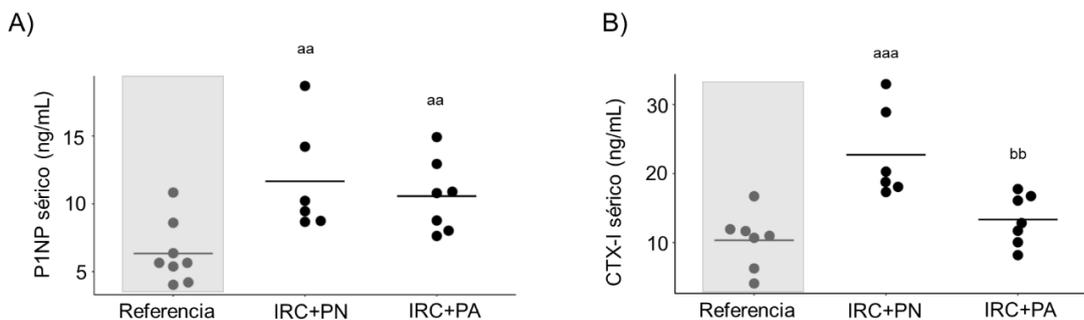
Ni en el grupo de referencia ni en los grupos IRC se observó correlación entre los niveles séricos de sKlotho y la expresión génica de  $\alpha$ -actina en aorta. Los niveles urinarios de sKlotho tampoco se correlacionaron con la expresión génica de  $\alpha$ -actina en aorta.



**Figura 19:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre el proceso de diferenciación osteogénica en la aorta del modelo murino. A) Expresión génica de la  $\alpha$ -actina y B) de Sost en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Referencia. Todos los valores se expresan en unidades relativas respecto del grupo de Referencia. U.R., unidades relativas. Se utilizó GAPDH como gen constitutivo.

## Marcadores séricos y alteraciones en la histología y microarquitectura ósea en un modelo de IRC moderada en ratón

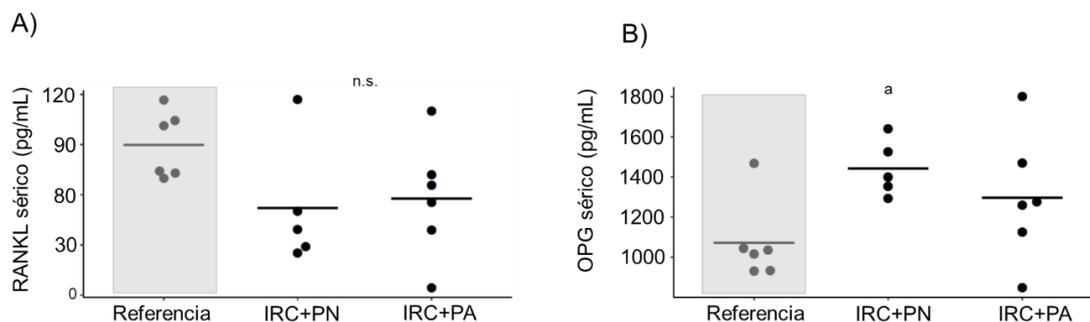
Los ratones con IRC presentaron aumento de los niveles séricos de P1NP, marcador de formación ósea (**Figura 20A**). En el grupo IRC+PN se observó aumento de CTX-I sérico, marcador de resorción ósea (**Figura 20B**).



**Figura 20:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los marcadores séricos de formación (P1NP) y resorción (CTX-I) ósea en el modelo murino. A) Niveles séricos de P1NP y B) CTX-I en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. Se representan los

valores individuales y la media de cada grupo. <sup>aa</sup> $p < 0,01$  y <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Referencia y <sup>bb</sup> $p < 0,01$  vs. IRC+PN.

También se analizaron los niveles séricos de RANKL y OPG, reguladores de la vía de RANK/RANKL/OPG, implicada en la formación y resorción ósea. Los ratones de los grupos IRC mostraron una tendencia de disminución en RANKL y de aumento en OPG (**Figura 21A-B**).



**Figura 21:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los niveles séricos de los reguladores de la vía RANK/RANKL/OPG en el modelo murino. A) Niveles séricos de RANKL y B) OPG en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Referencia. RANKL, ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa B$ ; OPG, osteoprotegerina; n.s., no significativo.

Respecto a los parámetros trabeculares, los ratones IRC+PA mostraron menor grosor trabecular (Tb.Th) en comparación con el grupo de referencia. En los ratones IRC+PN se observó mayor superficie osteoblástica (Ob.S/BS) (**Tabla 6**). Además, el grupo IRC+PN mostró aumento de la superficie de osteoide (OS/BS) y del volumen de osteoide (OV/BV), mientras que no hubo cambios en los ratones IRC+PA respecto al grupo de referencia (**Tabla 6**). No se observaron cambios significativos en el resto de parámetros trabeculares analizados: volumen óseo (BV/TV), separación trabecular (Tb.Sp.), número de trabéculas (Tb.N.), número de osteoblastos (N.Ob/B.Pm), número de osteoclastos (N.Oc/B.Pm) y superficie osteoclástica (Oc.S/BS).

En cuanto a los parámetros corticales, el grupo IRC+PA mostró mayor porosidad (medida como Ct.BS/BV), menor grosor cortical (Ct.Th.) y menor volumen cortical (Ct.V.) respecto al grupo de referencia (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Valores de  $\mu$ CT e histomorfometría ósea en el modelo de IRC en ratón.

		Referencia (n=8)	IRC+PN (n=6)	IRC+PA (n=7)
Hueso total	DMO (g/cm <sup>3</sup> )	0,169 [0,158-0,182]	0,169 [0,167-0,173]	0,14 [0,129-0,165]
	BV/TV (%)	7,27 [7,00-8,05]	7,46 [7,24-7,86]	6,31 [5,53-7,34]
Hueso trabecular	Tb. Th. (mm)	0,043 [0,040-0,045]	0,041 [0,040-0,041]	<b>0,040 [0,039-0,040]<sup>a</sup></b>
	Tb.Sp. (mm)	0,303 [0,281-0,315]	0,293 [0,291-0,324]	0,308 [0,290-0,328]
	Tb. N. (1/mm)	1,76 [1,65-1,90]	1,80 [1,71-1,99]	1,65 [1,36-1,83]
	N.Ob	9,65 [6,81-11,40]	14,59 [13,73-16,70]	12,68 [8,65-13,78]
	Ob.S/BS (%)	11,54 [7,41-13,73]	<b>17,90 [17,81-20,72]<sup>a</sup></b>	15,42 [9,98-17,07]
	N.Oc	1,89 [1,74- 2,40]	1,09 [0,57- 1,74]	1,90 [1,34-2,73]
	Oc.S/BS (%)	6,500±3,040	4,169±3,784	7,251±4,247
	OS/BS (%)	18,16 [8,99-19,54]	<b>35,01 [34,30-36,62]<sup>aa</sup></b>	<b>14,60 [13,92-16,67]<sup>bbb</sup></b>
	OV/BV (%)	2,95 [1,36-3,45]	<b>7,17 [5,96-9,43]<sup>aaa</sup></b>	<b>2,52 [2,28-3,24]<sup>bbb</sup></b>
	Ct. BS/BV (1/mm <sup>3</sup> )	13,81 [13,66-14,07]	13,97 [13,97-14,14]	<b>15,14 [14,42-15,50]<sup>a</sup></b>
Hueso cortical	Ct. Th. (1/mm)	0,224 [0,221-0,228]	0,219 [0,218-0,219]	<b>0,201 [0,192-0,211]<sup>a</sup></b>
	Ct. V. (mm <sup>3</sup> )	0,700 [0,659-0,725]	0,644 [0,642-0,663]	<b>0,642 [0,607-0,661]<sup>a</sup></b>

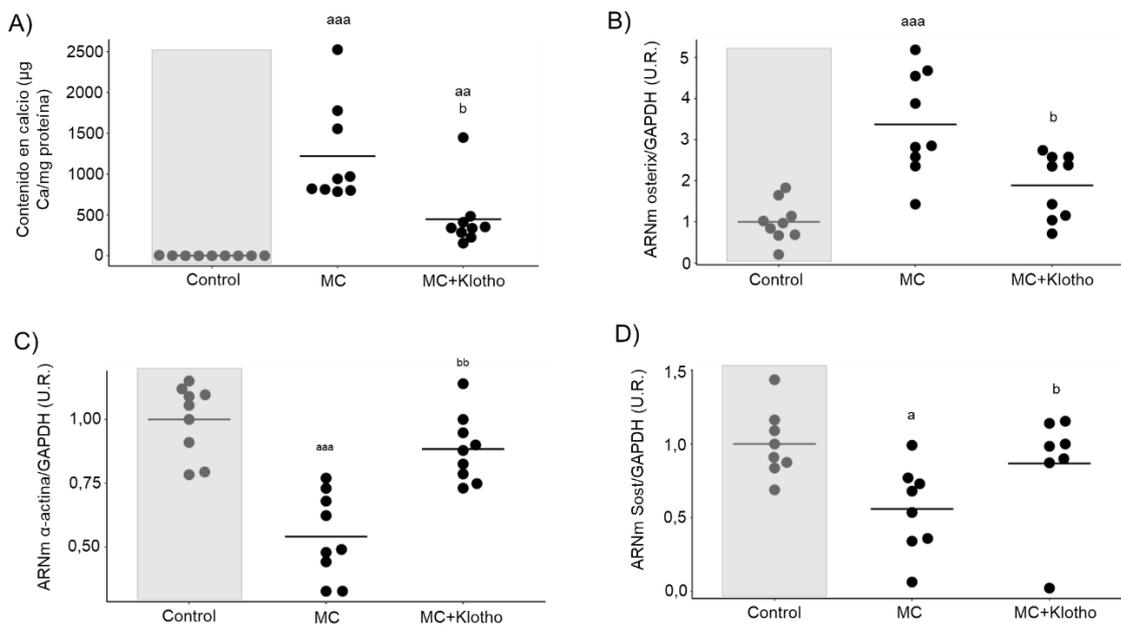
IRC, Insuficiencia Renal Crónica; PN, dieta normal en fósforo; PA, dieta con alto contenido en fósforo; DMO, densidad mineral ósea; BV/TV, volumen óseo; Tb.Th., grosor trabecular; Tb.Sp., separación trabecular; Tb.N., número de trabéculas; N.Ob, número de osteoblastos; Ob.S/BS, superficie osteoblástica; N.Oc, número de osteoclastos; Oc.S/BS, superficie osteoclástica; OS/BS, superficie de osteoide; OV/BV, volumen de osteoide; Ct. BS/BV, porosidad cortical; Ct.Th., grosor cortical; Ct.V., volumen cortical. <sup>a</sup>p<0,05, <sup>aa</sup>p<0,01 y <sup>aaa</sup>p<0,005 vs Referencia y <sup>bbb</sup>p<0,005 vs IRC+PN. Los valores se expresan como mediana [rango intercuartil] o media±desviación estándar.

Se observó correlación entre sKlotho sérico y el grosor trabecular ( $r=0,665$ ;  $p=0,001$ ), porosidad cortical ( $r=-0,532$ ;  $p=0,016$ ), grosor cortical ( $r=0,560$ ;  $p=0,010$ ) y volumen cortical ( $r=0,560$ ;  $p=0,010$ ). Sin embargo, cuando se estudiaron únicamente los grupos IRC, no se encontró correlación entre sKlotho sérico y estos parámetros de la microarquitectura ósea. No hubo asociación entre la microarquitectura ósea y sKlotho urinario.

### **Efecto de sKlotho sobre la calcificación vascular *in vitro***

Las CMLV de cultivo primario fueron incubadas en medio control (1,8 mM calcio y 1 mM fósforo) o medio calcificante (MC: 1,8 mM calcio y 3 mM fósforo) durante 24 y 72 horas, con o sin la adición de sKlotho (50 ng/ml). Tras 24 horas de exposición a las condiciones calcificantes, no se encontraron cambios en el contenido en calcio ni en la expresión génica de Osterix y Sost. Sin embargo, en las CMLV sometidas a condiciones calcificantes, la expresión génica de la  $\alpha$ -actina fue significativamente menor en comparación al control ( $0,81\pm 0,11$  vs  $1\pm 0,09$ , respectivamente;  $p=0,002$ ). La adición de sKlotho no alteró la expresión génica de la  $\alpha$ -actina en condiciones calcificantes a las 24 horas (MC= $0,81\pm 0,11$  vs MC+sKlotho= $0,80\pm 0,11$ ;  $p=0,89$ ).

Tras 72 horas de exposición a condiciones calcificantes, el contenido en calcio y la expresión génica de Osterix aumentaron significativamente, mientras que la expresión génica de la  $\alpha$ -actina se vio reducida (**Figuras 22A-C**). Cuando se añadió sKlotho, el contenido en calcio y la expresión génica de Osterix disminuyeron significativamente respecto a las condiciones calcificantes sin sKlotho (**Figuras 22A-B**) y la expresión génica de la  $\alpha$ -actina se recuperó parcialmente (**Figura 22C**). En las CMLV sometidas a condiciones calcificantes, los niveles de ARNm de Sost se redujeron respecto al control y su expresión génica aumentó de manera significativa cuando se añadió sKlotho (**Figura 22D**).

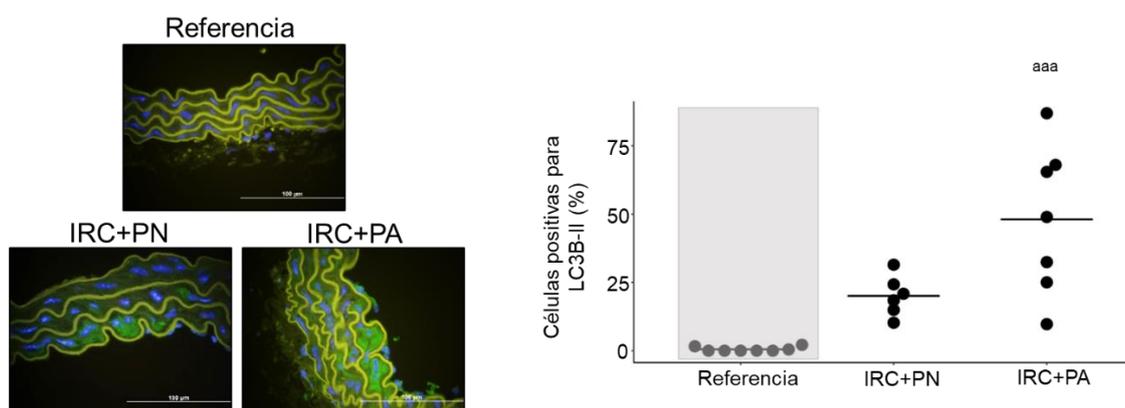


**Figura 22:** Efecto de sKlotho sobre la diferenciación osteogénica de células de músculo liso vascular de cultivo primario (CMLV) expuestas a medio control, medio calcificante (MC) y MC+sKlotho durante 72 horas. A) Cuantificación del contenido en calcio. B) Expresión génica de Osterix, C)  $\alpha$ -actina y D) Sost. Todos los valores se expresan en unidades relativas respecto al grupo control como la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>aa</sup> $p < 0,01$  and <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. control, <sup>b</sup> $p < 0,05$  y <sup>bb</sup> $p < 0,01$  vs. MC. U.R., unidades relativas.

## Autofagia y daño vascular

### Modelo de IRC en ratón: niveles de autofagia en aorta

Ambos grupos con IRC mostraron un mayor porcentaje de células positivas para LC3B-II respecto al grupo de referencia, alcanzándose niveles significativamente más altos en los ratones IRC+PA (Referencia= $0,53 \pm 0,86\%$ , IRC+PN= $20,03 \pm 7,41\%$  e IRC+PA= $48,08 \pm 27,25\%$ ;  $p = 0,0003$ ; **Figura 23**).

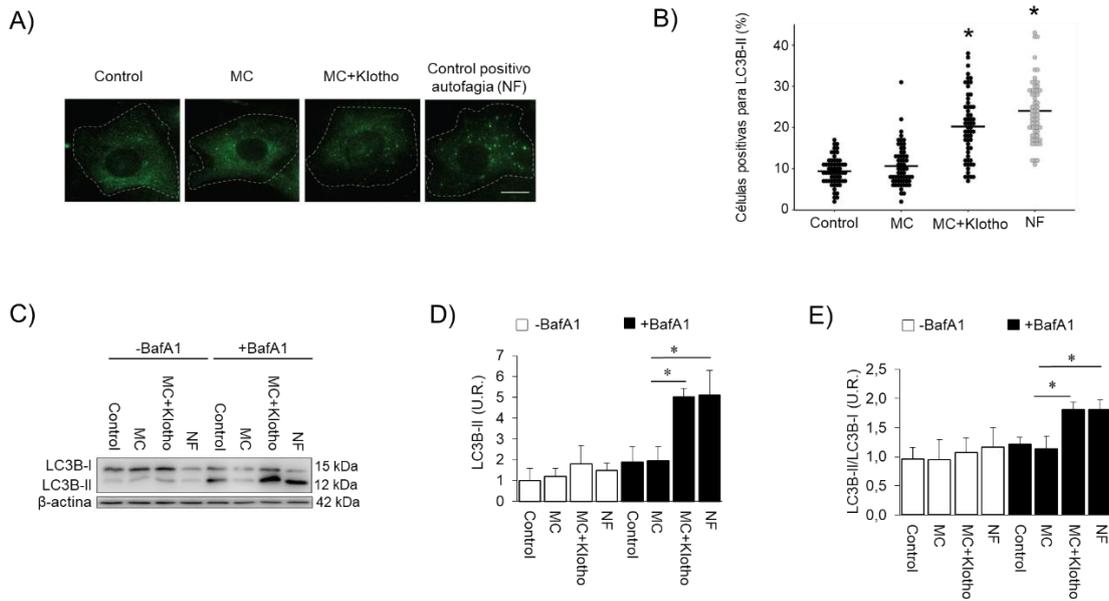


**Figura 23:** Consecuencias de la insuficiencia renal crónica (IRC) y el consumo de fósforo en la dieta sobre los niveles de autofagia en la aorta del modelo murino. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para LC3B-II y su cuantificación en la aorta en el grupo de Referencia, ratones IRC alimentados con una dieta normal en fósforo (IRC+PN) y ratones IRC alimentados con una dieta con alto contenido en fósforo (IRC+PA) durante 14 semanas. En cada imagen se indica la escala relativa en  $\mu\text{m}$ . Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. <sup>aaa</sup> $p < 0,005$  vs. Referencia. U.R., unidades relativas.

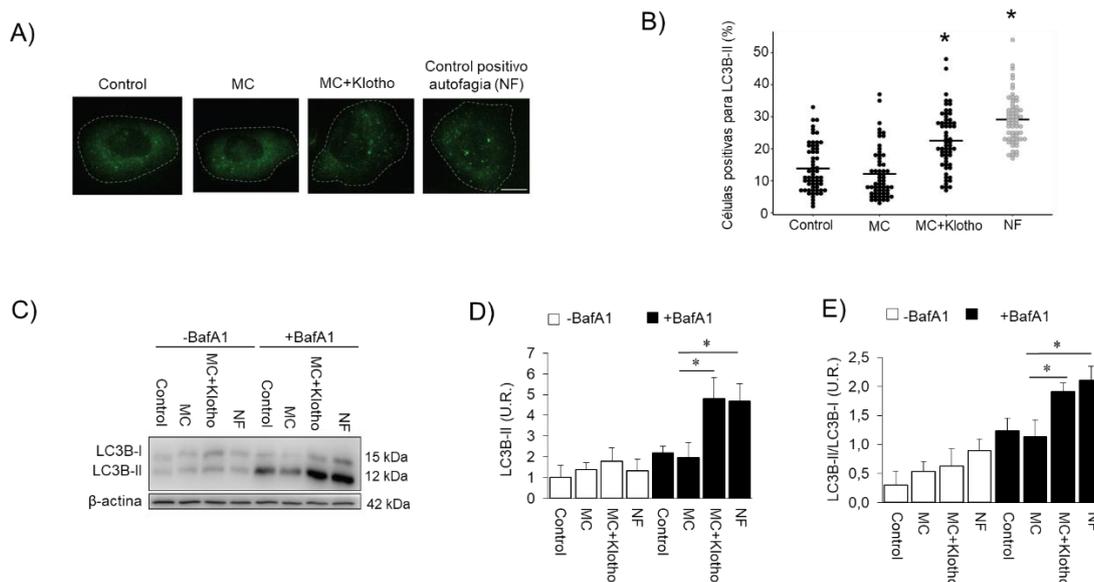
### Modelo de calcificación vascular *in vitro*: sKlotho como inductor de la autofagia

Tras 24 horas de incubación en condiciones calcificantes y sKlotho, las CMLV mostraron mayores niveles de LC3B-II, medidos mediante inmunofluorescencia, respecto a las CMLV expuestas a condiciones calcificantes sin sKlotho, alcanzándose valores similares a los del control positivo de autofagia (medio nutrient free) (**Figuras 24A-B**).

Además, se analizó la autofagia por western blot, mediante la incubación con bafilomicina A1 durante las últimas cuatro horas de experimento. Las CMLV expuestas a condiciones calcificantes y sKlotho mostraron aumento en los niveles celulares de LC3B-II respecto a las CMLV expuestas a condiciones calcificantes sin sKlotho (**Figuras 24C-E**). El aumento de la autofagia se confirmó en la línea celular A7r5, con la que se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con las CMLV de cultivo primario (**Figura 25**).



**Figura 24:** Efecto de sKlotho sobre la autofagia en células de músculo liso vascular de cultivo primario (CMLV) expuestas a medio control, medio calcificante (MC) y MC+sKlotho durante 24 horas. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para LC3B-II. Cada imagen representa una célula. Se muestra un control positivo de autofagia (nutrient free, NF). B) Cuantificación de los puntos LC3B-II por célula. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. \* $p < 0,05$  vs. MC. C) Imagen representativa de western blot para la expresión proteica de LC3B-II. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El western blot muestra las condiciones experimentales sin (-) y con (+) exposición a Bafilomicina. D) Cuantificación relativa de la expresión proteica de LC3B-II. \* $p < 0,05$  vs. MC. E) Cuantificación relativa de la expresión proteica de la proporción LC3B-II/LC3B-I. \* $p < 0,05$  vs. MC. Se muestran la media y desviación estándar de cada grupo experimental. U.R., Unidades relativas.



**Figura 25:** Efecto de sKlotho sobre la autofagia en células de músculo liso vascular de rata de la línea comercial A7r5 expuestas a medio control, medio calcificante (MC) y MC+sKlotho durante 24 horas. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para LC3B-II. Cada imagen representa una célula. Se muestra un control positivo de autofagia (nutrient free, NF). B) Cuantificación de los puntos LC3B-II por célula. Se representan los valores individuales y la media de cada grupo. \* $p < 0,05$  vs. MC. C) Imagen representativa de western blot para la expresión proteica de LC3B-II. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El western blot muestra las condiciones experimentales sin (-) y con (+) exposición a Bafilomicina. D) Cuantificación relativa de la expresión proteica de LC3B-II. \* $p < 0,05$  vs. MC. E) Cuantificación relativa de la expresión proteica de la proporción LC3B-II/LC3B-I. \* $p < 0,05$  vs. MC. Se muestran la media y desviación estándar de cada grupo experimental. U.R., Unidades relativas.



**DISCUSIÓN**



Esta tesis doctoral incluye cuatro objetivos principales que se irán discutiendo en el siguiente orden: **1)** Estudiar los niveles séricos y urinarios de sKlotho en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 y en un modelo experimental de IRC en ratón. **2)** Estudiar el daño vascular asociado a CKD-MBD en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5 y en un modelo experimental de IRC en ratón y la posible correlación del daño vascular con los niveles de sKlotho. **3)** Estudiar en un modelo de IRC en ratón las alteraciones de la microarquitectura ósea y su posible correlación con sKlotho. **4)** Estudiar el potencial efecto de sKlotho sobre la calcificación vascular en un modelo *in vitro* de CMLV y la posible implicación de la autofagia en el daño vascular.

## **1. Niveles de sKlotho sérico y urinario en CKD-MBD**

### **sKlotho sérico y urinario en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5**

En pacientes con ERC, los niveles de sKlotho sérico disminuyeron a partir del estadio ERC-2/3a, antes de que FGF23 y PTH aumentaran, ambos marcadores clásicos de CKD-MBD. Esto posiciona a sKlotho sérico como biomarcador temprano de CKD-MBD (239), siguiendo la misma línea que otros estudios clínicos en ERC (117, 118).

Los valores de sKlotho sérico mostraron un ligero descenso no significativo durante la progresión de la ERC, lo que sugiere que sus valores no reflejan adecuadamente la progresión de la enfermedad, aunque aún es un tema controvertido (116-118, 240-242). Al contrario de lo observado con sKlotho sérico, FGF23 aumentó de manera progresiva y significativa desde el estadio ERC-3b, mostrando mayor utilidad para reflejar la progresión de la enfermedad, como han mostrado otros autores (239, 241).

El grupo control mostró que un mayor valor de sKlotho sérico se asoció a una menor creatinina sérica, pero esta tendencia desapareció en los pacientes con ERC. Este resultado indica de nuevo que sKlotho sérico no reflejó la progresión de la ERC y pone de manifiesto la influencia de múltiples factores en la ERC que no sufre la población general y que puede hacer perder las correlaciones encontradas en el grupo control.

En pacientes con ERC, los niveles de sKlotho urinario aumentaron, comportándose de manera opuesta a sKlotho sérico. Además, no se encontró correlación entre los valores séricos y urinarios de sKlotho. Esto sugiere la existencia de mecanismos de eliminación de sKlotho a través de la orina independientes de la liberación de sKlotho a la circulación sanguínea: un distinto grado, cronología o tipo de daño renal podría explicar el aumento inesperado de sKlotho urinario en la ERC. Estos resultados indican que los valores de sKlotho sérico y urinario deberían ser interpretados por separado. Además, dado que el procesamiento de muestras de orina para el análisis de sKlotho es especialmente delicado y no está estandarizado (132), pudo haber causas técnicas que hayan influido en la evaluación de sKlotho urinario.

En consonancia con este trabajo, un estudio clínico reciente mostró la falta de correlación entre sKlotho sérico y urinario (128). Sin embargo, y al contrario de lo observado en el presente estudio, algunos autores han mostrado niveles reducidos de sKlotho urinario en la ERC (65, 116), llegando a disminuir incluso antes que sKlotho sérico (119), si bien hay que tener en cuenta que en varios de estos estudios la media de edad entre controles y pacientes con ERC es muy dispar, lo cual puede haber influido en la interpretación de sus resultados.

Hay que tener en cuenta que los trabajos centrados en estudiar sKlotho urinario en la ERC son escasos y que aún no se sabe explicar la presencia de sKlotho en la orina -ya que el elevado tamaño de sKlotho, 130 kDa, le impide atravesar la barrera glomerular- ni cómo los distintos tipos de alteraciones renales podrían influir en la liberación de Klotho al espacio urinario (104, 243, 244). Hasta la fecha se han propuesto dos hipótesis para explicar la presencia de sKlotho en la orina. La primera propone que esta proteína sufriría un proceso de transcitosis que la transporta hasta el espacio urinario (104). La segunda hipótesis afirma que distintas proteasas podrían escindir la proteína Klotho transmembrana y liberarla a la orina (104).

### **sKlotho sérico y urinario en un modelo de IRC en ratón**

El valor de sKlotho sérico se redujo significativamente en los grupos IRC+PN e IRC+PA, mientras que FGF23 aumentó únicamente en el grupo IRC+PA, inducido por la dieta con alto contenido en fósforo (12). Como ocurrió en el estudio en pacientes con ERC, el descenso de sKlotho sérico ocurrió antes que el incremento de FGF23. Además, la caída (del 80%) de sKlotho sérico en el grupo IRC+PN fue más marcada que los aumentos de PTH. Asimismo, la correlación entre los niveles de creatinina y sKlotho séricos se perdió cuando se estudiaron únicamente los grupos con IRC. Estos resultados confirmaron el papel de sKlotho sérico como biomarcador temprano de CKD-MBD, pero no como indicador de progresión de IRC, tal y como se concluyó en el estudio en pacientes con ERC (**Figura 26**).

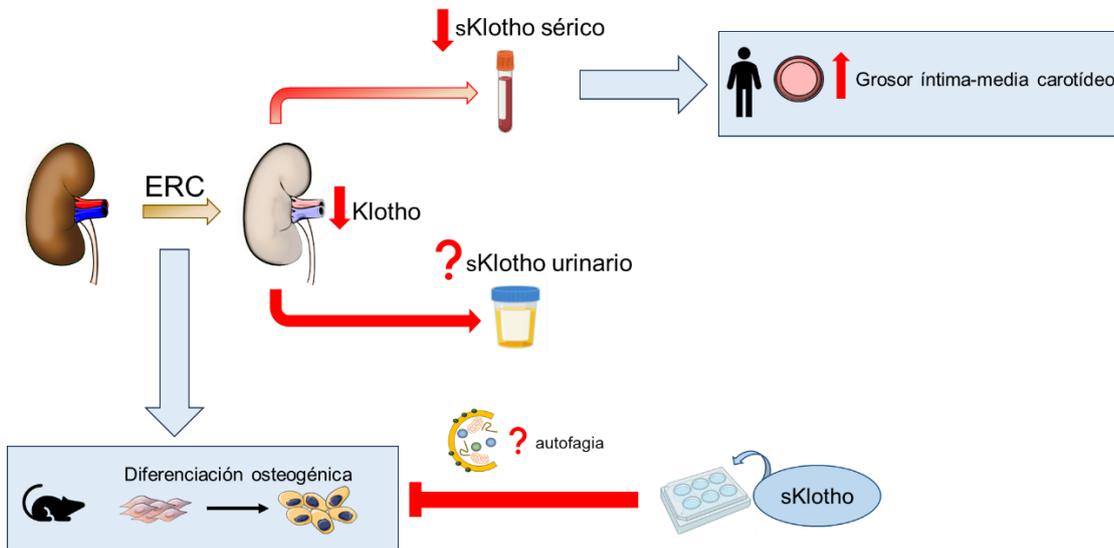
Al igual que el estudio en pacientes con ERC, el modelo de IRC en ratón no mostró correlación entre sKlotho sérico y urinario. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el estudio humano, el modelo de IRC en ratón mostró una reducción de sKlotho urinario en la IRC, lo que coincide con trabajos ya publicados (65, 116). Los resultados contradictorios acerca de sKlotho urinario en el estudio humano y en ratón ponen de manifiesto la complejidad técnica para evaluar sKlotho en orina, así como para interpretar sus valores (**Figura 26**).

### **sKlotho sérico y Klotho renal en un modelo de IRC en ratón**

El modelo de IRC en ratón permitió estudiar la expresión de Klotho renal, observándose una clara correlación positiva con los niveles de sKlotho en suero en los grupos IRC+PN e IRC+PA, indicando que sKlotho sérico fue un marcador preciso de la expresión de Klotho renal en la IRC. Sin embargo, sKlotho urinario no mostró asociación con la expresión de Klotho renal (**Figura 26**). Estos resultados reafirman nuestros hallazgos a nivel bioquímico y posicionan sKlotho sérico como un predictor de Klotho renal, pudiendo tener implicaciones en la práctica clínica, ya que una muestra de sangre sería suficiente para estimar la expresión renal de Klotho.

Este resultado podría parecer esperado, dado que el riñón es el principal órgano implicado en la síntesis de sKlotho (245). Sin embargo, en la ERC, el daño renal

podría alterar los mecanismos de eliminación de Klotho a través del riñón (104), como ha sido sugerido por otros autores (104, 246).



**Figura 26:** Esquema que integra los resultados del estudio en pacientes con ERC, modelo de IRC en ratón y modelo de calcificación *in vitro* en CMLV acerca del papel de sKlotho en la ERC. ERC, enfermedad renal crónica; sKlotho, Klotho soluble; CMLV, células de músculo liso vascular.

### **Daño renal en el modelo de IRC en ratón: vía de Wnt**

Los depósitos de calcio y la fibrosis renal aumentaron en la IRC. Además, los ratones de los grupos IRC presentaron mayor expresión génica de Dkk3, que participa en el proceso de fibrosis (44). Los ratones IRC+PA mostraron una vía de Wnt activa en el riñón, lo cual coincide con el aumento de depósitos de calcio y fibrosis, dado que la vía de Wnt está implicada en la formación de hueso y fibrosis (44, 247).

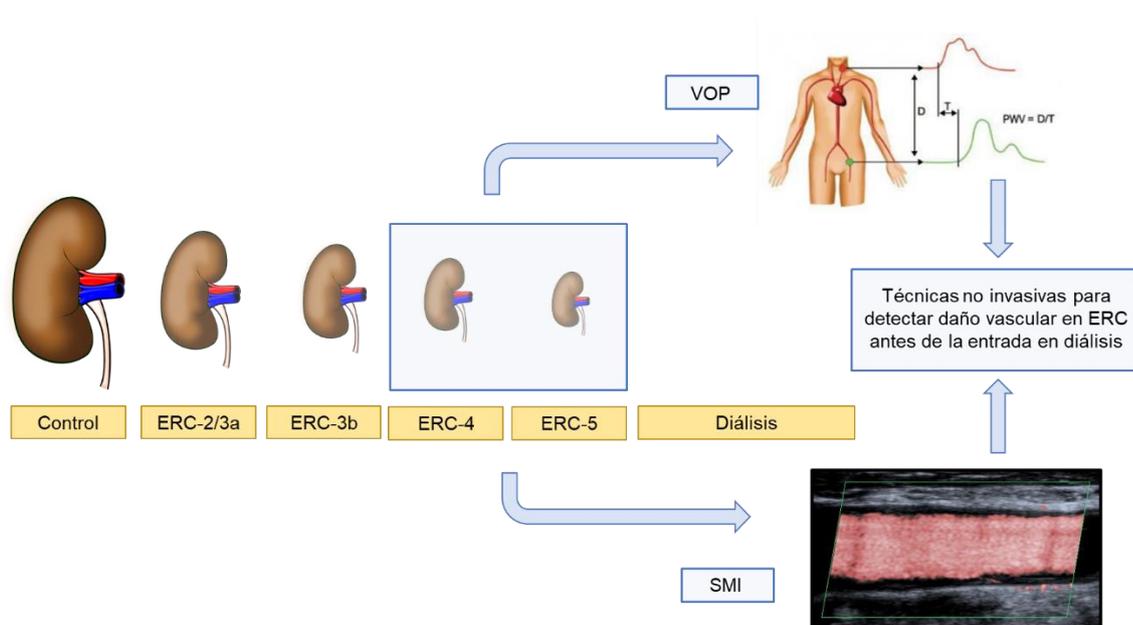
Sin embargo, el grupo IRC+PA también mostró mayor expresión génica de Sost y Dkk1, dos de los principales inhibidores de la vía de Wnt. Podría tratarse de un mecanismo de defensa para frenar la activación de la vía de Wnt y así reducir la calcificación y fibrosis renal, como ha sido propuesto con anterioridad (248).

## 2. Daño vascular y niveles de sKlotho en CKD-MBD

### Rigidez aórtica en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5

Como era de esperar, los pacientes con ERC presentaron presión arterial elevada (249). Los valores de VOP mostraron aumento de la rigidez aórtica únicamente en el estadio ERC-5, por lo que, en la cohorte estudiada, la VOP no parece ser la técnica más adecuada para detectar daño vascular en estadios tempranos de ERC. Sin embargo, sí permitiría detectar daño vascular y plantear medidas preventivas en pacientes con deterioro renal antes de entrar en diálisis, en los que el daño vascular es la primera causa de mortalidad (**Figura 27**). Otros estudios encontraron aumentos tempranos de la rigidez aórtica en la ERC, si bien la edad del grupo control y pacientes con ERC fue distinta (250) y la mayoría de ellos se llevaron a cabo en pacientes en diálisis (251, 252).

A pesar de que la VOP es la técnica de referencia para evaluar rigidez vascular, su uso no está extendido en la práctica clínica (253), por lo que haberla aplicado en pacientes con ERC es interesante y podría suponer una manera sencilla y no invasiva para detectar daño vascular en esta enfermedad, aunque su utilidad debe ser confirmada. De hecho, a nivel técnico, los valores de VOP presentan limitaciones, ya que existe variabilidad inter-operador (254), lo cual dificulta la comparación entre estudios.



**Figura 27:** Uso de las técnicas no invasivas VOP -evaluación de la rigidez aórtica- y SMI -detección de neovascularización de la capa adventicia- para detectar daño vascular en la ERC en etapas avanzadas de la enfermedad, pero antes de que el paciente entre en diálisis. ERC, enfermedad renal crónica; VOP, velocidad de onda de pulso y SMI, ecografía ultrasensible sin contraste para la detección de microflujo.

### Aterosclerosis, grosor íntima-media carotídeo y neovascularización de la capa adventicia en pacientes en estadios ERC-2/3a a ERC-5

Los pacientes con ERC presentaron mayor presencia de placas de ateroma, aunque sólo fue significativa en la arteria femoral, en consonancia con otros estudios (255). Además, en los pacientes con ERC, la presencia de placas de ateroma tanto en la arteria carótida como en la femoral fue en aumento con la progresión de la enfermedad, lo cual concuerda con otros trabajos (256-258).

Los pacientes con ERC presentaron un aumento progresivo del grosor íntima-media carotídeo que sólo alcanzó la significación estadística en el estadio ERC-5, a pesar de que en población general, el grosor íntima-media carotídeo es considerado un marcador temprano de aterosclerosis (259).

Es interesante destacar que el grosor íntima-media carotídeo fue el único parámetro de daño vascular evaluado que se asoció a los niveles de sKlotho sérico. En la ERC,

los pacientes con niveles más elevados de sKlotho sérico mostraron menor grosor íntima-media carotídeo (**Figura 26**). Esto significa que sKlotho sérico podría ser un biomarcador del aumento del grosor íntima-media carotídeo en la ERC, lo cual ayuda a confirmar estudios recientes (259-261). Los niveles de sKlotho urinario no se correlacionaron con ninguno de los tipos de daño vascular evaluados; además su posible papel biomarcador de daño vascular en la ERC apenas ha sido estudiado.

La técnica experimental SMI, una ecografía ultrasensible y no invasiva -al no requerir contraste- detectó la neovascularización de la capa adventicia en la arteria carótida. No se pudo evaluar la neovascularización de la arteria femoral debido a la alta presencia de artefactos en las imágenes, quizás derivados de la estructura curva de esta arteria (262). Se detectó un aumento de la neovascularización de la capa adventicia carotídea en el estadio ERC-4. Este resultado sugiere que la detección de la neovascularización de la capa adventicia mediante SMI no permitió el diagnóstico temprano de daño vascular en la ERC, aunque, al igual que se mencionó con la VOP, es interesante destacar la detección no invasiva del daño vascular en pacientes con ERC que aún no han entrado en diálisis (**Figura 26**). Sorprendentemente, en ERC-5 el aumento de la neovascularización de la capa adventicia carotídea no fue significativo. Si bien el menor tamaño muestral en ERC-5 respecto a ERC-4 pudo haber influido en esta pérdida de significación estadística, otra hipótesis de carácter fisiopatológico podría explicar la falta de aumento en la neovascularización en ERC-5 respecto del grupo control: dado que los pacientes en ERC-5 son los que presentaron mayor presencia de placas de ateroma, la calcificación de las mismas podría estar ocultando los neovasos que habrían promovido la formación de las placas.

Otros estudios encontraron que la neovascularización de la capa adventicia fue un marcador precoz de daño vascular y previo a la aterosclerosis. Sin embargo, estos trabajos utilizaron otras técnicas para detectar neovascularización, como la ecografía con contraste CEUS (183, 184), con el inconveniente de ser una técnica invasiva, y muy pocos están centrados en la neovascularización de la capa adventicia en la ERC (186).

Es interesante remarcar la correlación positiva encontrada entre la rigidez aórtica medida mediante VOP y la neovascularización de la capa adventicia carotídea medida mediante ecografía SMI. La correlación entre ambas técnicas aporta fiabilidad a la SMI para la detección de daño vascular, pudiendo suponer una potencial aplicación clínica, ya que el grado de neovascularización de la capa adventicia carotídea podría predecir la rigidez aórtica y viceversa.

Hay que destacar que el grupo control presentó valores elevados de rigidez aórtica, presencia de placas de ateroma, grosor íntima-media carotídeo y neovascularización de la capa adventicia carotídea, ya que la edad de los participantes, de media 65,5 años, ya supuso un riesgo de enfermedad cardiovascular asociado al envejecimiento (263-265), lo que pudo haber influido en la detección tardía del daño vascular mediante VOP y ecografía SMI en los pacientes con ERC.

Llamó la atención que la correlación positiva entre el IMC y la neovascularización de la capa adventicia carotídea observada en el grupo control no se encontrase en los pacientes con ERC, dado que un IMC elevado se asocia a mayor riesgo cardiovascular en población general (266). Este resultado pone de manifiesto la multitud de factores implicados en la ERC y que han hecho perder peso al IMC como predictor de daño vascular. Además, varios autores han observado que en la ERC, los individuos con mayor IMC presentaron, curiosamente, menor riesgo cardiovascular y mortalidad asociada (267-269).

### **Diferenciación osteogénica en un modelo de IRC en ratón**

Los ratones del modelo de IRC no mostraron calcificación vascular, ya que estos animales presentan resistencia a la calcificación vascular y es necesario un gran estímulo de daño o bien el uso de modelos específicos -como los ratones ApoE- para inducirla (270, 271).

Sin embargo, los grupos con IRC presentaron pérdida de expresión génica de  $\alpha$ -actina -marcador de contractilidad vascular- y Sost -inhibidor de la vía de Wnt- en aorta. La menor expresión de este inhibidor de la vía de Wnt podría implicar una vía de Wnt más activa y por lo tanto tendencia a la calcificación. Estos resultados

muestran diferenciación osteogénica en aorta, que representa el daño previo a la calcificación vascular (90, 272).

No hubo asociación entre sKlotho sérico ni urinario con la expresión génica de la  $\alpha$ -actina en aorta en el grupo de referencia ni en la IRC. Este resultado sugiere que sKlotho no reflejó adecuadamente el proceso de diferenciación osteogénica -daño vascular temprano- en este modelo de IRC, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo.

### 3. Alteraciones óseas en un modelo de IRC en ratón

Los marcadores séricos de remodelado óseo P1NP y CTX-I aumentaron en los ratones IRC+PN, indicando mayor formación y resorción ósea, en consonancia con estudios previos (234). Sin embargo, el grupo IRC+PA mostró un aumento de P1NP, pero no mostró cambios en CTX-I, indicando un incremento de la formación ósea, pero no de la resorción. Este resultado sugiere que en el hueso, el fósforo alteró la respuesta provocada por la IRC.

En cuanto a los niveles séricos de los marcadores moleculares de la vía de RANK/RANKL/OPG, RANKL tendió a disminuir en la IRC, mientras que OPG presentó una tendencia al aumento. Estos resultados sugieren una posible respuesta de defensa para proteger el hueso de los efectos de la IRC, aunque no está claro cómo se alteran los niveles séricos de estos marcadores en la ERC. El aumento de OPG podría estar asociado a calcificación vascular (273, 274) y osteoporosis (275) y se han encontrado niveles elevados de RANKL sérico en la ERC (276).

En los ratones IRC, el incremento de la superficie osteoblástica y la superficie y volumen de osteoide indica que la IRC provocó una respuesta de formación ósea a nivel trabecular, lo que va en consonancia con los marcadores séricos P1NP y CTX-I, así como con los cambios posiblemente protectores en los niveles séricos de RANKL y OPG. Sin embargo, este efecto de formación de hueso trabecular en la IRC desapareció con la dieta con alto contenido en fósforo. Este resultado sugiere que el fósforo influyó en la actividad ósea. De hecho, recientemente se mostró, en pacientes

en hemodiálisis, una asociación entre el fósforo sérico y mayor riesgo de fracturas por fragilidad (277). Es posible que, en los ratones IRC+PA, la mayor cantidad de fósforo disponible permitiera la mineralización ósea, aunque ésta pudiera ser defectuosa.

Respecto al hueso cortical, el grupo IRC+PN mostró mayor tendencia a la porosidad y menor grosor y volumen. En el grupo IRC+PA, el hueso cortical presentó una porosidad significativamente más elevada, así como un menor grosor y volumen respecto a los ratones IRC+PN, lo que indica que el efecto de la dieta con alto contenido en fósforo se unió al efecto de resorción ósea provocado por la IRC. Esta respuesta no coincidió con los cambios observados en los marcadores séricos, pero hay que tener en cuenta que éstos ofrecen información puntual, mientras que la microarquitectura ósea informa de cambios acumulados en el tiempo.

Estos resultados mostraron el distinto comportamiento del hueso cortical y trabecular, ya que no respondieron de la misma manera ante la dieta con alto contenido en fósforo en la IRC. Mientras que el hueso cortical está más expuesto al efecto de la PTH y se daña en primer lugar (87, 278), el hueso trabecular tarda más en verse afectado por la IRC y presenta mayor actividad metabólica (12).

En la IRC, sKlotho sérico y urinario no se correlacionaron con los parámetros óseos estudiados, lo que sugiere que sKlotho no sería un biomarcador de las alteraciones óseas en la ERC. Sin embargo, existen estudios clínicos en ERC que han asociado los niveles reducidos de sKlotho sérico con alteraciones de la microarquitectura ósea (279) y mayor tasa de fracturas por fragilidad (280). Un estudio experimental reciente asoció los niveles reducidos de sKlotho urinario con menor área trabecular (281), pero el papel de sKlotho urinario como posible biomarcador de alteraciones óseas apenas ha sido investigado.

#### 4. sKlotho y daño vascular: posibles mecanismos implicados

La autofagia se ha propuesto como mecanismo de defensa frente a la calcificación vascular en la ERC (168, 282) y varios estudios han mostrado que sKlotho indujo autofagia en distintos tejidos (109, 283). Dado que el modelo de IRC en ratón presentó valores reducidos de sKlotho en la IRC, se pretendió investigar la posible interacción entre sKlotho y autofagia en la vasculatura.

La aorta de los ratones IRC+PA presentó mayor autofagia, lo cual podría implicar una posible respuesta de defensa para frenar el daño vascular -en este caso diferenciación osteogénica-, de manera similar a lo sugerido en otros trabajos (168, 282).

Los experimentos *in vitro* mostraron que, en condiciones calcificantes durante 72 horas, sKlotho previno el depósito de calcio extracelular, el aumento de expresión génica de Osterix y la reducción de  $\alpha$ -actina y Sost. Este resultado muestra que, en un modelo *in vitro* de 72 horas, sKlotho previno la diferenciación osteogénica.

Además, se observó que, en 24 horas, sKlotho incrementó la autofagia en condiciones calcificantes, lo que sugiere que la autofagia podría ser uno de los mecanismos de acción de sKlotho frente a la diferenciación osteogénica (**Figura 26**). Este resultado sigue la misma línea que otros efectos beneficiosos atribuidos a sKlotho, como la acción pro-autofágica en corazón y riñón (109), acciones anti-apoptóticas y anti-senescentes en células endoteliales (107, 108), reducción de la calcificación vascular inducida por la hiperfosfatemia (65, 66) o protección cardiaca (111-113).

Desafortunadamente, la autofagia es un proceso muy rápido y fluctuante en el tiempo (159), por lo que no fue posible evaluar autofagia a las 72 horas de cultivo, cuando las CMLV ya presentaban diferenciación osteogénica y sKlotho la previno. Este trabajo sugiere que la autofagia podría ser un mecanismo de acción de sKlotho para

su función protectora frente a la diferenciación osteogénica, pero son necesarios nuevos enfoques y experimentos para confirmar la hipótesis.

## **Limitaciones y fortalezas del estudio**

Este estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, los resultados de los pacientes con ERC y del modelo de IRC en ratón son sólo parcialmente extrapolables, ya que sKlotho urinario mostró tendencias opuestas en estos dos modelos. Además, debido a la escasez de suero en el caso del modelo en ratón y por la complejidad que implican otras técnicas de detección de sKlotho en suero y orina, como la inmunoprecipitación, no fue posible validar los niveles de sKlotho con otra técnica distinta al ELISA. En el estudio en pacientes con ERC, la elevada media de edad de los participantes pudo haber enmascarado parte del daño vascular que se esperaba detectar en estadios tempranos de la enfermedad, si bien la detección tardía del daño vascular pone de manifiesto el buen mantenimiento de los pacientes con ERC por parte del Servicio de Nefrología del HUCA. Finalmente, hubiera sido interesante contrastar la detección de la neovascularización de la capa adventicia por SMI con una técnica ecográfica estándar, como el CEUS.

A pesar de las limitaciones mencionadas, esta tesis presenta fortalezas. Tanto en el estudio en pacientes con ERC como en el modelo de IRC en ratón se midió sKlotho sérico y urinario para contrastar su potencial utilidad como biomarcador de CKD-MBD en ambos tipos de muestra. Además, en pacientes con ERC se investigó la utilidad de la VOP y ecografía SMI, dos técnicas de manejo sencillo y no invasivas no utilizadas en la práctica clínica habitual. Finalmente, el estudio en pacientes con ERC ofreció una perspectiva traslacional interesante que confirmó la mayor utilidad de sKlotho sérico frente a sKlotho urinario como biomarcador de CKD-MBD.

**RETOS PARA EL FUTURO**



- Investigar el mecanismo de eliminación de sKlotho a través de la orina para interpretar correctamente los niveles de sKlotho urinario en la ERC.
- Desarrollar ensayos de ELISA y estandarizar las técnicas de procesamiento de muestras y evaluación de sKlotho en suero y orina para realizar análisis precisos que faciliten la comparación entre estudios.
- Evaluar el daño vascular mediante VOP y SMI en una cohorte joven de ERC, para descartar el efecto de la edad.
- Profundizar en el papel del fósforo sobre el remodelado óseo en la ERC.
- Investigar el mecanismo de acción de sKlotho y autofagia sobre la calcificación vascular.



**CONCLUSIONES**



1. sKlotho sérico fue un marcador temprano de CKD-MBD, pero sus niveles no se asociaron con la progresión de la ERC. Por el contrario, FGF23 fue útil para seguir la evolución de la ERC.
2. Los niveles de sKlotho en suero y orina no siguieron un mismo patrón de evolución, si no que varió según el modelo de ERC utilizado.
3. Según los resultados de este estudio clínico-experimental, sKlotho sérico y urinario deberían interpretarse con precaución e individualmente, dado que sus niveles no mostraron correlación.
4. sKlotho sérico reflejó de forma precisa la expresión de Klotho renal. Por el contrario, sKlotho urinario no mostró correlación con la expresión de Klotho en riñón.
5. Las técnicas utilizadas para evaluar daño vascular en ERC detectaron aumentos de rigidez aórtica (VOP) y neovascularización de la capa adventicia carotídea (ecografía SMI) únicamente en estadios avanzados de ERC. Aun así, estas técnicas podrían tener relevancia en la práctica clínica, al detectar daño vascular de manera sencilla y no invasiva en pacientes con ERC antes de entrar en diálisis.
6. En pacientes con ERC, la reducción de sKlotho sérico se asoció con aumento del grosor íntima-media carotídeo, hecho que sugiere que sKlotho sérico podría ser un biomarcador de daño vascular temprano en ERC.
7. En un modelo de IRC en ratón, el exceso de fósforo parece alterar el remodelado óseo de forma diferente en el hueso cortical y trabecular.
8. En un modelo *in vitro* de calcificación vascular, sKlotho previno la diferenciación osteogénica de CMLV. La autofagia podría ser un posible mecanismo de acción de sKlotho implicado en este proceso

1. Serum sKlotho was an early CKD-MBD biomarker, but it was not associated with CKD-MBD progression. However, FGF23 was useful to follow CKD-MBD.
2. Serum and urinary sKlotho levels were differentially altered in CKD, depending on the CKD model studied.
3. According to this clinical-experimental study, serum and urinary sKlotho should be interpreted carefully and individually, as their values were not correlated.
4. Serum sKlotho accurately predicted kidney Klotho expression. On the other hand, urinary sKlotho did not show correlation with kidney Klotho.
5. The techniques which assessed vascular damage in CKD detected higher aortic stiffness (pulse wave velocity) and carotid adventitial neovascularization (SMI ultrasound) in advanced CKD stages. Nevertheless, these tools could be relevant in the clinical practice, as they diagnosed vascular damage in a simple and non-invasive manner in CKD patients before entering dialysis.
6. In CKD patients, serum sKlotho reduction was associated with higher carotid intima-media thickness, suggesting that serum sKlotho could be a biomarker of early vascular damage in CKD.
7. In a CKD mouse model, excessive phosphorus seems to differentially alter cortical and trabecular bone remodeling.
8. In an *in vitro* model of vascular calcification, sKlotho prevented vascular smooth muscle cell osteogenic differentiation. Autophagy could be a possible mechanism to explain sKlotho actions on the vasculature.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Avendaño LH. Nefrología Clínica. 3ª edición ed: Editorial Médica Panamericana; 2008.
2. Richard J. Johnson JF, Jurgen Floege. Comprehensive clinical nephrology. 5ª edición ed: Elsevier sounders; 2015.
3. Bankir L, Bichet DG, Morgenthaler NG. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *J Intern Med.* 2017;282(4):284-97.
4. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 1987;237(4812):268-75.
5. Thomas W, Harvey BJ. Mechanisms underlying rapid aldosterone effects in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:335-57.
6. Choi MR, Fernandez BE. Protective Renal Effects of Atrial Natriuretic Peptide: Where Are We Now? *Front Physiol.* 2021;12:680213.
7. Song L. Calcium and Bone Metabolism Indices. *Adv Clin Chem.* 2017;82:1-46.
8. Levey AS, Inker LA. Assessment of Glomerular Filtration Rate in Health and Disease: A State of the Art Review. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(3):405-19.
9. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-52.
10. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V. Chronic kidney disease. *Lancet.* 2021;398(10302):786-802.
11. Evans M, Lewis RD, Morgan AR, Whyte MB, Hanif W, Bain SC, et al. A Narrative Review of Chronic Kidney Disease in Clinical Practice: Current Challenges and Future Perspectives. *Adv Ther.* 2022;39(1):33-43.
12. Cannata-Andia JB, Martin-Carro B, Martin-Virgala J, Rodriguez-Carrio J, Bande-Fernandez JJ, Alonso-Montes C, et al. Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders: Pathogenesis and Management. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(4):410-22.
13. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international.* 2006;69(11):1945-53.
14. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney international.* 2017;92(1):26-36.

15. Komaba H, Tanaka M, Fukagawa M. Treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Intern Med.* 2008;47(11):989-94.
16. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326(5957):1216-9.
17. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801.
18. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(12).
19. Panizo S, Martinez-Arias L, Alonso-Montes C, Cannata P, Martin-Carro B, Fernandez-Martin JL, et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1).
20. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17088.
21. Picard N, Baum O, Vogetseder A, Kaissling B, Le Hir M. Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(1):141-55.
22. Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney international.* 2000;57(4):1521-38.
23. Hutchison N, Fligny C, Duffield JS. Resident mesenchymal cells and fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):962-71.
24. Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Bottinger EP. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl.* 2000;77:S45-52.
25. Chauvin C, Bayry J. Basophils orchestrate kidney fibrosis. *Cell Res.* 2022;32(8):713-4.
26. Yin Q, Liu H. Connective Tissue Growth Factor and Renal Fibrosis. *Advances in experimental medicine and biology.* 2019;1165:365-80.
27. Tan RJ, Zhou D, Zhou L, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011).* 2014;4(1):84-90.
28. Zhou D, Tan RJ, Zhou L, Li Y, Liu Y. Kidney tubular beta-catenin signaling controls interstitial fibroblast fate via epithelial-mesenchymal communication. *Scientific reports.* 2013;3:1878.
29. Maarouf OH, Aravamudhan A, Rangarajan D, Kusaba T, Zhang V, Welborn J, et al. Paracrine Wnt1 Drives Interstitial Fibrosis without Inflammation by

- Tubulointerstitial Cross-Talk. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(3):781-90.
30. Lin SL, Li B, Rao S, Yeo EJ, Hudson TE, Nowlin BT, et al. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4194-9.
  31. Nikolic-Paterson DJ, Wang S, Lan HY. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney Int Suppl (2011)*. 2014;4(1):34-8.
  32. Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985-99.
  33. Bisson SK, Ung RV, Mac-Way F. Role of the Wnt/beta-Catenin Pathway in Renal Osteodystrophy. *International journal of endocrinology*. 2018;2018:5893514.
  34. Baetta R, Banfi C. Dkk (Dickkopf) Proteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2019;39(7):1330-42.
  35. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(29):26770-5.
  36. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*. 1998;391(6665):357-62.
  37. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;42(4):606-15.
  38. Federico G, Meister M, Mathow D, Heine GH, Moldenhauer G, Popovic ZV, et al. Tubular Dickkopf-3 promotes the development of renal atrophy and fibrosis. *JCI Insight*. 2016;1(1):e84916.
  39. Lipphardt M, Dihazi H, Jeon NL, Dadafarin S, Ratliff BB, Rowe DW, et al. Dickkopf-3 in aberrant endothelial secretome triggers renal fibroblast activation and endothelial-mesenchymal transition. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2019;34(1):49-62.
  40. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science*. 2007;317(5839):803-6.
  41. Mirza SB, Ekhteiri Salmas R, Fatmi MQ, Durdagi S. Discovery of Klotho peptide antagonists against Wnt3 and Wnt3a target proteins using combination of protein engineering, protein-protein docking, peptide docking and molecular dynamics simulations. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):84-98.

42. Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;303(12):F1641-51.
43. Miao J, Liu J, Niu J, Zhang Y, Shen W, Luo C, et al. Wnt/beta-catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*. 2019;18(5):e13004.
44. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T. WNT-beta-catenin signalling - a versatile player in kidney injury and repair. *Nature reviews Nephrology*. 2021;17(3):172-84.
45. Li Z, Zhou L, Wang Y, Miao J, Hong X, Hou FF, et al. (Pro)renin Receptor Is an Amplifier of Wnt/beta-Catenin Signaling in Kidney Injury and Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(8):2393-408.
46. Surendran K, Schiavi S, Hruska KA. Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(8):2373-84.
47. Hao S, He W, Li Y, Ding H, Hou Y, Nie J, et al. Targeted inhibition of  $\beta$ -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(9):1642-53.
48. He X, Cheng R, Park K, Benyajati S, Moiseyev G, Sun C, et al. Pigment epithelium-derived factor, a noninhibitory serine protease inhibitor, is renoprotective by inhibiting the Wnt pathway. *Kidney international*. 2017;91(3):642-57.
49. Marreiros C, Viegas C, Simes D. Targeting a Silent Disease: Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24).
50. Mortensen MB, Falk E. Limitations of the SCORE-guided European guidelines on cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*. 2017;38(29):2259-63.
51. Marinelli A, Pistolesi V, Pasquale L, Di Lullo L, Ferrazzano M, Baudena G, et al. Diagnosis of Arterial Media Calcification in Chronic Kidney Disease. *Cardiorenal Med*. 2013;3(2):89-95.
52. Milan A, Zocaro G, Leone D, Tosello F, Buraioli I, Schiavone D, et al. Current assessment of pulse wave velocity: comprehensive review of validation studies. *J Hypertens*. 2019;37(8):1547-57.
53. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis*. 1997;132(2):245-50.
54. Adragao T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Goncalves M, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis

- patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2004;19(6):1480-8.
55. Vannucci L, Fossi C, Quattrini S, Guasti L, Pampaloni B, Gronchi G, et al. Calcium Intake in Bone Health: A Focus on Calcium-Rich Mineral Waters. *Nutrients*. 2018;10(12).
  56. Mikaelsson ME. *Coagulation and Blood Transfusion*: Springer New York, NY; 1991.
  57. Dusso AS, Tokumoto M. Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney international*. 2011;79(7):715-29.
  58. Goodman WG, Veldhuis JD, Belin TR, Van Herle AJ, Juppner H, Salusky IB. Calcium-sensing by parathyroid glands in secondary hyperparathyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(8):2765-72.
  59. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney international*. 2007;71(1):31-8.
  60. Bover J, Arana C, Urena P, Torres A, Martin-Malo A, Fayos L, et al. Hyporesponsiveness or resistance to the action of parathyroid hormone in chronic kidney disease. *Nefrologia (Engl Ed)*. 2021;41(5):514-28.
  61. Peacock M. Phosphate Metabolism in Health and Disease. *Calcif Tissue Int*. 2021;108(1):3-15.
  62. Agoro R, Ni P, Noonan ML, White KE. Osteocytic FGF23 and Its Kidney Function. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:592.
  63. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):386-95.
  64. Barthel TK, Mathern DR, Whitfield GK, Haussler CA, Hopper HAt, Hsieh JC, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103(3-5):381-8.
  65. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(1):124-36.
  66. Hum JM, O'Bryan LM, Tatiparthi AK, Cass TA, Clinkenbeard EL, Cramer MS, et al. Chronic Hyperphosphatemia and Vascular Calcification Are Reduced by

- Stable Delivery of Soluble Klotho. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(4):1162-74.
67. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, et al. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(7):2116-24.
68. Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, Densmore MJ, Taguchi T, Goetz R, et al. In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23)-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(2):433-41.
69. Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(3):229-37.
70. Faul C, Amaral AP, Oskoueï B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(11):4393-408.
71. Hu MC, Shi M, Cho HJ, Adams-Huet B, Paek J, Hill K, et al. Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(6):1290-302.
72. Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(1):50-2.
73. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.
74. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(4):561-8.
75. Stenvinkel P, Larsson TE. Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(2):339-51.
76. Kuro OM. The Klotho proteins in health and disease. *Nature reviews Nephrology*. 2019;15(1):27-44.
77. Santamaria R, Almaden Y, Felsenfeld A, Martin-Malo A, Gao P, Cantor T, et al. Dynamics of PTH secretion in hemodialysis patients as determined by the intact and whole PTH assays. *Kidney international*. 2003;64(5):1867-73.

78. Roussanne MC, Lieberherr M, Souberbielle JC, Sarfati E, Druke T, Bourdeau A. Human parathyroid cell proliferation in response to calcium, NPS R-467, calcitriol and phosphate. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(7):610-6.
79. Druke TB. Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
80. Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Goureau Y, Sarfati E, et al. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney international*. 1997;51(1):328-36.
81. Brown AJ, Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA. Decreased calcium-sensing receptor expression in hyperplastic parathyroid glands of uremic rats: role of dietary phosphate. *Kidney international*. 1999;55(4):1284-92.
82. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(2):235-44.
83. Ben-awadh AN, Delgado-Calle J, Tu X, Kuhlenschmidt K, Allen MR, Plotkin LI, et al. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology*. 2014;155(8):2797-809.
84. Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(50):48868-75.
85. Carrillo-Lopez N, Martinez-Arias L, Alonso-Montes C, Martin-Carro B, Martin-Virgala J, Ruiz-Ortega M, et al. The receptor activator of nuclear factor kappaBeta ligand receptor leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 contributes to parathyroid hormone-induced vascular calcification. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2021;36(4):618-31.
86. Neves KR, Gracioli FG, dos Reis LM, Gracioli RG, Neves CL, Magalhaes AO, et al. Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney international*. 2007;71(12):1262-70.
87. Carrillo-Lopez N, Panizo S, Alonso-Montes C, Martinez-Arias L, Avello N, Sosa P, et al. High-serum phosphate and parathyroid hormone distinctly regulate bone loss and vascular calcification in experimental chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2018.

88. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;22:41-50.
89. Rodriguez Garcia M, Naves Diaz M, Cannata Andia JB. Bone metabolism, vascular calcifications and mortality: associations beyond mere coincidence. *J Nephrol*. 2005;18(4):458-63.
90. Cannata-Andia JB, Roman-Garcia P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(11):3429-36.
91. Asci G, Ok E, Savas R, Ozkahya M, Duman S, Toz H, et al. The link between bone and coronary calcifications in CKD-5 patients on haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(3):1010-5.
92. Martinez-Arias L, Panizo S, Alonso-Montes C, Martin-Virgala J, Martin-Carro B, Fernandez-Villabrille S, et al. Effects of calcitriol and paricalcitol on renal fibrosis in CKD. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2021;36(5):793-803.
93. Carrillo-Lopez N, Panizo S, Arcidiacono MV, de la Fuente S, Martinez-Arias L, Ottaviano E, et al. Vitamin D Treatment Prevents Uremia-Induced Reductions in Aortic microRNA-145 Attenuating Osteogenic Differentiation despite Hyperphosphatemia. *Nutrients*. 2022;14(13).
94. Panizo S, Barrio-Vazquez S, Naves-Diaz M, Carrillo-Lopez N, Rodriguez I, Fernandez-Vazquez A, et al. Vitamin D receptor activation, left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(11):2735-44.
95. Bon N, Frangi G, Sourice S, Guicheux J, Beck-Cormier S, Beck L. Phosphate-dependent FGF23 secretion is modulated by PiT2/Slc20a2. *Mol Metab*. 2018;11:197-204.
96. Takashi Y, Kosako H, Sawatsubashi S, Kinoshita Y, Ito N, Tsoumpra MK, et al. Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(23):11418-27.
97. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(10):6120-3.
98. Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, et al. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of

- the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*. 2004;145(7):3087-94.
99. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone*. 2009;45(6):1161-8.
  100. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutierrez OM, Scialla J, Xie H, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney international*. 2011;79(12):1370-8.
  101. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2008;359(6):584-92.
  102. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab*. 2015;22(6):1020-32.
  103. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005;309(5742):1829-33.
  104. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating alphaKlotho. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(1):79-90.
  105. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, et al. Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett*. 2009;583(19):3221-4.
  106. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):8655-65.
  107. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, et al. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine*. 2009;35(3):341-6.
  108. Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca<sup>2+</sup> channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(45):19308-13.
  109. Fernández Á F, Sebti S, Wei Y, Zou Z, Shi M, McMillan KL, et al. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*. 2018;558(7708):136-40.

110. Chen B, Wang X, Zhao W, Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29(1):99.
111. Xie J, Yoon J, An SW, Kuro-o M, Huang CL. Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2015;26(5):1150-60.
112. Chen K, Wang S, Sun QW, Zhang B, Ullah M, Sun Z. Klotho Deficiency Causes Heart Aging via Impairing the Nrf2-GR Pathway. *Circulation research.* 2021;128(4):492-507.
113. Suassuna PGA, Cherem PM, de Castro BB, Maquigussa E, Cenedeze MA, Lovisi JCM, et al. alphaKlotho attenuates cardiac hypertrophy and increases myocardial fibroblast growth factor 21 expression in uremic rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245(1):66-78.
114. Yu LX, Li SS, Sha MY, Kong JW, Ye JM, Liu QF. The controversy of klotho as a potential biomarker in chronic kidney disease. *Front Pharmacol.* 2022;13:931746.
115. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney international.* 2010;78(12):1240-51.
116. Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, Numata A, Yamazaki T, Takeshima E, et al. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC nephrology.* 2012;13:155.
117. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, Wagner CA, Petzold K, Spichtig D, et al. Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2013;28(2):352-9.
118. Kim HR, Nam BY, Kim DW, Kang MW, Han JH, Lee MJ, et al. Circulating alpha-klotho levels in CKD and relationship to progression. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(6):899-909.
119. Zou D, Wu W, He Y, Ma S, Gao J. The role of klotho in chronic kidney disease. *BMC nephrology.* 2018;19(1):285.
120. Neyra JA, Hu MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone.* 2017;100:41-9.
121. Fernandez-Fernandez B, Izquierdo MC, Valino-Rivas L, Nastou D, Sanz AB, Ortiz A, et al. Albumin downregulates Klotho in tubular cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2018;33(10):1712-22.

122. Torregrosa I, Montoliu C, Urios A, Gimenez-Garzo C, Tomas P, Solis MA, et al. Urinary Klotho measured by ELISA as an early biomarker of acute kidney injury in patients after cardiac surgery or coronary angiography. *Nefrologia*. 2015;35(2):172-8.
123. Aitken MJL, Ravandi F, Patel KP, Short NJ. Prognostic and therapeutic implications of measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):137.
124. Kuro OM. Phosphate and Klotho. *Kidney Int Suppl*. 2011;79(121):S20-3.
125. Seiler S, Wen M, Roth HJ, Fehrenz M, Flugge F, Herath E, et al. Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. *Kidney international*. 2013;83(1):121-8.
126. Cano FJ, Freundlich M, Ceballos ML, Rojo AP, Azocar MA, Delgado IO, et al. Longitudinal FGF23 and Klotho axis characterization in children treated with chronic peritoneal dialysis. *Clin Kidney J*. 2014;7(5):457-63.
127. Devaraj S, Syed B, Chien A, Jialal I. Validation of an immunoassay for soluble Klotho protein: decreased levels in diabetes and increased levels in chronic kidney disease. *American journal of clinical pathology*. 2012;137(3):479-85.
128. Navarro-Gonzalez JF, Sanchez-Nino MD, Donate-Correa J, Martin-Nunez E, Ferri C, Perez-Delgado N, et al. Effects of Pentoxifylline on Soluble Klotho Concentrations and Renal Tubular Cell Expression in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Care*. 2018;41(8):1817-20.
129. Heijboer AC, Blankenstein MA, Hoenderop J, de Borst MH, Vervloet MG, consortium N. Laboratory aspects of circulating alpha-Klotho. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(9):2283-7.
130. Barker SL, Pastor J, Carranza D, Quinones H, Griffith C, Goetz R, et al. The demonstration of alphaKlotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2015;30(2):223-33.
131. Neyra JA, Moe OW, Pastor J, Gianella F, Sidhu SS, Sarnak MJ, et al. Performance of soluble Klotho assays in clinical samples of kidney disease. *Clin Kidney J*. 2020;13(2):235-44.
132. Adema AY, Vervloet MG, Blankenstein MA, Heijboer AC. alpha-Klotho is unstable in human urine. *Kidney international*. 2015;88(6):1442-4.
133. Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, et al. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney international*. 2011;80(1):93-104.

134. Perkovic V, Verdon C, Ninomiya T, Barzi F, Cass A, Patel A, et al. The relationship between proteinuria and coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2008;5(10):e207.
135. Masson P, Webster AC, Hong M, Turner R, Lindley RI, Craig JC. Chronic kidney disease and the risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2015;30(7):1162-9.
136. Di Angelantonio E, Danesh J, Eiriksdottir G, Gudnason V. Renal function and risk of coronary heart disease in general populations: new prospective study and systematic review. *PLoS Med.* 2007;4(9):e270.
137. Roman-Garcia P, Rodriguez-Garcia M, Cabezas-Rodriguez I, Lopez-Ongil S, Diaz-Lopez B, Cannata-Andia JB. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis. *Med Princ Pract.* 2011;20(3):203-12.
138. Perello J, Ferrer MD, Del Mar Perez M, Kaesler N, Brandenburg VM, Behets GJ, et al. Mechanism of action of SNF472, a novel calcification inhibitor to treat vascular calcification and calciphylaxis. *Br J Pharmacol.* 2020;177(19):4400-15.
139. Raggi P, Bellasi A, Bushinsky D, Bover J, Rodriguez M, Ketteler M, et al. Slowing Progression of Cardiovascular Calcification With SNF472 in Patients on Hemodialysis: Results of a Randomized Phase 2b Study. *Circulation.* 2020;141(9):728-39.
140. Partovi S, Loebe M, Noon GP, Davies MG, Karimi S, Zipp L, et al. Detection of adventitial vasa vasorum and intraplaque neovascularization in carotid atherosclerotic lesions with contrast-enhanced ultrasound and their role in atherosclerosis. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2011;7(4):37-40.
141. Taylor AM, Bordoni B. Histology, Blood Vascular System. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2022.
142. Rodriguez-Garcia M, Gomez-Alonso C, Naves-Diaz M, Diaz-Lopez JB, Diaz-Corte C, Cannata-Andia JB, et al. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2009;24(1):239-46.
143. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney international.* 2006;69(8):1464-70.
144. O'Neill WC, Lomashvili KA. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney international.* 2010;78(12):1232-9.
145. Villa-Bellosta R. New insights into endogenous mechanisms of protection against arterial calcification. *Atherosclerosis.* 2020;306:68-74.

146. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2004;15(11):2857-67.
147. Cannata-Andia JB, Rodriguez-Garcia M, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, Diaz-Lopez B. Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2006;17(12 Suppl 3):S267-73.
148. Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H, Burger D, Chignalia AZ, Wadhera V, et al. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium. *Hypertension.* 2010;56(3):453-62.
149. Mune S, Shibata M, Hatamura I, Saji F, Okada T, Maeda Y, et al. Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis. *Clin Exp Nephrol.* 2009;13(6):571-7.
150. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost.* 2010;104(3):464-70.
151. Freise C, Kretzschmar N, Querfeld U. Wnt signaling contributes to vascular calcification by induction of matrix metalloproteinases. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16(1):185.
152. Yang CY, Chang ZF, Chau YP, Chen A, Yang WC, Yang AH, et al. Circulating Wnt/beta-catenin signalling inhibitors and uraemic vascular calcifications. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2015;30(8):1356-63.
153. De Mare A, Opdebeeck B, Neven E, D'Haese PC, Verhulst A. Sclerostin Protects Against Vascular Calcification Development in Mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2022;37(4):687-99.
154. Zeng C, Guo C, Cai J, Tang C, Dong Z. Serum sclerostin in vascular calcification and clinical outcome in chronic kidney disease. *Diab Vasc Dis Res.* 2018;15(2):99-105.
155. Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schafer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circulation research.* 2011;108(12):1494-509.
156. Mori K, Emoto M, Inaba M. Fetuin-A and the cardiovascular system. *Adv Clin Chem.* 2012;56:175-95.

157. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
158. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2010;90(4):1383-435.
159. Gottlieb RA, Andres AM, Sin J, Taylor DP. Untangling autophagy measurements: all fluxed up. *Circulation research*. 2015;116(3):504-14.
160. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-95.
161. Kim MS, Song SY, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers. *APMIS*. 2011;119(11):802-7.
162. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*. 2011;25(7):717-29.
163. Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2010;13(7):805-11.
164. Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity*. 2021;54(3):437-53.
165. Kirshenbaum LA. Regulation of autophagy in the heart in health and disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;60(2):109.
166. Peng YQ, Xiong D, Lin X, Cui RR, Xu F, Zhong JY, et al. Oestrogen Inhibits Arterial Calcification by Promoting Autophagy. *Scientific reports*. 2017;7(1):3549.
167. Hsu YJ, Hsu SC, Huang SM, Lee HS, Lin SH, Tsai CS, et al. Hyperphosphatemia induces protective autophagy in endothelial cells through the inhibition of Akt/mTOR signaling. *J Vasc Surg*. 2015;62(1):210-21 e2.
168. Frauscher B, Kirsch AH, Schabhuttl C, Schweighofer K, Ketszeri M, Pollheimer M, et al. Autophagy Protects From Uremic Vascular Media Calcification. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1866.
169. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):590-600.
170. Johri AM, Nambi V, Naqvi TZ, Feinstein SB, Kim ESH, Park MM, et al. Recommendations for the Assessment of Carotid Arterial Plaque by Ultrasound for the Characterization of Atherosclerosis and Evaluation of Cardiovascular Risk: From the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2020;33(8):917-33.

171. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34(4):290-6.
172. Verbeke F, Van Biesen W, Honkanen E, Wikstrom B, Jensen PB, Krzesinski JM, et al. Prognostic value of aortic stiffness and calcification for cardiovascular events and mortality in dialysis patients: outcome of the calcification outcome in renal disease (CORD) study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2011;6(1):153-9.
173. Wilson PW, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, et al. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation.* 2001;103(11):1529-34.
174. Zorzi A, Brunetti G, Cardaioli F, D'Arcangelo F, Fabris T, Gambato M, et al. Coronary artery calcium on standard chest computed tomography predicts cardiovascular events after liver transplantation. *Int J Cardiol.* 2021;339:219-24.
175. Ota K, Nakanishi R, Hashimoto H, Okamura Y, Watanabe I, Yabe T, et al. Association between coronary artery calcium score on non-contrast chest computed tomography and all-cause mortality among patients with congestive heart failure. *Heart Vessels.* 2022;37(2):262-72.
176. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, et al. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;126(24):2890-909.
177. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med.* 1992;326(6):381-6.
178. Ankle Brachial Index C, Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA.* 2008;300(2):197-208.
179. Pimentel A, Urena-Torres P, Bover J, Luis Fernandez-Martin J, Cohen-Solal M. Bone Fragility Fractures in CKD Patients. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(4):539-50.
180. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens.* 2012;30(3):445-8.

181. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Role of lipids and intraplaque hypoxia in the formation of neovascularization in atherosclerosis. *Ann Med*. 2017;49(8):661-77.
182. Moreno PR, Purushothaman KR, Zias E, Sanz J, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Curr Mol Med*. 2006;6(5):457-77.
183. Arcidiacono MV, Rubinat E, Borrás M, Betriu A, Trujillano J, Vidal T, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors. *Cardiovasc Ultrasound*. 2015;13:20.
184. Pereira T, Muguruza J, Maria V, Vilaprinyo E, Sorribas A, Fernandez E, et al. Automatic Methods for Carotid Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging Quantification of Adventitial Vasa Vasorum. *Ultrasound Med Biol*. 2018;44(12):2780-92.
185. Zhang H, Du J, Wang H, Wang H, Jiang J, Zhao J, et al. Comparison of diagnostic values of ultrasound micro-flow imaging and contrast-enhanced ultrasound for neovascularization in carotid plaques. *Exp Ther Med*. 2017;14(1):680-8.
186. Rodriguez-Carrio J, Carrillo-Lopez N, Ulloa C, Martin-Carro B, Rodriguez-Suarez C, Naves-Diaz M, et al. Novel Immune Cell Subsets Exhibit Different Associations With Vascular Outcomes in Chronic Kidney Disease Patients-Identifying Potential Biomarkers. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:618286.
187. Piscaglia F, Nolsoe C, Dietrich CF, Cosgrove DO, Gilja OH, Bachmann Nielsen M, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall Med*. 2012;33(1):33-59.
188. Bover J, Urena-Torres P, Cozzolino M, Rodriguez-Garcia M, Gomez-Alonso C. The Non-invasive Diagnosis of Bone Disorders in CKD. *Calcif Tissue Int*. 2021;108(4):512-27.
189. Beaubrun AC, Kilpatrick RD, Freburger JK, Bradbury BD, Wang L, Brookhart MA. Temporal trends in fracture rates and postdischarge outcomes among hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(9):1461-9.
190. Hansen D, Olesen JB, Gislason GH, Abrahamsen B, Hommel K. Risk of fracture in adults on renal replacement therapy: a Danish national cohort study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2016;31(10):1654-62.
191. Naylor KL, McArthur E, Leslie WD, Fraser LA, Jamal SA, Cadarette SM, et al. The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. *Kidney international*. 2014;86(4):810-8.

192. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res.* 2018;6:16.
193. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45.
194. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 7):991-8.
195. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine.* 1999;5(6):623-8.
196. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(13):5266-70.
197. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:137-46.
198. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet.* 2006;38(11):1310-5.
199. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22(23):6267-76.
200. Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone.* 2006;39(4):754-66.
201. Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(8):447-56.
202. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(52):20764-9.
203. Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J.* 2006;25(24):5840-51.
204. Ota K, Quint P, Ruan M, Pederson L, Westendorf JJ, Khosla S, et al. TGF-beta induces Wnt10b in osteoclasts from female mice to enhance coupling to osteoblasts. *Endocrinology.* 2013;154(10):3745-52.
205. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, et al. Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for

- normal bone remodeling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008;23(12):2025-32.
206. S. Serrano JA, M.L. Mariñoso. *Patología ósea metabólica*. 1ª edición ed: Sandoz; 1990.
207. Bover J, Bailone L, Lopez-Baez V, Benito S, Ciceri P, Galassi A, et al. Osteoporosis, bone mineral density and CKD-MBD: treatment considerations. *J Nephrol*. 2017;30(5):677-87.
208. Hauge SC, Frost M, Hansen D. Understanding Bone Disease in Patients with Diabetic Kidney Disease: a Narrative Review. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(6):727-36.
209. Bellorin-Font E, Vo T-M, Martin KJ. 41 - Use of Vitamin D Sterols and Calcimimetics in Patients With End-Stage Renal Disease. In: Nissenson AR, Fine RN, Mehrotra R, Zaritsky J, editors. *Handbook of Dialysis Therapy (Sixth Edition)*. New Delhi: Elsevier; 2023. p. 378-80.
210. Naves M, Rodriguez-Garcia M, Diaz-Lopez JB, Gomez-Alonso C, Cannata-Andia JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2008;19(8):1161-6.
211. Cannata-Andia JB, Carrillo-Lopez N, Messina OD, Hamdy NAT, Panizo S, Ferrari SL, et al. Pathophysiology of Vascular Calcification and Bone Loss: Linked Disorders of Ageing? *Nutrients*. 2021;13(11).
212. Bover J, Urena P, Brandenburg V, Goldsmith D, Ruiz C, DaSilva I, et al. Adynamic bone disease: from bone to vessels in chronic kidney disease. *Semin Nephrol*. 2014;34(6):626-40.
213. Pazianas M, Miller PD. Osteoporosis and Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD): Back to Basics. *Am J Kidney Dis*. 2021;78(4):582-9.
214. Danese MD, Kim J, Doan QV, Dylan M, Griffiths R, Chertow GM. PTH and the risks for hip, vertebral, and pelvic fractures among patients on dialysis. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(1):149-56.
215. Coco M, Rush H. Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(6):1115-21.
216. Jadoul M, Albert JM, Akiba T, Akizawa T, Arab L, Bragg-Gresham JL, et al. Incidence and risk factors for hip or other bone fractures among hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney international*. 2006;70(7):1358-66.

217. Ferreira MA. Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when bone biopsy is needed. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2000;15 Suppl 5:8-14.
218. Szulc P. Bone turnover: Biology and assessment tools. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018;32(5):725-38.
219. Ferreira AC, Cohen-Solal M, D'Haese PC, Ferreira A, European Renal Osteodystrophy aiotCKDMBDwgotERAE. The Role of Bone Biopsy in the Management of CKD-MBD. *Calcif Tissue Int*. 2021;108(4):528-38.
220. Ferreira AC, Cotovio P, Aires I, Mendes M, Navarro D, Silva C, et al. The Role of Bone Volume, FGF23 and Sclerostin in Calcifications and Mortality; a Cohort Study in CKD Stage 5 Patients. *Calcif Tissue Int*. 2022;110(2):215-24.
221. Egan KP, Brennan TA, Pignolo RJ. Bone histomorphometry using free and commonly available software. *Histopathology*. 2012;61(6):1168-73.
222. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKDMBDUWG. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl (2011)*. 2017;7(1):1-59.
223. Lemne C, Jogestrand T, de Faire U. Carotid intima-media thickness and plaque in borderline hypertension. *Stroke*. 1995;26(1):34-9.
224. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circulation research*. 1983;53(4):502-14.
225. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*. 2004;329(1):77-84.
226. Gomez-Alonso C, Menendez-Rodriguez P, Virgos-Soriano MJ, Fernandez-Martin JL, Fernandez-Coto MT, Cannata-Andia JB. Aluminum-induced osteogenesis in osteopenic rats with normal renal function. *Calcif Tissue Int*. 1999;64(6):534-41.
227. Goldner J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol*. 1938;14(2):237-43.
228. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368(7):651-62.
229. Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. *Bone Miner*. 1988;4(1):1-5.

230. Erben RG, Glosmann M. Histomorphometry in Rodents. *Methods Mol Biol.* 2019;1914:411-35.
231. Vidal B, Pinto A, Galvao MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascao R, et al. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port.* 2012;37(4):294-300.
232. Arcidiacono MV, Carrillo-Lopez N, Panizo S, Castro-Grattoni AL, Valcheva P, Ulloa C, et al. Barley-ss-glucans reduce systemic inflammation, renal injury and aortic calcification through ADAM17 and neutral-sphingomyelinase2 inhibition. *Scientific reports.* 2019;9(1):17810.
233. Wu Y, Liao W, Chen J, Liu C, Zhang S, Yu K, et al. Phosphate Metabolic Inhibition Contributes to Irradiation-Induced Myelosuppression through Dampening Hematopoietic Stem Cell Survival. *Nutrients.* 2022;14(16).
234. Carrillo-Lopez N, Panizo S, Alonso-Montes C, Roman-Garcia P, Rodriguez I, Martinez-Salgado C, et al. Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. *Kidney international.* 2016;90(1):77-89.
235. Du C, Wang X, Wu Y, Liao W, Xiong J, Zhu Y, et al. Renal Klotho and inorganic phosphate are extrinsic factors that antagonistically regulate hematopoietic stem cell maintenance. *Cell Rep.* 2022;38(7):110392.
236. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1997;17(6):1135-42.
237. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
238. Maniatis T, Fitch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning.* Press CSHL, editor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
239. Martín-Vírgala J, Fernández-Villabrille S, Martín-Carro B, Tamargo-Gómez I, Navarro-González J, Mora-Fernández C, et al. Serum and urinary soluble  $\alpha$ -Klotho as markers of kidney and vascular impairment. *Nutrients.* 2023;15(6):1470.
240. Savvoulidis P, Kalogeropoulos AP, Raptis V, Rafailidis V, Georgianos PI, Balaskas EV, et al. Calcification of coronary arteries and aortic valve and circulating  $\alpha$ -klotho levels in patients with chronic kidney disease. *J Thorac Dis.* 2020;12(3):431-7.
241. Seiler S, Rogacev KS, Roth HJ, Shafein P, Emrich I, Neuhaus S, et al. Associations of FGF-23 and sKlotho with cardiovascular outcomes among patients with CKD stages 2-4. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2014;9(6):1049-58.

242. Martin-Virgala J, Fernandez-Villabrille S, Martin-Carro B, Tamargo-Gomez I, Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, et al. Serum and Urinary Soluble alpha-Klotho as Markers of Kidney and Vascular Impairment. *Nutrients*. 2023;15(6).
243. Picciotto D, Murugavel A, Ansaldo F, Rosa GM, Sofia A, Milanesi S, et al. The Organ Handling of Soluble Klotho in Humans. *Kidney & blood pressure research*. 2019;44(4):715-26.
244. Kimura T, Akimoto T, Watanabe Y, Kurosawa A, Nanmoku K, Muto S, et al. Impact of Renal Transplantation and Nephrectomy on Urinary Soluble Klotho Protein. *Transplant Proc*. 2015;47(6):1697-9.
245. Lindberg K, Amin R, Moe OW, Hu MC, Erben RG, Ostman Wernerson A, et al. The kidney is the principal organ mediating klotho effects. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(10):2169-75.
246. Akimoto T, Kimura T, Watanabe Y, Ishikawa N, Iwazu Y, Saito O, et al. The impact of nephrectomy and renal transplantation on serum levels of soluble Klotho protein. *Transplant Proc*. 2013;45(1):134-6.
247. Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, et al. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
248. Roman-Garcia P, Carrillo-Lopez N, Fernandez-Martin JL, Naves-Diaz M, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andia JB. High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression. *Bone*. 2010;46(1):121-8.
249. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*. 2019;322(13):1294-304.
250. Temmar M, Liabeuf S, Renard C, Czernichow S, Esper NE, Shahapuni I, et al. Pulse wave velocity and vascular calcification at different stages of chronic kidney disease. *J Hypertens*. 2010;28(1):163-9.
251. Tripepi G, Agharazii M, Pannier B, D'Arrigo G, Mallamaci F, Zoccali C, et al. Pulse Wave Velocity and Prognosis in End-Stage Kidney Disease. *Hypertension*. 2018;71(6):1126-32.
252. Ferreira JP, Girerd N, Pannier B, Rossignol P, London GM. High Pulse-Wave Velocity Defines a Very High Cardiovascular Risk Cohort of Dialysis Patients under Age 60. *American journal of nephrology*. 2017;45(1):72-81.
253. Park JB, Sharman JE, Li Y, Munakata M, Shirai K, Chen CH, et al. Expert Consensus on the Clinical Use of Pulse Wave Velocity in Asia. *Pulse (Basel)*. 2022;10(1-4):1-18.

254. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021-104.
255. Laclaustra M, Casasnovas JA, Fernandez-Ortiz A, Fuster V, Leon-Latre M, Jimenez-Borreguero LJ, et al. Femoral and Carotid Subclinical Atherosclerosis Association With Risk Factors and Coronary Calcium: The AWHs Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(11):1263-74.
256. Valdivielso JM, Rodriguez-Puyol D, Pascual J, Barrios C, Bermudez-Lopez M, Sanchez-Nino MD, et al. Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease: More, Less, or Just Different? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2019;39(10):1938-66.
257. Betriu A, Martinez-Alonso M, Arcidiacono MV, Cannata-Andia J, Pascual J, Valdivielso JM, et al. Prevalence of subclinical atheromatosis and associated risk factors in chronic kidney disease: the NEFRONA study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2014;29(7):1415-22.
258. Drueke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nature reviews Nephrology*. 2010;6(12):723-35.
259. Donate-Correa J, Ferri CM, Martin-Nunez E, Perez-Delgado N, Gonzalez-Luis A, Mora-Fernandez C, et al. Klotho as a biomarker of subclinical atherosclerosis in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Scientific reports*. 2021;11(1):15877.
260. Keles N, Caliskan M, Dogan B, Keles NN, Kalcik M, Aksu F, et al. Low Serum Level of Klotho Is an Early Predictor of Atherosclerosis. *Tohoku J Exp Med*. 2015;237(1):17-23.
261. Yu L, Kang L, Ren XZ, Diao ZL, Liu WH. Circulating alpha-Klotho Levels in Hemodialysis Patients and Their Relationship to Atherosclerosis. *Kidney & blood pressure research*. 2018;43(4):1174-82.
262. Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. On quantifying plaque size and intima-media thickness in carotid and femoral arteries. Comments on results from a prospective ultrasound study in patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(7):843-50.
263. Kovacic JC, Moreno P, Hachinski V, Nabel EG, Fuster V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review. *Circulation*. 2011;123(15):1650-60.
264. London GM. Arterial Stiffness in Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease. *Blood Purif*. 2018;45(1-3):154-8.

- 
265. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003;107(1):139-46.
266. Collaborators GBDO, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017;377(1):13-27.
267. Chen SC, Huang JC, Tsai YC, Chen LI, Su HM, Chang JM, et al. Body Mass Index, Left Ventricular Mass Index and Cardiovascular Events in Chronic Kidney Disease. *Am J Med Sci*. 2016;351(1):91-6.
268. Obermayr RP, Temml C, Gutjahr G, Kainz A, Klauser-Braun R, Fugger R, et al. Body mass index modifies the risk of cardiovascular death in proteinuric chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(8):2421-8.
269. Ladhani M, Craig JC, Irving M, Clayton PA, Wong G. Obesity and the risk of cardiovascular and all-cause mortality in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2017;32(3):439-49.
270. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology*. 1994;14(1):133-40.
271. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(1):62-9.
272. Martínez Arias L, Panizo García S, Carrillo López N, Barrio Vázquez S, Quirós González I, Román García P, et al. Efecto de la enzima antioxidante catalasa en la calcificación vascular y desmineralización ósea %J *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2017;9:13-9.
273. Morena M, Dupuy AM, Jaussent I, Vernhet H, Gahide G, Klouche K, et al. A cut-off value of plasma osteoprotegerin level may predict the presence of coronary artery calcifications in chronic kidney disease patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(11):3389-97.
274. Morena M, Jaussent I, Halkovich A, Dupuy AM, Bargnoux AS, Chenine L, et al. Bone biomarkers help grading severity of coronary calcifications in non dialysis chronic kidney disease patients. *PLoS one*. 2012;7(5):e36175.

275. Kim CS, Bae EH, Ma SK, Han SH, Choi KH, Lee J, et al. Association of Serum Osteoprotegerin Levels with Bone Loss in Chronic Kidney Disease: Insights from the KNOW-CKD Study. *PLoS one*. 2016;11(11):e0166792.
276. Shaarawy M, Fathy SA, Mehany NL, Hindy OW. Circulating levels of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand in patients with chronic renal failure. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(11):1498-503.
277. Barrera-Baena P, Rodriguez-Garcia M, Rodriguez-Rubio E, Gonzalez-Llorente L, Ortiz A, Zoccali C, et al. Serum phosphate is associated with increased risk of bone fragility fractures in hemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2023.
278. De Schutter TM, Neven E, Persy VP, Behets GJ, Postnov AA, De Clerck NM, et al. Vascular calcification is associated with cortical bone loss in chronic renal failure rats with and without ovariectomy: the calcification paradox. *American journal of nephrology*. 2011;34(4):356-66.
279. Desbiens LC, Sidibe A, Ung RV, Mac-Way F. FGF23-Klotho Axis and Fractures in Patients Without and With Early CKD: A Case-Cohort Analysis of CARTaGENE. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2022;107(6):e2502-e12.
280. Ribeiro AL, Mendes F, Carias E, Rato F, Santos N, Neves PL, et al. FGF23-klotho axis as predictive factors of fractures in type 2 diabetics with early chronic kidney disease. *J Diabetes Complications*. 2020;34(1):107476.
281. Boisvert NC, Holterman CE, Gutsol A, Coulombe J, Pan W, Alexander RT, et al. Ubiquitin COOH-terminal hydrolase L1 deletion is associated with urinary alpha-klotho deficiency and perturbed phosphate homeostasis. *American journal of physiology Renal physiology*. 2018;315(2):F353-F63.
282. Dai XY, Zhao MM, Cai Y, Guan QC, Zhao Y, Guan Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. *Kidney international*. 2013;83(6):1042-51.
283. Zeng CY, Yang TT, Zhou HJ, Zhao Y, Kuang X, Duan W, et al. Lentiviral vector-mediated overexpression of Klotho in the brain improves Alzheimer's disease-like pathology and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Aging*. 2019;78:18-28.

**PUBLICACIONES**



A continuación se detallan las publicaciones en las que Julia Martín Vírgala ha participado durante el período de doctorado. La primera de ellas, en la que firma de primera autora, forma parte de esta Tesis.

1. **Martín-Vírgala J, Fernández-Villabrille S, Martín-Carro B, Tamargo-Gómez I, Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Calleros L, Astudillo-Cortés E, Avello-Llano N, Mariño G, Dusso AS, Alonso-Montes C, Panizo S, Cannata-Andía JB, Naves-Díaz M, Carrillo-López N. Serum and Urinary Soluble  $\alpha$ -Klotho as Markers of Kidney and Vascular Impairment. *Nutrients*. 2023 Mar 18;15(6):1470. doi: 10.3390/nu15061470. PMID: 36986200.**
2. Fernández-Villabrille S, Martín-Carro B, Martín-Vírgala J, Alonso-Montes C, Fernández-Fernández A, Martínez-Salgado C, Fernández-Martín JL, Naves-Díaz M, Cannata-Andía JB, Carrillo-López N, Panizo S. Phosphorus May Induce Phenotypic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells through the Reduction of microRNA-145. *Nutrients*. 2023 Jun 27;15(13):2918. doi: 10.3390/nu15132918. PMID: 37447244; PMCID: PMC10346205.
3. Fernández Villabrille S, Martín Carro B, Martín Vírgala J, Alonso Montes C, Palomo Antequera C, García Castro R, López Ongil S, Dusso A, Fernández Martín JL, Naves Díaz M, Cannata Andía JB, Carrillo López N, Panizo S. MicroRNA-145 and microRNA-486 are potential serum biomarkers for vascular smooth muscle cells osteogenic differentiation. *Nephrol Dial Transplant* 2023. DOI: 10.1093/ndt/gfad027. PMID: 36722155.
4. Martín-Carro B, Martín-Vírgala J, Fernández-Villabrille S, Fernández-Fernández A, Pérez-Basterrechea M, Navarro-González JF, Donate-Correa J, Mora-Fernández C, Dusso AS, Carrillo-López N, Panizo S, Naves-Díaz M, Fernández-Martín JL, Cannata-Andía JB, Alonso-Montes C. Role of Klotho and AGE/RAGE-Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling Pathway on the Development of Cardiac and Renal Fibrosis in Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 9;24(6):5241. doi: 10.3390/ijms24065241. PMID: 36982322.
5. Martín-Carro B, Donate-Correa J, Fernández-Villabrille S, Martín-Vírgala J, Panizo S, Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Navarro-González JF, Naves-Díaz M, Fernández-Martín JL, Alonso-Montes C, Cannata-Andía JB. Experimental Models to Study Diabetes Mellitus and Its Complications: Limitations and New Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 18;24(12):10309. doi: 10.3390/ijms241210309. PMID: 37373455; PMCID: PMC10299511.

6. Ulloa-Clavijo C, Martín-Vírgala J, Gómez-Alonso C, Fernández-Mariño B, Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N, Sobrino-Díaz L, Rodríguez C, Rodríguez-García M, Suarez A, Dusso A. Granulocitos de baja densidad: Un nuevo marcador de deterioro óseo en pacientes en diálisis peritoneal. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2022; 14(4):107-114. doi: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2022000300003>.
7. Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, Martín-Carro B, Martín-Vírgala J, Ruiz-Ortega M, Fernández-Martín JL, Dusso AS, Rodríguez-García M, Naves-Díaz M, Cannata-Andía JB, Panizo S. The receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand receptor leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 contributes to parathyroid hormone-induced vascular calcification. *Nephrol Dial Transplant*. 2021 Mar 29;36(4):618-631. doi: 10.1093/ndt/gfaa290.PMID: 33367746.
8. Martínez-Arias L, Panizo-García S, Martín-Vírgala J, Martín-Carro B, Fernández-Villabrille S, Avello-Llano N, Miguel-Fernández D, Ruiz Torres MP, Cannata-Andía JB, Carrillo-López N, Naves-Díaz M. Contribución de fósforo y PTH al desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardiaca en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica. *Nefrología*. 2021 4 1(6):640–651. doi: 10.1016/j.nefro.2021.02.001. PMID: 33715866.
9. Martínez-Arias L, Panizo S, Alonso-Montes C, Martín-Vírgala J, Martín-Carro B, Fernández-Villabrille S, García Gil-Albert C, Palomo-Antequera C, Fernández-Martín JL, Ruiz-Torres MP, Dusso AS, Carrillo-López N, Cannata-Andía JB, Naves-Díaz M. Effects of calcitriol and paricalcitol on renal fibrosis in CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2021; 36: 793–803. doi: 10.1093/ndt/gfaa373.Epub ahead of print. PMID: 33416889.
10. Cannata-Andía JB, Martín-Carro B, Martín-Vírgala J, Rodríguez-Carrio J, Bande-Fernández JJ, Alonso-Montes C, Carrillo-López N. Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders: Pathogenesis and Management. *Calcif Tissue Int*. 2021; 108(4): 410-422. doi: 10.1007/s00223-020-00777-1. Epub ahead of print. PMID: 33190187.
11. Barrera Baena P, Sanz García C, Martín Carro B, Martín Vírgala J, Naves Díaz M, Cannata Andía JB. ¿Es etelcalcetida más eficaz que maxacalcitol para disminuir la propensión a calcificaciones vasculares en el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario? *NefroPlus* 2021;13(2):34-38
12. González-Naranjo P, Pérez C, Girón R, Sánchez-Robles EM, Martín-Fontelles MI, Carrillo-López N, Martín-Vírgala J, Naves M, Campillo NE, Páez JA. New cannabinoid receptor antagonists as pharmacological tool. *Bioorg Med Chem*.

2020 Oct 1;28(19):115672. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115672. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32912440.

13. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Rodríguez-Rebollar A, Palomo-Antequera C, Martín-Vírgala J, Martín-Carro B, Fernández-Villabrille S, Rodríguez-Carrio J, Cannata-Andía JB, Naves-Díaz M. Efecto de la fragilidad y la sarcopenia sobre el riesgo de caídas y de fracturas osteoporóticas en población no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2020;12(3):81-86. <http://dx.doi.org/10.4321/s1889-836x2020000300002>.
14. Gómez Alonso, C, Díaz López, JB, Rodríguez Rebollar, A, Martínez Arias, L, Martín Vírgala, J, Martín Carro, B, Marqués Álvarez, L, Palomo Antequera, C, Cannata Andía, JB, Naves Díaz, M. Niveles de calcidiol y mantenimiento de la función muscular, capacidad funcional y densidad mineral ósea en población española no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2019, 11(1), 6-11. doi: 10.4321/s1889-836x2019000100002.