

Don **JUAN FRANCISCO NAVARRO GONZÁLEZ**, Tutor Externo de Prácticas del DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA, DERMATOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA de la UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA y Don **JAVIER GARCÍA PÉREZ**, Jefe del Servicio de Nefrología del HOSPITAL UNIVERSITARIO NUESTRA SEÑORA DE CANDELARIA y Profesor Asociado del DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA, DERMATOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA de la UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CERTIFICAN:

Que **JAVIER DONATE CORREA**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a la Tesis Doctoral titulada: **VITAMINA D, INFLAMACIÓN Y SISTEMA FGF23/KLOTHO: IMPLICACIONES EN EL DAÑO VASCULAR** que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Revisada la presente Memoria, la consideramos apta para ser presentada y defendida y autorizamos su presentación para ser juzgada por el Tribunal que sea designado al efecto.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmamos el presente certificado en San Cristóbal de La Laguna, a 22 de diciembre de 2014.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. Juan Francisco Navarro González

Dr. Javier García Pérez



Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría.

Tesis Doctoral

Vitamina D, inflamación y sistema FGF23/KLOTHO:

Implicaciones en el daño vascular.

Presentada por:

Javier Donate Correa

Febrero 2015

Nunca es igual saber la verdad por uno mismo que tener que escucharla por otro.

Aldous Huxley (1894-1963)

A mis padres.

Agradecimientos:

A mi abuela y a mi hermana, por su cariño incondicional.

A Juan Navarro, por contagiarme su rigor académico y su espíritu de superación.

A Javier González, por su confianza en mí.

A Mercedes Muros, por inculcarme el amor por el trabajo bien hecho.

A Milagros León Barrios y Ricardo Pérez Galdona, por enseñarme casi todo lo que sé de ciencia y abrirme las puertas de este mundo apasionante.

A Sebastián Méndez, por traerme de vuelta a la investigación.

A Rut, para que siga caminando a mi lado por los campos, por los ríos, por los caminos, por los prados, por la ciudad, por las calles, por los parques, por los bulevares, por las aceras, por las avenidas, por los puentes, por las mañanas, por las tardes, por las noches, cuando llueve, cuando hace sol,...

A Alberto, Carlos y Gustavo. Mis amigos de toda la vida sin los cuales no habría podido llevar el anillo único al Monte del Destino.

A Ernesto, amigo y compañero de fatigas investigadoras.

A todos los compañeros de la Unidad de Investigación que me han ayudado de una u otra forma en la consecución de este trabajo. En especial a David, Rebeca, Elena, Lari, Ana, Lorena, Jorge y Manu.

Y a todos aquellos que no he citado y que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
Capítulo 1. Perfil anti-inflamatorio del paricalcitol en pacientes en hemodiálisis: un estudio piloto, abierto y prospectivo.....	9
Capítulo 2. Expresión del sistema FGF-23/KLOTHO en tejido vascular humano.....	16
Capítulo 3. Los bajos niveles de KLOTHO se asocian con la presencia y la severidad de la enfermedad arterial coronaria.....	22
RESUMEN.....	30
I. INTRODUCCIÓN.....	31
I.1 Enfermedad Renal Crónica y Enfermedad Cardiovascular.....	31
I.2 Homeostasis mineral: una Nueva Perspectiva.....	32
I.3 Sistema FGF-23 / Klotho, Inflamación y Daño Cardiovascular.....	34
I.4 Tratamiento de las Alteraciones del Metabolismo Mineral en la ERC: Beneficios adicionales.....	39
II. OBJETIVOS.....	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
III.1 Capítulo 1. Perfil anti-inflamatorio del paricalcitol en pacientes en hemodiálisis: un estudio piloto, prospectivo y abierto.....	42
III.2 Capítulo 2. Expresión del sistema FGF-23/KLOTHO en tejido vascular humano...	44
III.3 Capítulo 3. Los bajos niveles de KLOTHO se asocian con la presencia y la severidad de la enfermedad arterial coronaria.....	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
IV.1 Capítulo 1. Perfil anti-inflamatorio del paricalcitol oral en pacientes en hemodiálisis: un estudio piloto, prospectivo y abierto.....	49
IV.2 Capítulo 2. Expresión del sistema FGF-23/KLOTHO en tejido vascular humano..	54
IV.3 Capítulo 3. Los bajos niveles de KLOTHO se asocian con la presencia y la severidad de la enfermedad arterial coronaria.....	59

V.	CONCLUSIONES.....	68
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	69

Índice de figuras

Figura I.1	Regulación fisiológica de los niveles séricos de fósforo.....	34
Figura I.2	Variaciones en los niveles de FGF-23, Klotho, PTH, vitamina D activa y fosfato durante la progresión de la ERC.....	35
Figura I.3	Fisiología y fisiopatología del FGF-23.....	36
Figura IV.1	Porcentaje de variación media respecto a los niveles basales en las concentraciones séricas de parámetros inflamatorios tras 12 semanas de tratamiento con paricalcitol.....	50
Figura IV.2	Variación porcentual media respecto al nivel basal de los ratios de los niveles séricos de parámetros inflamatorios (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) respecto a la citoquina anti-inflamatoria (IL-10) tras el tratamiento.....	51
Figura IV.3	Porcentaje de variación media respecto al nivel basal de la expresión génica de TNF- α , IL-6 e IL-10 tras el tratamiento con paricalcitol.....	51
Figura IV.4	Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR.....	54
Figura IV.5	Expresión de ARNm de KLOTHO determinados por qRT-PCR en muestras de aorta de pacientes quirúrgicos.....	55
Figura IV.6	Curvas de amplificación de la PCR cuantitativa de KLOTHO y FGF-23.	55
Figura IV.7	Relación entre el nivel de la expresión de ARNm de KLOTHO y la de ADAM-17 e IL-10.....	56
Figura IV.8	Diferencias entre las concentraciones de Klotho sérico de los pacientes con y sin EAC.....	60
Figura IV.9	Diferencias entre los niveles de expresión de Klotho en el tejido vascular de pacientes con y sin EAC.....	64

Indice de tablas

Tabla I.1	Funciones fisiológicas de FGF-23.....	33
Tabla I.2	Funciones de la forma soluble de Klotho independientes del FGF-23.....	37
Tabla III.1	Cebadores utilizados para la PCR cuantitativa a tiempo real.....	43
Tabla III.2	Cebadores utilizados para la RT-PCR del FGF-23, KLOTHO y los FGFRs.....	44
Tabla IV.1	Valores bioquímicos antes y después de la administración de Paricalcitol.....	49
Tabla IV.2	Porcentajes de cambio de las concentraciones séricas y de expresión génica en sangre periférica de citoquinas, en función de las concentraciones de HPT intacta o fósforo sérico, tras la administración de paricalcitol.....	52
Tabla IV.3	Características clínicas y determinaciones bioquímicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	59
Tabla IV.4	Características clínicas de los pacientes tras estratificar por los niveles de Klotho soluble.....	61
Tabla IV.5	Análisis de regresión múltiple por pasos para el IES como variable dependiente.....	62
Tabla IV.6	Análisis de regresión logística multivariable para la presencia de EACS...	63
Tabla IV.7	Análisis de regresión logística multivariable para la presencia de EACS en el estudio de expresión vascular de Klotho.....	64

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

La enfermedad renal crónica (ERC) es reconocida actualmente como un problema de salud pública. Los estudios realizados en población americana muestran que la prevalencia global se sitúa en torno al 12%, mientras que en nuestro país, el estudio EPIRCE (Estudio de Prevalencia de la Insuficiencia Renal Crónica en España) demostró que dicha prevalencia era superior al 9% lo que representa, en términos absolutos, que más de 4 millones de personas presentan ERC en España (Otero *et al.*, 2010).

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la causa más común de muerte en los pacientes con ERC, siendo entre 20 y 30 veces mayor que en la población general. Este exceso de riesgo cardiovascular (CV) es explicado por la elevada prevalencia de factores de riesgo CV tradicionales, así como por la presencia de factores de riesgo específicos relacionados con la ERC. Entre estos últimos destacan las alteraciones del metabolismo mineral y la inflamación.

Los trabajos que conforman la presente Tesis pretenden profundizar en el conocimiento de las interrelaciones entre el metabolismo mineral, la inflamación y la ECV en el contexto de la ERC. Algunos de los avances más relevantes en este campo derivan del descubrimiento de nuevas relaciones entre la terapia con análogos de la vitamina D y la inflamación, del estudio del eje constituido por el factor de crecimiento fibroblástico 23 (*fibroblast growth factor*, FGF-23) y la proteína Klotho, recientemente identificado como el regulador principal de la homeostasis del fósforo, y de la relación de esta última con el mantenimiento de la salud CV.

Dentro de las alteraciones del metabolismo mineral, uno de los trastornos más frecuentes que presentan los pacientes con ERC es el hiperparatiroidismo secundario (HPTS), para cuyo tratamiento se han usado ampliamente análogos de la vitamina D. Desde hace pocos años se cuenta con una nueva molécula, el 19-nor-1-25-dihidroxi-

vitamina D2 (paricalcitol), un activador selectivo del receptor de la vitamina D (RVD) que, más allá de su efectividad como terapia frente al HPTS, se ha relacionado con una mejoría de la supervivencia. Estudios experimentales han mostrado que el paricalcitol presenta propiedades anti-inflamatorias, lo cual podría contribuir a los beneficios referidos para esta molécula, aunque esta posibilidad no ha sido analizada en estudios clínicos. Para evaluar si la administración de paricalcitol se asocia a efectos moduladores del fenómeno inflamatorio a nivel clínico, desarrollamos un estudio en pacientes en hemodiálisis cuyos resultados se han publicado en la revista *Journal of Clinical Pharmacology* (revista oficial de la Asociación Americana de Farmacología Clínica). Este trabajo se presenta en esta memoria como el **Capítulo 1: *Anti-inflammatory profile of paricalcitol in hemodialysis patients: a prospective, open-label, pilot study.* Navarro-González JF, Donate-Correa J, Méndez ML, Muros-de-Fuentes M, García-Pérez J, Mora-Fernández C. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;53(4):421-6.**

Por otra parte, hemos fijado nuestra atención en la posible relación existente entre el sistema FGF-23/Klotho y el daño vascular. Este sistema, más allá de su papel en el contexto del metabolismo mineral, parece tener implicaciones significativas en la ECV. Estudios clínicos en pacientes con ERC han mostrado una asociación independiente entre los elevados niveles de FGF-23 y la presencia de hipertrofia ventricular izquierda, así como con un incremento en el riesgo de mortalidad. Respecto a Klotho, esta proteína ha sido relacionada con el mantenimiento de la salud vascular. Dado que los estudios previos que presentaban datos sobre los elementos del sistema FGF-23/Klotho a nivel de la pared vascular habían sido realizados en animales de experimentación, nuestro objetivo fue caracterizar en la pared vascular humana la expresión de FGF-23, de sus receptores y de Klotho. Los resultados se han publicado en la revista *International Journal of Cardiology* y dicho trabajo se incluye en esta memoria bajo el epígrafe **Capítulo 2: *Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue.* International Journal of**

Cardiology. Donate-Correa J, Mora-Fernández C, Martínez-Sanz R, Muros-de-Fuentes M, Pérez H, Meneses-Pérez B, Cazaña-Pérez V, Navarro-González JF. *International Journal of Cardiology*. 2013;165:179-83.

Finalmente, como paso siguiente en el estudio del vínculo potencial existente entre el sistema FGF-23/Klotho y el daño vascular, nos hemos centrado en la relación entre Klotho y la enfermedad arterial coronaria (EAC). Descensos en los niveles de esta proteína se relacionan con un síndrome de envejecimiento prematuro que incluye disfunción endotelial y aterosclerosis, además de un descenso en la esperanza de vida. Dado que se ha propuesto que la proteína Klotho está involucrada en el mantenimiento de la salud vascular por distintos mecanismos, se ha sugerido que podría constituir un nuevo regulador de la ECV, con un papel potencial en la patogénesis de la aterosclerosis. La EAC es la principal causa de muerte en el mundo, y aunque el riesgo de ECV puede ser cuantificado mediante asociaciones con factores de riesgo CV tradicionales, la susceptibilidad, severidad y progresión de la EAC no se ajusta completamente a estos factores. Por tanto, la aparición en este escenario de un nuevo sistema biológico relacionado con la salud CV, podría aportar nueva información que mejore nuestra comprensión de la biología de la enfermedad aterosclerótica y la determinación del riesgo CV. Bajo estas consideraciones hemos llevado a cabo un estudio transversal para testar la hipótesis que relaciona una reducción en la concentración de la proteína Klotho soluble y un descenso en los niveles de su expresión vascular con la presencia y severidad de la EAC. Los resultados se recogen en el artículo publicado en la revista *Heart* y conforman el **Capítulo 3: *Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease***. Navarro-González JF, Donate-Correa J, Muros-de-Fuentes M, Pérez-Hernández H, Martínez-Sanz R, Mora-Fernández C. *Heart*. 2014;100:34-40.

Capítulo I

Perfil anti-inflamatorio del paricalcitol en pacientes en hemodiálisis: un estudio piloto, abierto y prospectivo.

Juan F. Francisco-González, Javier Donate-Correa, María Luisa Méndez, Mercedes Muros-de-Fuentes, Javier García-Pérez, Carmen Mora-Fernández.

Anti-inflammatory profile of paricalcitol in hemodialysis patients: a prospective, open-label, pilot study.

Journal of Clinical Pharmacology 2013;53(4):421-6

Anti-Inflammatory Profile of Paricalcitol in Hemodialysis Patients: A Prospective, Open-Label, Pilot Study

Juan F. Navarro-González, MD, PhD, FASN^{1,2,3}, Javier Donate-Correa^{2,3a},
 María L. Méndez, MD¹, Mercedes Muros de Fuentes, PharmD^{3,4},
 Javier García-Pérez, MD, PhD¹, and Carmen Mora-Fernández, MD^{2,4}

Abstract

Inflammation is a strong predictor of increased morbidity and mortality in hemodialysis (HD) patients. Paricalcitol, a selective vitamin D receptor activator used for prevention and treatment of secondary hyperparathyroidism, has shown anti-inflammatory properties in experimental studies, although clinical data are scarce. In an open-label, prospective, single center, pilot study, 25 stable HD patients, previously receiving calcitriol, completed 12 weeks of therapy with oral paricalcitol. Serum and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) expression profiles of inflammatory cytokines were analyzed. Serum interleukin (IL)-1, IL-10, and IL-18 did not change, unlike high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-6, which experienced a significant mean percent decrease of 14.3%, 4.7%, and 5%, respectively. There was a significant reduction in the TNF- α /IL-10 and the IL-6/IL-10 ratios ($P < .05$). Serum intact parathyroid hormone concentration experienced a mild but significant reduction. In addition, expression levels of TNF- α and IL-6 decreased by 19.1% ($P < .01$) and 17.5% ($P < .001$), respectively, whereas expression of IL-10 increased by 17.7% ($P < .01$) after treatment. In conclusion, paricalcitol administration to HD patients is associated with a beneficial effect on the inflammatory cytokine serum and gene expression profile of PBMC. This effect may contribute to the survival benefits of paricalcitol observed in clinical studies.

Keywords

gene expression, hemodialysis, inflammation, paricalcitol, peripheral blood mononuclear cells

Although significant improvements have occurred in different aspects of care for patients on dialysis, the morbid-mortality observed in this population remains very high. It is becoming increasingly appreciated that patients on hemodialysis (HD) present a true chronic inflammatory syndrome.¹ This state of chronic inflammation is a powerful predictor of mortality after adjustment for other risk factors, and also is responsible for other complications and mortality risk factors, including anemia, left ventricular hypertrophy, malnutrition, vascular calcification, and atherosclerosis.^{1–3}

C-reactive protein (CRP) is the gold-standard of the inflammatory markers, which has become a routine test in many HD services. However, in the complex scenario of end-stage renal disease (ESRD), cytokines are central molecules in the inflammatory process that affects patients on HD. Dysregulation of some of these molecules is a key factor in the altered cytokine network of uremia, with relevant implications in the development of complications and the increased morbi-mortality in this population.^{4,5}

Paricalcitol (19-nor-1, 25-hydroxi-vitamin D2), a synthetic, selective, new generation vitamin D receptor activator, is a therapy for prevention and treatment of secondary hyperparathyroidism (SHPT). Several studies have shown that paricalcitol retains vitamin D biological activity but shows important differences concerning diverse aspects, including undesirable effects and tolerance,⁶ inhibition of renin expression,⁷ and induction of

vascular calcification.⁸ In addition, experimental *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the anti-inflammatory effects of paricalcitol, including suppression of inflammatory chemokine expression, inhibition of renal inflammation by sequestration of NF- κ B, inhibition of Wnt, and blockade of β -catenin-mediated gene transcription.^{9–12} However, so far there have been a limited number of studies addressing the anti-inflammatory effects of paricalcitol in the clinical setting.¹³

¹Nephrology Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

²Research Unit, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

³GEENDIAB (Grupo Español para el Estudio de la Nefropatía Diabética).

⁴Clinical Biochemistry Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

Submitted for publication 23 May 2012; accepted 17 July 2012.

Corresponding Author:

Juan F. Navarro-González, MD, PhD, FASN, Nephrology Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife 38010, Spain

Email: jnavgon@gobiernodecanarias.org

^aPhD student.

The present study was undertaken to determine the effect of oral paricalcitol administration on the serum inflammatory profile and the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) inflammatory cytokines mRNA expression levels in patients receiving regular HD treatment.

Subjects and Methods

Study Design

This was a prospective, open-label, pilot study of patients under maintenance HD from a single center. The primary endpoint was to analyze the effect of oral paricalcitol administration on the serum interleukin (IL)-6 concentrations after 12 weeks of therapy. Secondary endpoints were changes in serum concentration of inflammatory molecules [high sensitivity (hs)-CRP, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1, IL-10, and IL-18], and the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α in PBMC. A sample size calculation to detect a 25% relative difference in the serum IL-6 concentration at the end of the study for a α -value of 0.05 and a β -value of 0.90 showed a need for a minimum of 19 individuals.

Patient Population

Patients were considered eligible if they met the following inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria were age older than 18 years, HD therapy for at least 3 months, stable clinical condition, serum calcium, and phosphorus concentrations lower than 10.5 mg/dL and 6.0 mg/dL, respectively, calcium-phosphorus product lower than 80 mg²/dL², SHPT under treatment with calcitriol for at least 6 months, with an intact parathyroid hormone (iPTH) level lower than 500 pg/mL, and able to give informed consent. Exclusion criteria included previous parathyroidectomy, treatment with calcimimetics, severe gastrointestinal disease, current smoking habit, alcohol dependence or drug abuse, known active immunologic or tumoral disease, an acute inflammatory or infectious episode in the previous month, hepatitis B, C or HIV positivity, previous transplantation, active treatment with immunotherapy or immunosuppressive medications, and non-compliance with HD prescription. The protocol was approved by the institutional ethic committee and procedures were in accordance with the Helsinki Declaration. Informed consent was obtained for all patients.

Thirty patients entered the study, and five did not complete the trial (three received a renal transplant and two discontinued intervention). Finally, 25 subjects completed the study. After a washout period of 3 weeks from intravenous calcitriol, patients had the basal blood draw, and they subsequently started oral paricalcitol (1 μ g/day) for 12 weeks.

General Biochemical and Inflammatory Parameters

Blood samples were drawn after an 8 hours fasting period, before the midweek HD session. Serum was obtained and

frozen at -80°C for biochemical analysis and measurements of inflammatory parameters. Routine biochemical parameters were measured using standard methods. Serum hs-CRP was measured by a high sensitivity particle enhanced immunoturbidimetric fully automated assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a Cobas 6000 analyzer from the same manufacturer (functional sensitivity was 0.3 mg/L and the intra- and inter-assay precision was 1.6 and 8.4, respectively). Levels of TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, and IL-18 were measured by high-sensitive immunoenzymatic ELISA method (Quantikine[®], R&D Systems, UK) in a DSXTM 4 Plate ELISA Processor (Vitro SA, Madrid, Spain). Minimum detectable concentrations were 0.10 pg/mL, 0.05 pg/mL, 0.70 pg/mL, 0.50 pg/mL, and 12.5 pg/mL, respectively. Intra- and inter-assay coefficients of variability were <10.8%.

Isolation of PBMC and RNA Extraction

PBMC were isolated from whole venous blood (10 mL) collected into heparinized tubes and diluted with an equal volume of PBS. PBMC were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque method). Total RNA was isolated by using TRIreagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) as described in manufacturer's instructions. The concentration and purity of the recovered RNA were established by measuring ultraviolet absorbance at 260 nm and 280 nm. Total RNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

Primers and Real-Time Polymerase Chain Reaction

Expression levels of TNF- α and IL-6 were analyzed by real-time quantitative RT-PCR. The sequence of primers were designed for an annealing temperature of 60°C using Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), except from β -actin primers (a housekeeping gene) which also anneals at 60°C . Primers are depicted in Table 1. Reactions were optimized to a final volume of 25 μ L: 1 \times reaction buffer, 0.2 mM of each deoxynucleotide, 2.5 mM MgCl₂, 0.15 μ M of each primer, 1:100 000 SYBR Green I (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) and 0.4 U of HotStart DNA Taq Polimerase (Ecogen/Bioline, Madrid, Spain). Fluorescein was also added in a final concentration of 1:100 000 in order to normalize differences in amount of intercalating

Table 1. Primer Pairs Used for Quantitative RT-PCR

Gene	Primers (5' to 3')	
	Forward	Reverse
TNF- α	gccaccacgctctctgt	ggctacgggctgtcactc
Interleukin-6	gtatgaacagc gatgatgcac	gaaacggaactccagaagacc
Interleukin-10	acctgcctaacatgcttcgag	ctgggtcttggttctcagctt
β -actin	tccctggagaagactacga	atctcctggaaggtggacag

dyes caused by pipetting errors. RT-PCR amplification was performed on an iCycler iQ Real-Time PCR system (BioRad, Hercules, CA) and analyzed with the provided software (iCycler software version 3.0). A three step run protocol was used: (i) an initial hold of 9 minutes at 95°C to activate Taq polymerase and a fluorescence measurement to normalize the whole plate amount of fluorescein dye, (ii) an amplification and quantification cycle with 45 repeats (denaturation 20 seconds at 95°C, annealing 20 seconds at 60°C, and extension 20 seconds at 72°C with a fluorescence measurement), (iii) a melting curve analysis from 65°C to 95°C to check the specificity of the amplified product. Agarose gel electrophoresis was performed to confirm that there were single-product amplifications without primer dimers. Additionally, all fragments were checked for specificity by direct sequencing of both strands with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer using Big Dye Terminator kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Expression of cytokine mRNA for each sample was then expressed as an arbitrary ratio of the quantity of mRNA to that of β -actin.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SD. Serum levels of inflammatory parameters, as well as expression ratios, were logarithmically transformed for statistical analyses and then back-transformed to their natural units for presentation in tables and figures. Comparisons between basal and final values were performed by paired Student's *t*-test. A *P*-value $< .05$ was considered as significant. Data were analyzed using the SPSS version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Results

Characteristics of the Patients

Twenty-five patients (13 males and 12 females, mean age 62 ± 15 years, mean HD vintage 12 ± 5 months) completed the study and were finally analyzed (Table 2). All participants were Caucasians, and nine subjects (36%)

were diabetics. All patients were maintained on a regular HD regimen of three times a week, for 4 hours per session, without dialysis filter reuse. Patients used polyacrylonitrile (68%) or polysulfone membranes (32%). Regarding vascular access, 77% had an arteriovenous fistula, whereas 23% had grafts or central dialysis catheters. All patients received phosphate binder therapy (13 sevelamer hydrochloride, 12 lanthanum carbonate, and 6 calcium acetate), and eight patients were under treatment with cinacalcet. Most patients used antihypertensive therapy (calcium channel blockers, 59%; angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers, 49%; β -blockers, 27%; diuretics, 15%; and α -blockers, 10%). Twenty patients (80%) used statins, and 94% received erythropoiesis-stimulating agents.

Evolution of Serum Mineral Metabolism and Inflammatory Parameters

After 12 weeks of oral paricalcitol administration, serum calcium, phosphorus, and calcium-phosphorus product (CaxP) did not experience significant variations. However, serum intact parathyroid hormone concentration experienced a mild but significant reduction (Table 2).

Regarding the evolution of inflammatory profile, whereas levels of IL-1, IL-10, and IL-18 did not change, the serum concentration of hs-CRP, TNF- α , and IL-6 decreased significantly (Table 2). Respect to baseline values, the mean percent variation of serum hs-CRP, TNF- α , and IL-6 were, respectively, -14.3% (95% confidence interval (CI), -21.5 to -7.2) ($P < .001$); -4.7% (95% CI, -11.4 to 2.0 ; $P < .05$); and -5% (95% CI, -6.5 to 5.4 ; $P < .05$). Serum IL-10 increased by 2.5%, and this increment almost reached statistical significance. Evolution of inflammatory parameters is shown in Figure 1. The balance between pro- and anti-inflammatory forces was evaluated by the evolution of the ratios of TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-18 to the anti-inflammatory cytokine IL-10. We

Table 2. Biochemical Values Before (Baseline) and After Paricalcitol Administration

Parameter	Before Paricalcitol	After Paricalcitol	P-Value
Calcium (mg/dL)	9.1 \pm 0.6	9.2 \pm 0.5	NS
Phosphate (mg/dL)	4.6 \pm 0.8	4.7 \pm 0.6	NS
Ca \times P (mg ² /dL ²)	43.8 \pm 12.8	43.6 \pm 10.7	NS
iPTH (pg/mL)	317 \pm 91	302 \pm 83	$< .01$
hs-CRP (mg/L)	7.1 \pm 3.3	5.9 \pm 2.5	$< .001$
TNF- α (pg/mL)	7.6 \pm 2.7	7.1 \pm 2.0	$< .05$
Interleukin-1 (pg/mL)	1.0 \pm 0.5	0.8 \pm 0.3	NS
Interleukin-6 (pg/mL)	6.8 \pm 5.0	6.6 \pm 4.8	$< .05$
Interleukin-10 (pg/mL)	79 \pm 20	80 \pm 19	0.06
Interleukin-18 (pg/mL)	610 \pm 95	591 \pm 135	NS

NS, not significant; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

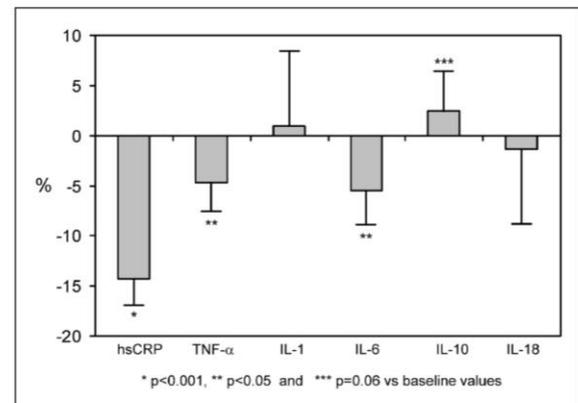


Figure 1. Mean (SD) percent variation respect to baseline in serum concentration of inflammatory parameters after 12 weeks of paricalcitol administration.

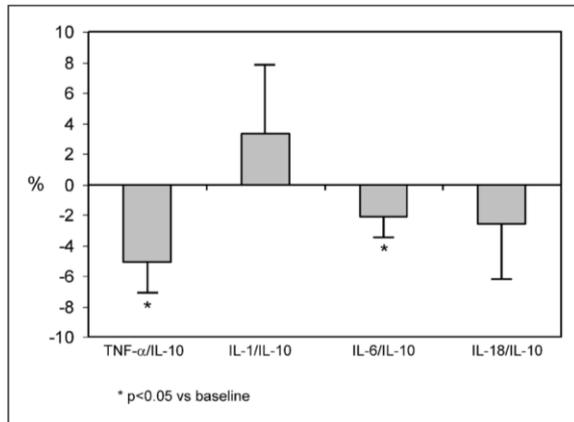


Figure 2. Mean (SD) percent variation respect to baseline of the ratios of proinflammatory (TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-18) to the anti-inflammatory cytokine (IL-10) after paricalcitol administration.

observed a significant reduction in the TNF- α /IL-10 and the IL-6/IL-10 ratios respect to baseline values ($P < .05$), whereas the IL-1/IL-10 and the IL-18/IL-10 ratios did not experienced significant changes (Figure 2).

Finally, we evaluated the potential influence of the serum concentrations of PTH and phosphate in the response to paricalcitol. Comparison of the percent change of cytokine serum concentrations after paricalcitol administration in patients classified according a serum PTH concentration above or below 300 pg/mL, or a serum phosphate level higher or lower than 4.5 pg/dL did not show any significant result (Table 3).

mRNA Expression Levels of TNF- α and IL-6

Evolution of mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokine genes in PBMC is depicted in Figure 3. After 12 weeks of paricalcitol administration, the pre-treatment mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 experienced a significant decrease, with a mean percent

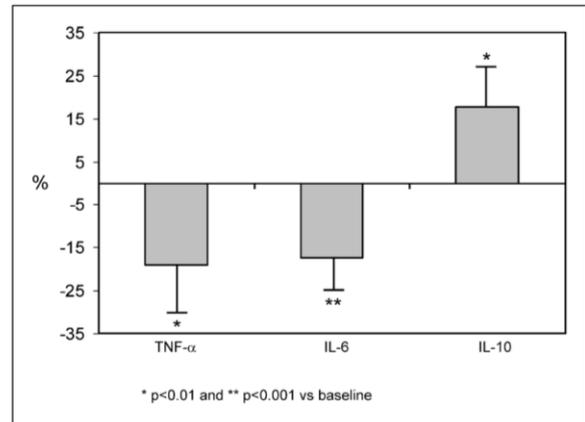


Figure 3. Mean (SD) percent variation respect to baseline of the mRNA expression level of TNF- α , IL-6, and IL-10 after paricalcitol administration.

reduction of 19.1% for TNF- α ($P < .01$) and 17.5% for IL-6 ($P < .001$). On the contrary, the PBMC expression of IL-10 significantly increased by 17.7% after paricalcitol treatment ($P < .01$).

Discussion

A recent epidemiologic study showed that the use of the selective VDR activator paricalcitol was associated with a significant adjusted survival benefit when compared to the use of calcitriol, which was observed not only in patients who remained on their respective treatments throughout the evaluation period, but also in that subgroup who switched from calcitriol to paricalcitol.¹⁴ This study revealed a potentially important systemic role for selective VDR activation in the survival of patients with CKD, indicating the presence of beneficial pleiotropic extra-skeletal effects.¹⁵ Most of studies researching on these pleiotropic effects have been performed *in vitro* or in animal models, with scarce information from clinical

Table 3. Percent Change of Serum Cytokine Concentrations and mRNA Expression Levels of Peripheral Blood Mononuclear Cells According to the Serum Concentrations of iPTH and Phosphate After Paricalcitol Administration

	Serum iPTH		Serum iPTH	
	<300 pg/mL	>300 pg/mL	<4.5 pg/dL	<4.5 pg/dL
Serum concentrations				
TNF- α	-10.3 (-13.3 to 1.6)	-3.9 (-17.5 to 3.4)	-11.0 (-19.8 to -1.96)	-1.9 (-10.0 to 3.4)
Interleukin-1	-26.1 (-52.9 to 33.3)	7.1 (-40 to 57)	-8.9 (-35.8 to 66.6)	-16.6 (-40.0 to 50.0)
Interleukin-6	-5.8 (-11.1 to 1.6)	-3.6 (-10.0 to 16.6)	-5.8 (-10.5 to 6.25)	-4.0 (-10.0 to 5.0)
Interleukin-10	4.9 (1.9 to 6.0)	4.1 (-4.0 to 9.8)	5.5 (-0.7 to 7.2)	4.1 (-3.0 to 8.4)
Interleukin-18	-0.2 (-16.9 to 3.6)	-1.3 (-16.9 to 14.2)	0.44 (-16.9 to 10.3)	-1.1 (-9.1 to 1.3)
mRNA expression levels				
TNF- α	-25.6 (-50.0 to -15.7)	-22.7 (-55.0 to -15.7)	-48.3 (-57.0 to -15.7)	-22.7 (-33.3 to -15.7)
Interleukin-6	-28.5 (-36.6 to -14.2)	-10.5 (-26.6 to 13.0)	-12.4 (-30.0 to -7.9)	-25.9 (-27.7 to -10.0)
Interleukin-10	11.4 (5.0 to 27.2)	9.0 (-6.2 to 33.3)	10.4 (3.3 to 17.8)	11.1 (0.1 to 33.3)

Data are expressed as median and interquartile range.
TNF- α , tumor necrosis factor- α .

works. In the present study, we investigated the effects of paricalcitol administration on the inflammatory profile of HD patients. Our findings demonstrate the clinical anti-inflammatory properties of paricalcitol, and characterize its effects on the serum concentration of the main inflammatory cytokines, as well as on the mRNA gene expression levels of these molecules in PBMC.

Inflammation is a highly prevalent condition in renal patients, which has been related to important complications, including elevated cardiovascular morbidity and mortality. Cytokines are crucial molecules in inflammation, with key roles in critical processes resulting in cardiovascular injury, including vascular calcification and atherosclerosis.^{16,17} Thus, it has been demonstrated the causative role of inflammation in the development of vascular calcification, with TNF- α playing a pivotal role.^{18,19} On the other hand, the Cardiovascular Health Study reported that levels of CRP and IL-6 were significantly higher in patients with renal insufficiency compared to patients with normal kidney function,²⁰ and more important, these parameters are independently associated with all-cause and cardiovascular mortality in HD patients, and the prognostic value of these indicators resulted to be superior to that of other inflammatory parameters.^{21,22} These findings suggest that modulation of inflammation with reduction of the levels of these biomarkers may have beneficial effects. In fact, in the Fast Revascularization during Instability in Coronary Artery Disease (FRISC) II trial, IL-6 was an independent predictor of mortality among patients presenting with acute coronary syndrome, and importantly, early invasive strategy in patients with elevated IL-6 levels led to a 65% relative reduction in mortality at 1 year, as compared with subjects with lower levels of this cytokine, in who an early invasive strategy did not confer any benefit over a conservative strategy.²³

The use of new active vitamin D compounds has been suggested as a key treatment to revert the cardiovascular complications associated with renal disease, based on a more safety profile, as well as classical and nonclassical actions, including immunomodulatory and anti-inflammatory effects.^{15,24,25} In the present study, administration of paricalcitol caused a significant reduction in serum concentrations of hs-CRP and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, whereas the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 increased nearly significantly. We observed a mean percent reduction of 5.1% and 2.1% in the serum TNF- α /IL-10 and the IL-6/IL-10 ratios. Very few studies have looked at potential anti-inflammatory effects of paricalcitol in HD patients. In a randomized placebo controlled study, Moe et al.²⁶ did not found a significant effect of paricalcitol on cytokine release from isolated monocytes. However, the study by Moe et al. shows remarkable differences regarding the present work: (1) In that study only patients with low PTH concentrations (<200 pg/mL) were included, and therefore, mean PTH

level at baseline was clearly reduced as compared with our study (190 pg/mL vs. 317 pg/mL). Moreover, the high standard deviation observed for the PTH values [183] indicates that a number of patients presented an inadequately low PTH concentration. (2) In our study, paricalcitol was administered daily, whereas in the study by Moe et al. this drug was administered intravenously thrice weekly. In keeping with paricalcitol pharmacokinetics, little of the active agent remains in the circulation after 24 hours, and therefore, the serum concentration of this drug would be lowest at the start of the dialysis session, when blood for cellular studies was drawn. (3) In the study by Moe et al., cytokine production was measured *ex vivo* in response to soluble stimuli after PBMC isolation, incubation and stimulation, whereas in our study we directly measured the serum concentration of cytokines. On the other hand, only one previous study has analyzed the effects of paricalcitol administration on the serum inflammatory profile in HD patients. In that work, Stubbs et al.²⁷ observed that after paricalcitol administration to seven HD patients, serum levels of TNF- α and IL-6 did not experienced significant changes. However, this study was not primarily designed to evaluate the anti-inflammatory effect of paricalcitol therapy, and more important, those patients had received cholecalciferol supplementation for 8 weeks before paricalcitol administration.

The next significant finding in our study was the effect of paricalcitol on the cytokine gene expression profile of PBMC. Inflammation is characterized by activation of immune competent cells in the peripheral blood with production of inflammatory cytokines. In addition, activation and influx of PBMC from the circulation into the vascular wall is a critical step in the pathogenesis of atherosclerosis.^{28,29} From a clinical perspective, an increased expression of inflammatory cytokines in PBMC has been related to cardiovascular disease.^{30,31} Recent works demonstrated that mononuclear cells from HD subjects evidence characteristics of primed prestimulated proinflammatory cells.³² Little is known about the transcriptional impact of paricalcitol on PBMC *in vivo*, and to the best of our knowledge, this is the first report showing that, in addition to a decrease in the serum concentrations of pro-inflammatory cytokines, paricalcitol administration produces a beneficial effect on the inflammatory cytokine gene expression pattern of PBMC from HD patients. Specifically, after 12 weeks of paricalcitol therapy, mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 reduced by approximately 20%, with a concomitant and similar percent increase in the expression level of the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Although presenting novel information, we acknowledge that there are several limitations to this investigation. First, and the main of them, is the absence of a comparative group, especially patients treated with calcitriol. However, since the general care and therapeutic approach to the

patients did not change during the study, the results were assumed to be due to paricalcitol administration. Other limitations are the small number of patients and the short-term follow-up of our study. These aspects, together with the possibility that acute changes in cellular profile may not translate to chronic modifications within this cell population, not making it possible to draw solid and definitive conclusions. Finally, we based our determinations on single measurements of inflammatory markers that are subjected to certain variability.

In conclusion, paricalcitol administration to HD patients is associated with a beneficial effect on the inflammatory serum and cytokine gene expression profile of PBMC. This results in a favourable impact on the disbalance between pro-inflammatory (IL-6 and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, an important factor promoting atherosclerosis in CKD. These anti-inflammatory effects may be a contributing factor to the survival benefits of paricalcitol observed in clinical studies, although prospective long-term trials are needed for further assessment of their impact on morbidity, mortality and clinical outcomes.

Acknowledgments

This study was partially funded by Spanish Society of Nephrology and ACINEF. Research activity by J.F.N.G. is supported by "Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora" (ISCIII/Comunidad Autónoma de Canarias).

Declaration of Conflicting Interests

None.

References

- Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis. *Kidney Int.* 1999;55:648–658.
- Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton)*. 2006;11:36–41.
- Jofré R, Rodríguez-Benítez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:S274–S280.
- Tetta C, David S, Mariano F, De Nitti C, Panichi V. Alterations of the cytokine network in hemodialysis. *J Nephrol.* 2001;14:S22–S29.
- Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, et al. IL-10, IL-6, and TNF- α . Central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67:1216–1233.
- Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Batlle D. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2003;63:1483–1490.
- Fryer RM, Rakestraw PA, Nekane M, et al. Differential inhibition of renin mRNA expression by paricalcitol and calcitriol in C57/BL6 mice. *Nephrol Physiol.* 2007;106:76–81.
- Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* 2007;72:709–715.
- Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D Receptor-mediated sequestration of NF- κ B signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1741–1752.
- Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009;76:1248–1257.
- He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/ β -catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:90–103.
- Guerrero F, Montes de Oca A, Aguilera-Tejero E, Zafra R, Rodríguez M, López I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated to inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:2206–2212.
- Alborzi P, Patel NA, Peterson C, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension.* 2008;52:249–255.
- Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol. *N Engl J Med.* 2003;349:446–456.
- Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int.* 2006;69:33–43.
- Swaminathan S, Shah SV. Novel inflammatory mechanisms of accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Kidney Int.* 2011;80:453–463.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86:515–581.
- Boström K. Proinflammatory vascular calcification. *Cir Res.* 2005;96:1219–1220.
- Al-Aly Z. Arterial calcification: a tumor necrosis factor- α mediated vascular Wnt-opathy. *Transl Res.* 2008;151:233–239.
- Shlipak MG, Fried LF, Crump E, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation.* 2003;107:87–92.
- Zocalli C, Tripepi G, Mallamachi F. Dissecting Inflammation in ESRD: do cytokines and C-reactive protein have a complementary prognostic value for mortality in dialysis patients? *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:S169–S173.
- Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and predialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;77:550–556.
- Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA.* 2011;306:2107–2113.
- Valdivielso JM, Ayus JC. Role of vitamin D receptor activators on cardiovascular risk. *Kidney Int.* 2008;74:S44–S49.
- Cunningham J, Zehnder D. New vitamin D analogs and changing therapeutic paradigms. *Kidney Int.* 2011;79:702–707.
- Moe SM, Zekonis M, Harezlak J, et al. A placebo-controlled trial to evaluate immunomodulatory effects of paricalcitol. *Am J Kidney Dis.* 2001;38:792–802.
- Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:353–361.
- Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165–197.
- Nathan C. Points to control in inflammation. *Nature.* 2002;420:846–852.
- Kostulas N, Pelidou S, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1 β , IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke.* 1999;30:2174–2179.
- Akatsu T, Nakamura M, Satoh M, Hiramori K. Increased mRNA expression of tumour necrosis factor- α and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci.* 2003;105:39–44.
- Ramirez R, Carracedo J, Berdud I, et al. Microinflammation in hemodialysis is related to a preactivated subset of monocytes. *Hemodial Int.* 2006;10:S24–S27.

Capítulo II

Expresión del sistema FGF-23/KLOTHO en tejido vascular humano.

Javier Donate-Correa, Carmen Mora-Fernández, Rafael Martínez-Sanz, Mercedes Muros-de-Fuentes, Horacio Pérez, Beatriz Meneses-Pérez, Violeta Cazaña-Pérez, Juan F. Navarro-González.

Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue.

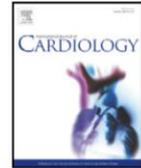
International Journal of Cardiology 2013;165:179-83



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard



Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue

Javier Donate-Correa^a, Carmen Mora-Fernández^a, Rafael Martínez-Sanz^b, Mercedes Muros-de-Fuentes^c, Horacio Pérez^d, Beatriz Meneses-Pérez^a, Violeta Cazaña-Pérez^a, Juan F. Navarro-González^{a,e,*}

^a Research Unit, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^b Cardiovascular Surgery Service, Hospital Universitario de Canarias, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^c Clinical Biochemistry Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^d Cardiology Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^e Nephrology Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2011

Received in revised form 26 August 2011

Accepted 30 August 2011

Available online 25 September 2011

Keywords:

Human aorta

Fibroblast growth factor 23

KLOTHO

Real time PCR

Gene expression

ABSTRACT

Background: Fibroblast growth factor (FGF)-23 levels have been associated with impaired vasoreactivity, increased arterial stiffness, and cardiovascular morbi-mortality, whereas a protective function of KLOTHO against endothelial dysfunction has been reported. Since expression of the FGF23–KLOTHO system in human vascular tissue remains unproved, we aimed to study the expression of FGF23, FGF receptors (FGFR) and KLOTHO in human aorta. In addition, we analyzed the FGF23–KLOTHO expression in occlusive coronary thrombi.

Methods: Thoracic aorta specimens from 44 patients underwent elective cardiac surgery, and thrombus material from 2 patients with acute coronary syndrome (ACS), were tested for FGF23–KLOTHO system expression. **Results:** Expression of KLOTHO (mean expression level 4.85 ± 5.43 , arbitrary units) and two of the three cognate FGFR (FGFR-1 and -3) were detected and confirmed by RT-PCR, sequencing and qRT-PCR. KLOTHO expression was confirmed within occlusive coronary thrombi from patients with ACS. However, expression of FGF23 and FGFR4 was not observed. We also detected the aortic expression of membrane-anchored A Disintegrin and Metalloproteinases (ADAM)-17, the enzyme responsible for the shedding of KLOTHO from the cell surface, and the anti-inflammatory cytokine interleukin (IL)-10. Interestingly, in aortic samples there was a direct association between KLOTHO mRNA levels and those of ADAM-17 and IL-10 ($r = 0.54$, $P < 0.001$; $r = 0.51$, $P < 0.01$, respectively).

Conclusions: Human vascular tissue expresses members of the FGF23–KLOTHO system, indicating that it can be a direct target organ for FGF23. In addition, KLOTHO expression is also detected in occlusive coronary thrombi. These findings suggest a putative role of FGF23–KLOTHO axis in human vascular pathophysiology and cardiovascular disease.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fibroblast growth factor (FGF)-23 is a recently discovered phosphaturic hormone synthesized and secreted by bone cells, mainly osteoblasts. This hormone acts primarily on the kidney, where it induces phosphaturia and suppresses vitamin D synthesis, regulating phosphate homeostasis [1]. FGF23 belongs to a subgroup of the FGF ligand superfamily called endocrine FGFs [2,3], which, unlike paracrine and/or autocrine FGFs, possess differential features in their binding domains that allow them to enter into systemic circulation, but also determine them to require one or more cofactors to activate FGF receptors (FGFRs). Thus, FGF23 has very low affinity to FGFRs

and it requires Klotho to bind and activate the cognate FGFRs under physiological concentration [4].

Since most tissues express FGFRs, presence of Klotho determines FGF23 target organs. The cognate FGFRs activated in the presence of transmembrane cofactor Klotho are FGFR1, 3 and 4 [5–7]. This represents a novel mechanism for confining target organs in redundant ligand–receptor interactions [2]. Until now, the organs described to express Klotho are distal convoluted tubules in the kidney, choroid plexus in the brain and also parathyroid gland, placenta, ovary, testis, small intestine, prostate, and sinoatrial node of the heart [8,2,5,9,10].

Recent studies have reported that higher serum FGF23 levels, even within the normal range, are independently associated with impaired vasoreactivity and increased arterial stiffness [11]. Moreover, in patients with stable coronary artery disease, higher FGF23 has been demonstrated to be independently associated with cardiovascular events and mortality [12]. On the other hand, secreted form of Klotho protein, formed by proteolytic cleavage on the cell surface by membrane-anchored A

* Corresponding author at: Nephrology Service, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, 38010. Santa Cruz de Tenerife, Spain. Tel.: +34 922 60 20 61; fax: +34 922 60 05 62.

E-mail address: jnavgon@gobiernodecanarias.org (J.F. Navarro-González).

Desintegrin and Metalloproteinases (ADAM)-17 and -10, may also function as a humoral factor [13], and has been potentially related to protective mechanism against endothelial dysfunction by upregulating the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) in vascular tissue [14]. Therefore, emerging evidence suggests that FGF23 and KLOTHO are factors potentially related to cardiovascular morbidity and mortality, raising the question whether FGF23–KLOTHO axis is involved in vascular pathology. Most of the works in this area have been done in vitro or in animal tissues, but the expression of FGF23, FGFRs and KLOTHO in human vascular tissue remains unproved. Therefore, we aimed to study the expression of members of the FGF23–KLOTHO axis in human aortic vascular tissue and also analyzed the expression of ADAM-17 and IL-10, factors related to KLOTHO functionality. In addition, we evaluated the expression of FGF23 and KLOTHO in coronary thrombi obtained from patients with acute coronary syndromes (ACS).

2. Materials and methods

2.1. Patients

Thoracic aorta specimens were obtained from 44 consecutive patients (9 females, 35 males; mean age of 64.7 ± 9.3 years) who underwent elective cardiac surgery (coronary artery bypass surgery in 37 patients and replacement valvular surgery in 7 patients) at the Hospital Universitario de Canarias (Tenerife, Spain). Thrombus samples were collected using aspiration catheter from the site of coronary occlusion during primary percutaneous coronary intervention in two patients with ACS at the Cardiology Service of the Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (Tenerife, Spain). Informed consent was obtained from all patients, and the study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.

2.2. RNA extraction

Samples, including the aspirated thrombi (the harvested thrombi were previously separated from blood using a sieve), were immediately placed in RNAlater® (Ambion (Europe) Limited, UK) solution and stored at 4 °C for subsequent RNA extraction. Total RNA was isolated from tissues kept on ice after complete homogenization in TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) employing TissueRuptor (Qiagen, Hilden, Germany) and further purified using RNeasy Mini kit (Qiagen), according to manufacturer's specifications. Quality of extracted RNA was tested using an Expiration™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) to ensure that 28S and 18S rRNA bands were clearly evident. RNA was quantified using a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop, USA). Only samples with an appropriate yield of intact RNA were used. The cDNA was obtained using a High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions to be used in RT-PCR and in quantitative RT-PCR.

2.3. RT-PCR

Using the obtained human aorta and thrombi cDNAs as template, target sequences were amplified by PCR using previously described intron-spanning primers and protocol parameters for FGFRs [15], KLOTHO [16] and FGF23 [17]. Primers are depicted in Table 1. To test the possibility of generation of PCR products from genomic DNA contamination we included a negative control that excludes reverse transcriptase. PCR products were run on a 2% agarose gel with at least two standard lanes 100 bp DNA ladder (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and then stained with 0.5 ng/ml of ethidium bromide solution and visualized under UV illumination. RT-PCR products were submitted to sequencing to confirm that the correct PCR products were amplified. DNA was extracted from agarose fragments excised from the gels using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Automated sequencing was carried out in an ABI 3500 genetic analyzer with BigDye fluorescent terminator chemistry (Applied Biosystems).

Table 1
Primer pairs used for FGF23, KLOTHO and FGF receptor RT-PCR.

Gene	Primers (5' to 3')		Product size (bp)	Reference
	Forward	Reverse		
FGF23	taccacctcgatccaca	gtttgctgaggatggta	649	17
KLOTHO	actccccagtcaggtggcgta	tggcccgggaaccattgctgc	349	16
FGFR1	taccaccgacaagaagatgg	ctggctgtggaagtcactct	287	15
FGFR2	tggagcagtcgctcaccg	cttcaggcctggcagaactgt	352	15
FGFR3	caccaccgacaaggagcta	gctcgactcggagacatt	433	15
FGFR4	gggtcctgctgagtgtgc	gggtaactgtgctatttcg	406	15

Primer sequences used to identify FGF23, KLOTHO and FGF receptors mRNA from human aorta by RT-PCR, expected product size and references.

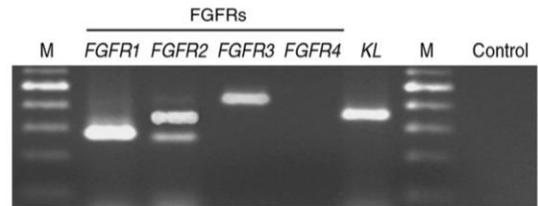


Fig. 1. RT-PCR products of the four FGFRs mRNA tested and KLOTHO (KL) mRNA showing expression of FGFR1, 2, 3 and KLOTHO in human aorta. M, 100-bp marker. Control, RT-PCR without reverse transcriptase.

2.4. Quantitative real time PCR

Transcripts encoding for KLOTHO, ADAM-17, IL-10 and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were measured by TaqMan real-time quantitative PCR (qRT-PCR) with TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). TaqMan Gene Expression Assays for each transcript (Hs00183100_m1 [KLOTHO], Hs01041915_m1 [ADAM17], Hs0961622_m1 [IL-10], Hs00221003_m1 [FGF23] and Hs99999905_m1 [GAPDH]) were analyzed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The level of target mRNA was estimated by relative quantification using the comparative method (2^{-ΔΔCt}) [18] by normalizing to GAPDH expression. Quantification of each cDNA sample was tested in triplicate, and a corresponding non-reverse transcriptase reaction was included as a control for DNA contamination.

2.5. Statistical analysis

The fold-change in the expression of the target genes was calculated with Data Assist™ v2.0 Software (Applied Biosystems) and results were exported to SPSS 15.0 for further analysis. Associations between KLOTHO and IL-10 or ADAM-17 mRNA expression levels in aorta were compared using Spearman rank correlation test. A P < 0.05 was considered statistically significant. Data are presented as means ± standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Expression of FGF23–KLOTHO axis components mRNA by RT-PCR

To analyze the expression of the components of the FGF23–KLOTHO axis (FGF23, KLOTHO and FGFRs) in human vascular tissue and thrombi, RT-PCR from cDNA reverse transcribed from extracted RNA was performed. FGF23 expression was not detected in any sample, whereas KLOTHO mRNA expression was demonstrated by obtaining an amplification product of the predicted size in all the specimens tested (Fig. 1). Regarding FGFRs, expression analysis in aortic tissue showed the presence of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 but not FGFR4. The identity of the amplified products was confirmed by sequencing.

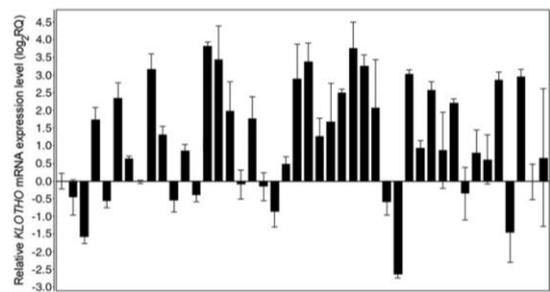


Fig. 2. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) measurements of KLOTHO mRNA expressed in aorta samples from surgery patients (n = 44). Results represent mean of three replicates ± standard deviation. Mean RQ = 4.85 ± 5.43.

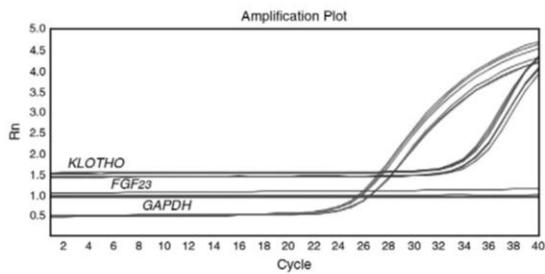


Fig. 3. Amplification curves of quantitative RT-PCR measurements of *KLOTHO* and *FGF23* mRNA showing expression of *KLOTHO* but not *FGF23* in coronary thrombi. Reactions were performed in triplicate.

3.2. Quantitative analysis of *KLOTHO*, *IL-10* and *ADAM-17* expression

As predicted by RT-PCR results, *FGF23* mRNA was not detected by qRT-PCR. However, *KLOTHO* mRNA was also detected by qRT-PCR in all aortic samples (4.85 ± 5.43 , arbitrary units), indicating a constitutive expression of this cofactor independently of the characteristics of the patients included in the study (Fig. 2). By this method, expression analysis of the coronary thrombi also showed the presence of *KLOTHO* but not *FGF23* mRNA (Fig. 3).

In the aortic samples, a preliminary analysis regarding a potential differential expression of *KLOTHO* based on patients' characteristics did not show any significant result when subjects were compared by sex, antecedent of diabetes or hypertension, or presence of atherosclerotic coronary lesions in the coronariographic study (the 7 patients who underwent valvular replacement surgery had a normal coronariography) (data not shown). Likewise, no significant correlation was found between *KLOTHO* mRNA levels and age.

To test the potential interrelationship between aortic mRNA expression levels of *KLOTHO* with those of *IL-10* and *ADAM-17*, qRT-PCR expression analysis for these targets was also performed. Mean values of expression levels for *IL-10* and *ADAM-17* mRNA were 3.45 ± 3.82 and 1.30 ± 0.89 (arb. units) respectively. When we study the potential interrelationship among these variables, correlation analysis demonstrated that *KLOTHO* mRNA concentration was direct and significantly associated with both *ADAM17* and *IL-10* expression levels ($r = 0.54$, $P < 0.001$; $r = 0.51$, $P < 0.01$, respectively) (Fig. 4).

4. Discussion

The main finding of the present study is to characterize the expression pattern of the components of the *FGF23/KLOTHO* system in human aortic vascular tissue. Specifically, our findings demonstrate the expression of *KLOTHO* and two cognate receptors for *FGF23* (*FGFR1* and *FGFR3*), whereas expression of *FGF23* and *FGFR4* was not detected. In addition, we also show that mRNA expression level of *KLOTHO* was direct and significantly correlated with expression levels of *ADAM-17* and *IL-10*. Finally, we show that *KLOTHO* is expressed in occlusive coronary thrombi from patients with ACS.

Most of the works studying the *FGF23-KLOTHO* axis have been performed in vitro or in animal tissues, mainly in organs related to mineral metabolism. However, few studies have focused on the potential role of the *FGF23-KLOTHO* system on human vascular biology [19–22, 12]. *FGF23* acts on its target tissues by binding to and activating its cognate *FGFRs* in the presence of its obligatory coreceptor, *Klotho*. This is a transmembrane protein whose expression determines the tissue specificity of *FGF23*. Therefore, target organs for *FGF23* are defined by the coexpression of membrane *KLOTHO* and *FGFRs*. In the present work we confirm by different techniques, including RT-PCR, sequencing and qRT-PCR, the expression of *KLOTHO* and two of the three cognate *FGF23* receptors, *FGFR1* and *FRGR3*, in human thoracic aorta.

In humans, *FGF23* has been most extensively studied in patients with chronic kidney disease, where higher *FGF23* levels have been independently associated with cardiovascular morbidity and mortality [23]. In addition, higher serum *FGF23* levels, even within the normal range, have been also shown to be independently associated with impaired vasoreactivity and increased arterial stiffness in the community [22,11]. More recently, a subanalysis of the Heart and Soul Study showed that higher *FGF23* concentrations in patients with stable coronary artery disease were associated with a 2-fold greater risk for mortality and cardiovascular events after adjusting for diverse variables, including traditional cardiovascular risk factors, kidney function, and C-reactive protein level [12]. Based on these previous results and the findings of the present work showing that human vascular tissue may be a target organ for *FGF23*, a putative role of *FGF23-KLOTHO* axis in cardiovascular disease is strongly suggested.

At the present time, the actions of *FGF23-KLOTHO* system on human vascular tissue are unknown. One potential action would be a harmful *FGF23*-mediated effect through its binding to *FGFRs* in the vascular wall. *FGF23* synthesis enhances in response to an increase in phosphate levels in order to avoid hyperphosphatemia. Increased

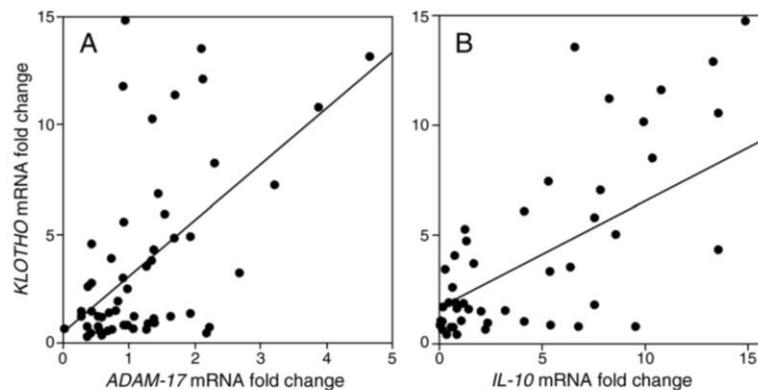


Fig. 4. Correlation between *KLOTHO* mRNA expression and (A) mRNA expression of *ADAM-17* ($r = 0.55$, $P < 0.001$) and (B) mRNA expression of *IL-10* ($r = 0.51$, $P < 0.01$).

levels of FGF23 have been related to a reduction of Klotho expression and vitamin D synthesis [24,25]. Thus, elevated FGF23 concentrations might act on the vascular wall inducing a local reduction of Klotho, a new agent able to ameliorate the calcifying vascular process [26], and vitamin D, a recognized important factor for cardiovascular health [27], which may result in vascular injury and cardiovascular disease. This could be a very exciting novel regulation model that extends the target organs for FGF23 action. Therefore, additional studies are warranted to determine whether the FGF23–KLOTHO axis modulates atherosclerosis development and progression through regulation of mineral metabolism, or if this axis may play a direct role in vascular pathology. Our results indicate that the potential effects of FGF23 in vascular pathophysiology could be explained, at least in part, if considering vascular tissue as a direct target of FGF23 action.

Recent studies have revealed the presence of a soluble form of Klotho with novel functions, including regulation of internalization of ion channels [28,29] and growth factors on the cell surface [30]. Secreted form of Klotho can be formed by proteolytic cleavage on the cell surface by membrane-anchored ADAM-17 [13]. Our data show a strong significant and direct correlation between *KLOTHO* and *ADAM-17* mRNA expression levels suggesting the humoral KLOTHO production from human aorta.

Finally, an endocrine protective function of KLOTHO against endothelial dysfunction has been previously reported [31–33,14,34,35]. A recent experimental study by Wang et al. [36] in spontaneous hypertensive rats demonstrated that *Klotho* gene delivery may upregulate the anti-inflammatory cytokine IL-10, an effect that has been suggested to mediate the antihypertensive and renoprotective actions of Klotho. Our data demonstrate for the first time, that *KLOTHO* is expressed in human vascular tissue, with a direct and significant correlation between *KLOTHO* and *IL-10* mRNA levels. This finding indicates a potential interrelationship between FGF23–KLOTHO axis and inflammatory pathways, which may play a significant role in cardiovascular pathophysiology.

In addition to the findings in vascular samples, our study demonstrates the expression of KLOTHO in occluding coronary thrombi from patients with ACS. Although we could not perform an analysis of cells within thrombi, previous studies have shown that CD14-positive monocytes are the most prominent cell type at the site of occlusion, whereas B-cells, T-cells, and granulocytes are less prevalent within thrombotic material [37], suggesting that monocytes that accumulate in ACS patients within thrombi express KLOTHO.

Although presenting novel information, this study has limitations that need to be pointed out. First, since the majority of our patients were suffering from coronary heart disease, and there are no data regarding the pattern of expression of the various targets studied (FGF23, KLOTHO and FGFRs) in human vascular tissue from healthy subjects, we cannot exclude that the presence of atherosclerotic disease could influence the expression of these elements. However, the consistent expression of these components independent of diverse factors, including hypertension, diabetes or the presence of coronary atherosclerotic lesions, suggests a basal and constitutive expression in aortic vascular tissue. Second, we do not have additional information on which cellular components of the vascular wall express KLOTHO and the FGFRs. Thirdly, serum levels of FGF23 or KLOTHO were not measured in our study, so we cannot establish whether the concentrations of these molecules may be related to the expression levels of the studied targets. Finally, regarding coronary occluding thrombi, although previous studies point to monocytes, we do not specifically know the cell source of KLOTHO expression within thrombi. In addition, there is a variety of pathophysiological variants in ACS, which may display different KLOTHO expression pattern.

In conclusion, to the best of our knowledge, our study reports for the first time the expression profile of FGF23–KLOTHO system in human vascular tissue, providing novel data supporting this tissue as a direct target organ for FGF23. In addition, our results

demonstrate the expression of KLOTHO in coronary occluding thrombi from patients with ACS. These findings indicate a potential role of FGF23–KLOTHO axis in human vascular pathophysiology, suggesting a mechanistic hypothesis regarding the participation of this system in cardiovascular disease. Future studies are required to define the mechanisms and pathways involved in the effects of FGF23–KLOTHO system on vascular tissue and cardiovascular disease.

Acknowledgments

This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (Ref. PI 07/0870). The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology.

References

- [1] Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, et al. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest* 2003;112:683–92.
- [2] Kuro-o M. Overview of the FGF23–Klotho axis. *Pediatr Nephrol* 2010;25:583–90.
- [3] Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:494–8.
- [4] Yu X, Ibrahim OA, Goetz R, et al. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* 2005;146:4647–56.
- [5] Kuro-o M. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:1049–58.
- [6] Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 2006;281:6120–3.
- [7] Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006;444:770–4.
- [8] Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007;117:4003–8.
- [9] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45–51.
- [10] Lee R, Weber TJ. Disorders of phosphorus homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2010;17:561–7.
- [11] Mirza MA, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis* 2009;205:385–90.
- [12] Parker BD, Schurgers IJ, Brandenburg VM, et al. The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Ann Intern Med* 2010;152:640–8.
- [13] Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19796–801.
- [14] Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, et al. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:324–9.
- [15] Cornish EE, Natoli RC, Hendrickson A, Provis JM. Differential distribution of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) on foveal cones: FGFR-4 is an early marker of cone photoreceptors. *Mol Vis* 2004;10:1–14.
- [16] Lee J, Jeong DJ, Kim J, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 2010;9:109.
- [17] Nelson AE, Blich RC, Mirams M, et al. Clinical case seminar: fibroblast growth factor 23: a new clinical marker for oncogenic osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4088–94.
- [18] 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;25:402–8.
- [19] Jo SH, Kim SG, Choi YJ, et al. KLOTHO gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean population. *Int Heart J* 2009;50:23–32.
- [20] Majumdar V, Nagaraja D, Christopher R. Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;403:412–6.
- [21] Milovanova L, Kozlovskaia LV, Milovanov Iu S, Bobkova IN, Dobrosmyslov IA. Mechanisms of phosphorus and calcium homeostatic disorders in the development of cardiovascular events in patients with chronic renal diseases. The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho. *Ter Arkh* 2010;82:66–72.
- [22] Mirza MA, Hansen T, Johansson L, et al. Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3125–31.
- [23] Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008;359:584–92.
- [24] Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004;19:429–35.
- [25] Krajsnik T, Björklund P, Marsell R, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007;195:125–31.
- [26] Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:124–36.

- [27] Reddy-Vanga S, Good M, Howard PA, et al. Role of vitamin D in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2010;106:798–805.
- [28] Cha SK, Hu MC, Kurosu H, et al. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol* 2009;76:38–46.
- [29] Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, et al. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005;310:490–3.
- [30] Kuro-o M. Klotho. *Pflügers Arch* 2010;459:333–43.
- [31] Kuwahara N, Sasaki S, Kobara M, et al. HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging klotho protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Int J Cardiol* 2008;123:84–90.
- [32] Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, et al. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol* 2002;89:149–56.
- [33] Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, et al. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:767–72.
- [34] Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, et al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation* 2004;110:1148–55.
- [35] Wang HL, Xu Q, Wang Z, et al. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. *Clin Chim Acta* 2010;411:386–90.
- [36] Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension* 2009;54:810–7.
- [37] Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, et al. Cellular actors, toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2010;31:1457–69.

Capítulo III

Los bajos niveles de KLOTHO están asociados con la incidencia y la severidad de la enfermedad arterial coronaria.

**Juan F. Francisco-González, Javier Donate-Correa, Mercedes Muros-de-Fuentes,
Horacio Pérez-Hernández, Rafael Martínez-Sanz, Carmen Mora-Fernández.**

***Reduced Klotho is associated with the presence and severity of
coronary artery disease.***

Heart 2014;100(1):34-40

ORIGINAL ARTICLE

Reduced *Klotho* is associated with the presence and severity of coronary artery disease

Juan F Navarro-González,^{1,2} Javier Donate-Correa,¹ Mercedes Muros de Fuentes,³ Horacio Pérez-Hernández,⁴ Rafael Martínez-Sanz,⁵ Carmen Mora-Fernández¹

¹Research Division, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

²Nephrology Service, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

³Clinical Analysis Service, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

⁴Cardiology Service, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

⁵Cardiovascular Surgery Service, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Spain

Correspondence to

Dr Juan F Navarro-González, Research División, University Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Carretera del Rosario, 145, Santa Cruz de Tenerife 38010, Spain; jnavgon@gobiernodecanarias.org

Received 29 July 2013

Revised 25 September 2013

Accepted 30 September 2013

To cite: Navarro-González JF, Donate-Correa J, Muros de Fuentes M, et al. *Heart* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/heartjnl-2013-304746

ABSTRACT

Objective *Klotho* is involved in vascular health. We aimed to analyse in a cross-sectional study the relationship between *Klotho* and human coronary artery disease (CAD).

Methods The study included 371 subjects who underwent coronary angiography and 70 patients who underwent elective cardiac surgery recruited between May 2008 and June 2009. The presence and severity (stenosis index) of CAD, cardiovascular risk factors, *Klotho* gene expression in the thoracic aorta, and serum soluble *Klotho* concentrations were evaluated.

Results The soluble *Klotho* concentration was lower ($p<0.001$) in patients with significant CAD ($n=233$). The maximal stenosis observed in every epicardial artery and the stenosis severity index was significantly lower in patients within the higher soluble *Klotho* concentrations ($p<0.0001$). Multiple regression analysis showed that serum *Klotho* concentrations were inverse and significantly associated with CAD (adjusted $R^2=0.67$, $p<0.001$). Multivariate logistic regression analysis showed that risk factors for significant CAD included age, diabetes, smoking and inflammation, whereas high serum *Klotho* values were associated with a lower risk for CAD. Lower mRNA expression level of *Klotho* was observed in 46 patients with significant CAD, as compared with subjects without CAD ($p=0.01$). Logistic regression analysis showed that high *Klotho* gene expression was independently associated with lower risk for CAD.

Conclusions Patients with significant CAD present lower soluble concentrations of *Klotho*, as well as reduced levels of *Klotho* gene expression in the vascular wall. Reduced serum *Klotho* concentrations and decreased vascular *Klotho* gene expression were associated with the presence and severity of CAD independently of established cardiovascular risk factors.

INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) remains the leading cause of death in the world.¹ The risk of cardiovascular disease (CVD) can be quantified by associations among classical risk factors, but the susceptibility, severity, and progression of CAD is not completely explained by these factors. Thus, new biological systems could provide important additional information to improve our understanding of atherosclerotic disease biology and the assessment of cardiovascular risk.

Klotho, a gene originally identified in 1997 that encodes a novel protein, has been postulated as a regulator of the human aging process.² Deletion of

Klotho causes a phenotype similar to premature human aging, including endothelial dysfunction, progressive atherosclerosis, and shortened lifespan.³ There are two forms of the *Klotho* protein: (1) a transmembrane protein with a small intracellular carboxy-terminal domain and a large extracellular amino-terminal domain composed of two internal repeat sequences (KL1 and KL2), which is predominantly expressed in the kidney, although very recent studies have demonstrated its expression in human arteries^{4, 5}; and (2) two putative soluble proteins generated either from direct secretion by the cell due to an alternative splicing of the *Klotho* gene that leads to the production of a single KL1 domain, or from proteolytic cleavage of the extracellular domain of the membrane-bound form by secretases, that generates both full KL1-KL2 extracellular domain and/or the KL1 domain.^{6, 7} These soluble forms are found in the cerebrospinal fluid, urine, and blood.

Normal aging is associated with a reduction in the renal expression and serum and urine concentrations of *Klotho*, which is also observed in diseases characterised by premature vascular aging, such as renal failure, hypertension (HT), and diabetes mellitus (DM).^{8, 9} *Klotho* is involved in the protection of vascular health through different mechanisms, including inhibition of angiotensin II-induced reactive oxygen species production, protection against cell apoptosis and senescence, and modulation of inflammation.^{10–12} Therefore, *Klotho* has been suggested as a master regulator of CVD,¹³ with a potential role in the pathogenesis of atherosclerosis.¹⁴

Genetic studies have shown that variants of the *Klotho* gene are associated with atherosclerotic disease,^{15–17} and only one study has shown a significant association between higher plasma *Klotho* and lower risk of CVD.¹⁸ However, no studies have examined the relationship between serum and gene expression levels of *Klotho* and CAD. We conducted a cross-sectional study to test the hypothesis that reduced serum *Klotho* concentrations and decreased vascular *Klotho* gene expression are associated with the presence and severity of CAD.

METHODS**Study population**

Between May 2008 and June 2009, consecutive patients >18 years of age undergoing non-emergency coronary angiography as part of a diagnostic evaluation for CAD were considered for initial enrolment to study the relationship between soluble *Klotho* and CAD. Exclusion criteria were

Coronary artery disease

previous myocardial infarction, coronary angioplasty, intracoronary stent placement or coronary artery bypass graft surgery (CABG), haemodynamic instability, cardiac arrhythmia, immunologic or inflammatory diseases (such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, or inflammatory bowel disease), or renal failure (defined as an estimated glomerular filtration rate <60 mL/min/1.73 m²).¹⁹ To study the relationship between *Klotho* gene expression and CAD, thoracic aorta specimens were obtained from 144 consecutive patients who underwent elective CABG or valvular replacement surgery. No patient was receiving calcium, phosphate or vitamin D supplementation. All the protocols complied with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and were reviewed and approved by the institutional ethics committee. Written informed consent was obtained from all participants.

Coronary angiography

Coronary angiography was performed using standard techniques. Angiograms were analysed blinded to the blood test results for serum *Klotho* and the gene expression analysis. Four major epicardial arteries were considered for assessment of coronary stenosis: left main coronary artery, left anterior descending artery, circumflex artery, and right coronary artery. A stenosis severity index (SSI) was defined as the average of the maximum stenosis in each of those arteries. Two groups were defined: (1) no significant CAD, comprising subjects with normal coronary arteries (0% stenosis) and patients with lesions of 1–49% stenosis in any epicardial coronary artery; and (2) significant CAD (SCAD), defined as the presence of at least one lesion leading to $\geq 50\%$ lumen diameter stenosis of any of these arteries.²⁰

Biochemical variables

Blood samples were drawn in the morning after an 8–10 h overnight fast before angiography. Samples were collected in Vacutainer SST tubes, and serum was immediately obtained and frozen in cryovials at -80°C . Serum high sensitive C reactive protein (hs-CRP) was measured by a high sensitivity particle enhanced immunoturbidimetric assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a Cobas 6000 analyser. The assay functional sensitivity was 0.3 mg/L and the intra- and inter-assay coefficient of variations (CVs) were 1.6 and 8.4, respectively. Circulating *Klotho* concentration was measured by a solid phase sandwich ELISA (Immuno-Biological Laboratories (IBL), Takasaki, Japan). The sensitivity was 6.15 pg/mL, and the intra-assay and inter-assay CVs were 3.1% and 6.9%, respectively. This assay uses two kinds of highly specific antibodies that recognise a tertiary protein structure of an extracellular domain of *Klotho*. As a consequence, with this assay both forms of circulating *Klotho* are measured (the shed product of the ectodomain of the membrane bound form, and the *Klotho* protein that originates from alternate splicing of the *Klotho* gene).²¹ Briefly, standards or samples are added to the precoated plate wells and incubated for 60 min at room temperature, followed by washing and then by the addition of labelled antibody solution with an additional incubation for 30 min. After a new wash, a TMB (3,3',5,5'-Tetra Methyl Benzidine) solution is added to each well, and the reaction is terminated by the addition of a sulphuric acid solution. The colour change is measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm within 30 min after addition of the stop solution.

A very recent study evaluated the quality of the three commercially available *Klotho* assays, and found that the IBL assay is the only one that provides information on the epitopes against which their antibodies are directed. In addition, this assay

offered the best results after evaluation of different tests including within-run variation, between-run variation, matrix effects, linearity, and recovery.²² Finally, this assay has demonstrated its performance in other settings, such as in neonates, where soluble *Klotho* may have an impact on vitamin D metabolism and oxidative stress,²³ in endocrine disorders such as acromegaly, because soluble *Klotho* appears to be a new biomarker reflecting disease activity,²⁴ and in chronic kidney disease (CKD), because reduction in serum soluble *Klotho* has been independently associated with signs of vascular dysfunction in these patients.²⁵

Vascular expression of *Klotho*: RNA extraction, RT-PCR and qRT-PCR

Thoracic aorta samples were immediately placed in RNAlater solution (Ambion Limited, UK) and stored at 4°C . Total RNA was isolated after complete homogenisation in TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and further purified using RNeasy Mini kit (Qiagen). An adequate quality of extracted RNA was tested using an Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). RNA was quantified using a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop, USA). The cDNA was obtained using a high capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) to be used as a template in retro-transcriptase PCR (RT-PCR) and in quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Target sequences were amplified by RT-PCR using previously described intron-spanning primers and protocol parameters for *KLOTHO* mRNA.²⁶ Primers (5' to 3') are: forward, *actccccagtcagggtggcggtgta*; reverse, *tgggcccggaacacattgctgtc*. RT-PCR products were sequenced to confirm that the correct PCR products were amplified. Automated sequencing was carried out in an ABI 3500 genetic analyser with BigDye fluorescent terminator chemistry (Applied Biosystems). Transcripts encoding for *KLOTHO* and *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* were measured by TaqMan qRT-PCR with TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). TaqMan Gene Expression Assays for each transcript (Hs00183100_m1 (*KLOTHO*) and Hs99999905_m1 (*GAPDH*)) were analysed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The level of target mRNA was estimated by relative quantification using the comparative method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) by normalising to *GAPDH* expression. mRNA levels were expressed as arbitrary units. A corresponding non-reverse transcriptase reaction was included as a control for DNA contamination.

Statistical analysis

Continuous variables are reported as mean \pm SD or median (IQR) as appropriate. Categorical data are presented as frequencies or percentages. Normal distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test; thus, serum and *Klotho* expression levels were naturally log-transformed before incorporation into analysis. Categorical variables between groups were compared using χ^2 test. Differences among groups were analysed by unpaired t test or one-way analysis of variance with Bonferroni post hoc test. Spearman correlation test was used to evaluate the relation between soluble *Klotho* concentrations and other variables. Forward stepwise multiple regression analysis was performed to determine the independent association between patient clinical parameters as potential predictor variables (age, sex, HT, DM, smoking, hyperlipidaemia, body mass index (BMI), serum uric acid, phosphorus and hs-CRP, and soluble *Klotho* concentrations) and severity of CAD expressed as the

SSI as the dependent variable. Collinearity statistics (tolerance and variance inflation factor) were performed in order to detect correlations among the independent variables. A multiple logistic regression was performed to assess independent predictors of the presence of SCAD. For this purpose, we adopted three models: in model 1, we introduced conventional risk factors; in model 2, we additionally included uric acid, BMI, and hs-CRP; finally, in model 3, we adjusted the analysis for the soluble Klotho concentrations. Regarding gene expression analysis, quantification of each sample was tested in triplicate. Data were expressed as arbitrary units, and were logarithmically transformed for statistical analysis. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics V.19 (IBM Corporation, Somers, New York, USA).

RESULTS

Soluble Klotho concentrations and CAD

Four hundred and ninety-one patients were considered for enrolment in the study, and 120 were excluded due to exclusion criteria. Therefore, 371 patients were finally included. Table 1 shows the demographic and laboratory data. Two hundred and thirty-three patients (62.8%) presented with SCAD. The prevalence of HT ($p < 0.05$), DM and smoking ($p < 0.001$) were

higher in this group, which was older in age ($p < 0.01$) and had higher serum hs-CRP values ($p < 0.001$).

Soluble Klotho concentration was significantly lower in patients with SCAD ($p < 0.001$) (figure 1). Likewise, serum Klotho concentrations were lower in patients with DM (318 (236–460) vs 364 (261–816) pg/mL, $p < 0.01$) and in smokers (312 (228–423) vs 442 (263–852) pg/mL, $p < 0.001$). There were no differences in subjects according to the presence of HT or dyslipidaemia. The characteristics of subjects stratified by tertiles of soluble Klotho are shown in table 2. Compared with the other patients, subjects with higher soluble Klotho concentrations (tertile 3) had a significantly lower prevalence of DM and smoking ($p < 0.001$), as well as lower serum concentrations of total cholesterol ($p = 0.01$) and hs-CRP ($p < 0.001$).

Regarding the severity of the coronary lesions, the maximal stenosis observed in every epicardial artery and the SSI were significantly lower in patients within tertile 3 of soluble Klotho concentrations ($p < 0.0001$) (table 2). Subjects with normal coronary arteries (0% stenosis) had higher soluble Klotho concentrations than patients with stenosis $< 50\%$ or with SCAD (933 (761–1071) vs 506 (364–586) and 275 (213–344) pg/mL, respectively, $p < 0.0001$).

Soluble Klotho values correlated significantly and negatively with age ($r = -0.10$, $p < 0.05$), serum phosphorus ($r = -0.13$, $p = 0.01$), hs-CRP ($r = -0.39$, $p < 0.001$), as well as the SSI ($r = -0.69$, $p < 0.0001$). The SSI was also significantly correlated with age ($r = 0.17$, $p < 0.01$) and hs-PCR ($r = 0.65$, $p < 0.0001$). To test the independent association between soluble Klotho and severity of stenosis, forward stepwise multiple regression analysis was performed with the SSI as the dependent variable. The result showed that serum Klotho concentrations were inversely related and significantly associated with CAD (adjusted $R^2 = 0.67$, $p < 0.001$) (table 3). Collinearity was assessed by examining tolerance and the variance inflation factor (VIF) for each variable in the regression. Tolerance and VIF values were higher than 0.80 and lower than 1.25 for all variables, respectively. Therefore, collinearity was excluded.

The multivariate logistic regression modelling results, using the presence/absence of SCAD as the dependent variable, are

Table 1 Clinical characteristics and biochemical assessments of patients included in the study

	Overall	NSCAD	SCAD	p Value
Characteristics				
N (%)	371	138 (37.2%)	233 (62.8%)	
Age (years)	65±11	63±10	66±11	<0.01
Women (%)	33	36.7	30.6	NS
Systolic BP (mm Hg)	142±19	143±18	140±20	NS
Diastolic BP (mm Hg)	77±11	77±11	77±11	NS
Body mass index (kg/m ²)	28.1±4.6	28±4	28±4	NS
Comorbidities				
Diabetes mellitus (%)	40	23	49	<0.001
Hypertension (%)	67	61.5	71	<0.05
Smoking (%)	51	29	61	<0.001
Dyslipidaemia (%)	54	47.5	55	NS
Medication				
RAS blockers (%)	63.0	63.1	64.2	NS
Aspirin (%)	71.4	58.6	78.9	<0.01
Statins (%)	65.7	52.8	73.3	<0.001
Laboratory data				
Total cholesterol (mg/dL)	196±44	197±44	193±43	NS
LDL-C (mg/dL)	117±39	120±39	112±38	NS
HDL-C (mg/dL)	48±12	47±12	48±12	NS
Triglycerides (mg/dL)	151±85	149±81	154±91	NS
Uric acid (mg/dL)	7.2±2.0	7.2±1.9	7.2±2.2	NS
Calcium (mg/dL)	9.4±0.4	9.4±0.4	9.4±0.4	NS
Phosphorus (mg/dL)	3.7±0.6	3.6±0.7	3.7±0.6	NS
hs-CRP (mg/L)*	0.97 (0.46–1.80)	0.50 (0.32–0.86)	1.30 (0.81–2.30)	<0.001
Klotho (pg/mL)*	371 (243–626)	767 (532–995)	275 (212–345)	<0.001

*Data are expressed as median (IQR). BP, blood pressure; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high sensitive C reactive protein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; NS, not significant; NSCAD, non-significant coronary artery disease; RAS, renin-angiotensin system; SCAD, significant coronary artery disease.

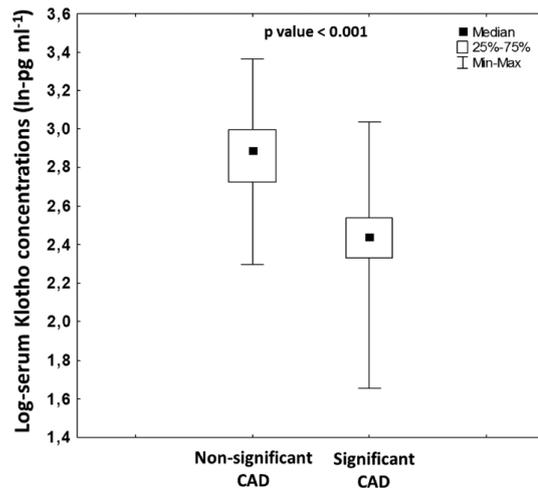


Figure 1 Differences in the log-transformed levels of serum Klotho concentrations in patients with significant and non-significant coronary artery disease (CAD).

Coronary artery disease

Table 2 Clinical characteristics of participants stratified by tertile of soluble Klotho

	Tertile 1 (<275 pg/mL)	Tertile 2 (275–482 pg/mL)	Tertile 3 (>494 pg/mL)	p Value for trend
Characteristics				
N	120	128	123	
Age (years)	66±11	65±11	64±10	NS
Women (%)	31	33	35	NS
Systolic BP (mm Hg)	143±18	142±18	139±20	NS
Diastolic BP (mm Hg)	77±12	77±11	77±11	NS
Body mass index (kg/m ²)	27±4	28±4	28±4	NS
Comorbidities				
Diabetes mellitus (%)	45	47	25	<0.001
Hypertension (%)	69	68	65	NS
Smoking (%)	57	58	31	<0.001
Dyslipidaemia (%)	55	58	49	NS
Laboratory data				
Total cholesterol (mg/dL)	201±48	198±38	188±42	0.01
LDL-C (mg/dL)	121±41	121±36	119±38	NS
HDL-C (mg/dL)	47±11	48±12	47±12	NS
Triglycerides (mg/dL)	147±76	153±84	153±93	NS
Uric acid (mg/dL)	7.2±2.0	7.2±1.9	7.1±2.1	NS
Calcium (mg/dL)	9.4±0.4	9.4±0.4	9.3±0.4	NS
Phosphorus (mg/dL)	3.7±0.5	3.7±0.7	3.6±0.7	NS
hs-CRP (mg/L)*	1.3 (0.8–2.3)	1.1 (0.5–2.1)	0.6 (0.3–0.92)	<0.001
Stenosis severity index (%)	43.5±22.0	33.6±21.7	4.4±10.6	<0.001

*Data are expressed as median (IQR).

BP, blood pressure; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high sensitive C reactive protein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; NS, not significant.

presented in table 4. Traditional risk factors for CVD (age, sex, smoking, HT, DM, hyperlipidaemia) were entered as covariates, with additional models in which BMI, serum uric acid, hs-CRP (model 2), and soluble Klotho concentrations (model 3) were added as covariates. In model 1, age, smoking and DM were independent risk factors for SCAD. In model 2, in addition to the previous factors, hs-CRP was associated with SCAD. Finally, model 3 included soluble Klotho concentrations in addition to all the previous covariates, showing that soluble Klotho concentration is a protective factor for the presence of SCAD.

Vascular expression of Klotho and CAD

From the 144 patients who underwent elective cardiac surgery, 74 were excluded due to different exclusion criteria. Therefore, 70 patients (32 males and 38 females), with a mean age of 65 ± 7 years, were finally included in the study. When comparing patients according to the presence (N=46) or absence (N=24) of SCAD, there were no significant differences in age (64±8 vs 66±7 years), sex or prevalence of HT (65.2% vs 70.8%), DM

(56.5% vs 37.5%) or dyslipidaemia (63% vs 66.6%) in regard to either therapy or general laboratory data. However, patients with SCAD had a higher prevalence of smoking (45.6% vs 12.5%, p<0.001). Interestingly, these subjects showed a significantly lower expression level of Klotho mRNA in the vascular wall (p<0.01) (figure 2). The multivariate logistic regression analysis using the presence/absence of SCAD as the dependent variable, and traditional cardiovascular risk factors and Klotho mRNA levels as covariates, showed that higher Klotho expression levels are associated with a lower risk for SCAD (table 5).

DISCUSSION

Our data show that patients with SCAD had lower soluble concentrations of Klotho, as well as a reduced expression level of Klotho mRNA in the vascular wall. Moreover, the reduced serum Klotho concentrations and decreased vascular Klotho gene expression were associated with the presence and severity of CAD independently of established cardiovascular risk factors such as age, DM, HT, smoking, dyslipidaemia, and inflammation. Whether reduction of soluble Klotho concentrations and vascular klotho expression may directly promote or favour the development and progression of atherosclerosis is an intriguing possibility that requires further study.

Soluble Klotho is considered to act as a humoral factor, whereas the membrane form, which may also be secreted by proteolytic cleavage of the extracellular domain, may act as an autocrine or paracrine factor.^{2 4 14} Klotho mutated mice show multiple age-related disorders observed in humans, including endothelial dysfunction and atherosclerosis. Experimental studies show that klotho is associated with maintenance of endothelial integrity,²⁷ and its actions comprise reduction of oxidative stress and increment of endothelial nitric oxide production, thereby improving endothelium-dependent vasodilatation.²⁸ Furthermore, it decreases cell surface abundance of the

Table 3 Multiple stepwise regression analysis for severity index of coronary stenosis as the dependent variable

Stenosis severity index	β	SE	t	p Value
Independent variable				
Log hs-CRP	0.55	0.73	17.5	<0.001
Log soluble Klotho	-0.36	0.002	-11.1	<0.001
Diabetes	0.13	1.58	4.24	<0.001
Smoking	0.09	1.60	2.73	0.007
Age	0.07	1.60	2.33	0.02
Hypertension	0.07	1.68	2.73	0.02

hs-CRP, high sensitive C reactive protein.

Table 4 Multivariate logistic regression analysis for the presence of significant coronary artery disease

Independent variable	OR (95% CI)	p Value
Model 1		
Age	1.03 (1.01 to 1.06)	0.001
Gender	1.18 (0.70 to 1.99)	0.53
Tobacco	5.12 (3.04 to 8.62)	<0.001
Hypertension	1.37 (0.80 to 2.23)	0.24
Diabetes	3.22 (1.92 to 5.39)	<0.001
Hyperlipidaemia	0.96 (0.59 to 1.55)	0.87
Model 2 (model 1+body mass index, uric acid, hs-CRP, and phosphorus)		
Age	1.03 (1.00 to 1.06)	0.01
Gender	1.02 (0.54 to 1.90)	0.94
Tobacco	4.91 (2.68 to 8.98)	<0.001
Hypertension	1.78 (0.95 to 3.36)	0.07
Diabetes	3.21 (1.78 to 5.87)	<0.001
Hyperlipidaemia	0.90 (0.51 to 1.58)	0.87
Body mass index	0.97 (0.91 to 1.03)	0.34
Uric acid	1.01 (0.88 to 1.16)	0.87
hs-CRP	8.12 (4.52 to 14.58)	<0.001
Phosphorus	1.40 (0.93 to 2.10)	0.10
Model 3 (model 2+soluble Klotho)		
Age	1.03 (1.00 to 1.07)	0.04
Gender	1.41 (0.58 to 3.39)	0.44
Tobacco	3.38 (1.48 to 7.71)	0.004
Hypertension	2.38 (0.98 to 5.78)	0.055
Diabetes	2.75 (1.15 to 6.54)	0.02
Hyperlipidaemia	0.55 (0.24 to 1.26)	0.16
Body mass index	1.01 (0.93 to 1.11)	0.70
Uric acid	0.99 (0.82 to 1.19)	0.96
hs-CRP	12.03 (4.62 to 31.29)	<0.001
Soluble Klotho	0.92 (0.88 to 0.99)	<0.001
Phosphorus	1.14 (0.63 to 2.06)	0.64

hs-CRP, high sensitive C reactive protein.

calcium channel TRPC6, which is expressed in vascular smooth muscle cells (VSMC) and plays an important role in the regulation of vascular resistance and blood pressure.²⁹ Importantly,

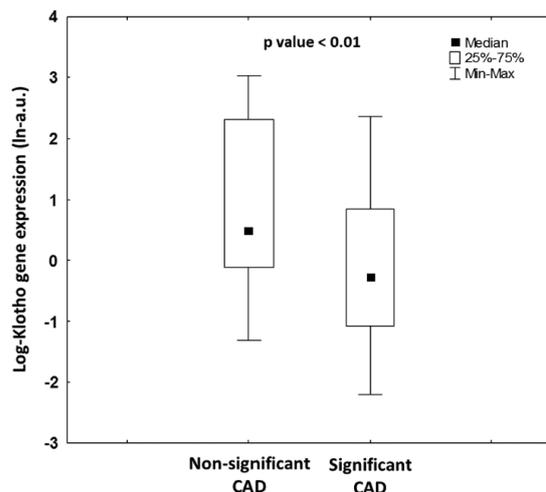


Figure 2 Differences in the log-transformed mRNA levels of Klotho gene expression in the vascular wall of patients with and without significant coronary artery disease (CAD).

soluble klotho administration has been shown to ameliorate the premature aging-related phenotype.³⁰ In addition, it has been suggested that the Klotho protein might play a role in the pathogenesis of atherosclerotic disease.^{2, 14} Studies analysing the relationship between Klotho and CAD in humans are very scarce, and most of them are genetic studies. These show that variants of the *Klotho* gene are associated with carotid atherosclerosis,³¹ stroke,³² and CAD.¹⁵⁻¹⁷ However, soluble Klotho and vascular *Klotho* expression levels were not analysed. Only one previous study¹⁸ has shown that soluble klotho is related to CVD (defined as CAD, heart failure, stroke, or peripheral arterial disease). Similar to our study, Semba *et al*¹⁸ found that soluble Klotho was independently associated with CVD, and that the risk of CVD was lower in subjects with higher Klotho concentrations. From the 1023 subjects in that study, only 51 had CAD. Our study included 371 subjects, with 233 suffering from SCAD. Other important factors in our study include the lower percentage of subjects older than 65 (56.8% vs >90%), since reduced Klotho has been related to older age, and that none of the subjects in our study had renal insufficiency (vs 24% of subjects having CKD in the work by Semba *et al*¹⁸), as CKD has been described as a state of Klotho deficiency.^{33, 34}

Experimental works have demonstrated that Klotho is involved in the pathogenesis of vascular calcification associated with CKD. Hu *et al*³⁴ showed that klotho-deficient mice had undetectable concentrations of Klotho and severe vascular calcification, whereas transgenic mice that overexpressed *Klotho* had preserved Klotho concentrations with a dramatic attenuation of vascular calcification. More recently, Lim *et al*⁴ showed that vascular Klotho deficiency potentiated the development of accelerated vascular calcification. This beneficial action of Klotho has been related to the role of phosphorus in vascular calcification. Elevated phosphate is involved in a number of mechanisms that trigger and advance the progression of vascular calcification, including the transition of VSMC from a contractile to an osteochondrogenic phenotype, the mineralisation of VSMC matrix, the induction of VSMC apoptosis, and the inhibition of monocyte/macrophage differentiation into osteoclast-like cells.³⁵ Phosphate transport into cells is primarily mediated by sodium dependent phosphate cotransporters, of which there are three types. The type I (Npt1 and Npt2) and type II (Npt2a, Npt2b and Npt2c) cotransporters in the kidney and intestinal epithelium play important roles in whole body phosphate homeostasis.³⁶ The type III cotransporters, PiT-1 and PiT-2, are ubiquitously expressed, including expression in VSMC, and play a pivotal role in phosphate-induced VSMC calcification.^{37, 38} Animals lacking klotho had increased expression of these

Table 5 Multivariate logistic regression analysis for the presence of significant coronary artery disease in the vascular Klotho expression study

Independent variable	OR (95% CI)	p Value
Model		
Age	1.01 (0.94 to 1.08)	0.73
Gender	1.00 (0.32 to 3.13)	0.99
Tobacco	4.86 (1.10 to 21.3)	<0.05
Hypertension	1.02 (0.26 to 3.89)	0.97
Diabetes	2.14 (0.65 to 7.04)	0.20
Dyslipidaemia	1.17 (0.29 to 4.58)	0.82
Klotho gene expression	0.85 (0.73 to 0.99)	<0.05

Coronary artery disease

cotransporters and the osteogenic transcription factor CBFA1/RUNX2 in VSMC, indicating that decreased *klotho* drives calcification. Furthermore, when *klotho* is added to VSMC in vitro, it decreases phosphate uptake by suppressing activity of the type III cotransporters and prevents the change of VSMC to an osteochondrogenic phenotype.³⁴ In addition, *Klotho* is a phosphaturic substance acting directly on the Npt2a cotransporter to modulate renal phosphate excretion. Npt2a is the major regulated sodium phosphate cotransporter responsible for proximal tubule phosphate reabsorption, and *Klotho* modulates Npt2a in a biphasic fashion: it acutely decreases its intrinsic transport activity, and in a second phase induces changes in cell surface Npt2a.³⁹

Our work is the first study of vascular *Klotho* expression and CAD in humans. A previous work by our group showed for the first time that the *klotho* gene is expressed in the human vascular wall.⁶ In the present study, we showed that patients with SCAD had a reduced vascular expression level of *Klotho* mRNA. In addition, the relationship between vascular *klotho* expression and CAD was independent of other CV risk factors.

From a mechanistic perspective, *Klotho* is involved in maintaining the health of the vasculature, and therefore disruption of *Klotho* homeostasis may be an important factor in the development of CVD.^{13 40 41} *Klotho* protects against endothelial dysfunction, a key factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Klotho*-deficient mice show increased vascular endothelial permeability, impaired endothelial-dependent vasodilation, reduced excretion of nitric oxide metabolites, and impaired angiogenesis and vasculogenesis.^{9 28 42 43} These dysfunctions completely recovered after parabiosis between wild-type and *klotho*-mutant mice,²⁸ whereas in an animal model of atherosclerotic disease, *klotho* gene delivery resulted in amelioration of endothelial dysfunction, an increase of nitric oxide production, and prevention of adverse vascular remodelling.²⁸ In addition, *klotho* protects endothelial and VSMC from inflammation and oxidation—critical factors in the pathogenesis of vascular disease.^{12 44 45} Finally, the bidirectional relationship between *Klotho* and inflammation is relevant. Both systemic and local inflammation have been related to a decreased renal *klotho* expression,^{46–48} whereas neutralisation of inflammatory cytokines has resulted in reversion of *Klotho* expression and preservation of circulating *klotho* levels.^{47 48} Therefore, it is possible to speculate that atherosclerosis—an inflammatory chronic disorder—is associated with impaired vascular *klotho* expression and reduced soluble *klotho* concentrations, which in turn may potentiate oxidative and inflammatory pathways resulting in development and progression of vascular damage.

Although the present study has some strengths (it was a population-based sample of adults, the presence and severity of coronary disease was carefully analysed, data included conventional cardiovascular risk factors, and CKD—a key confounding factor related to *klotho* deficiency—was excluded), we acknowledge several limitations. First, serum concentrations of vitamin D, fibroblast growth factor-23, and parathyroid hormone—factors related to *Klotho* and calcium phosphate metabolism, with potential impact on vascular calcification and CVD—were not measured in our study, and therefore their possible influence on the relationship between *Klotho* and CAD cannot be completely ruled out. Secondly, the study involved a relatively small sample size, so the findings may not be generalisable to the broader community. Thirdly, although we accounted for confounding of traditional cardiovascular risk factors, a potential for uncontrolled or residual confounding that could affect the *Klotho*–CAD relationship would be plausible. Finally, given the

cross-sectional design of the study, we can only demonstrate associations without definitive inferences on their direction or causality. Nevertheless, this is the first study linking *Klotho* with CAD. Further experimental and clinical studies are warranted to confirm our findings, to explore the effects and relationships of *Klotho* on the cardiovascular system, and to evaluate the role of *Klotho* as a potential novel biomarker of CVD.

Key messages

What is already known about this subject?

Experimental studies have shown that *Klotho* may be a protective factor for vascular health, including protection against atherosclerosis. Regarding clinical studies, it has been shown that variants of the *Klotho* gene might be associated with atherosclerotic vascular disease. Finally, only one previous study has reported that decreased plasma *klotho* concentrations are related to cardiovascular disease in older patients.

What does this study add?

This study presents new evidence on the relationship between *Klotho* and atherosclerotic disease, specifically coronary artery disease. The results of the present study show that patients with significant coronary artery disease have lower soluble concentrations of *Klotho*, as well as a reduced expression level of *Klotho* mRNA in the vascular wall. Moreover, the reduced serum *Klotho* concentrations and the decreased vascular *Klotho* gene expression were associated with the presence and severity of coronary artery disease independently of established cardiovascular risk factors such as age, diabetes, hypertension, smoking, dyslipidaemia, and inflammation. All these findings suggest that reduction of soluble *Klotho* concentrations and vascular *Klotho* expression might promote or favour the development and progression of atherosclerotic vascular disease.

How might this impact on clinical practice?

Soluble *Klotho* concentrations may be useful as a clinical biomarker, resulting in an improvement of cardiovascular risk stratification, both in subjects with suspected cardiovascular disease as well as in patients with established disease. On the other hand, *Klotho* might be a therapeutic target. From this perspective, the increase in soluble *Klotho* concentrations and/or the vascular expression of *Klotho* might be associated with a protective action on the vascular wall, including anti-atherosclerotic effects.

Contributors JFN-G and CM-F conceptualised the study, and designed data collection tools and monitored data collection. JFN-G was the principal investigator. HP-H and RM-S were responsible for recruitment of patients and data collection. JD-C and MMdF were responsible for biochemical measurements and gene expression analysis. JD-C, JFN-G and CM-F analysed the data and wrote the draft of the paper, and all the authors contributed to its revision. All authors revised and approved the final version of the paper.

Funding This study was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI 07/0870 and PI10/0576]; Sociedad Española de Nefrología (SEN2011/2165); ACINEF [012010]. Research activity by JFNG is supported by Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora, ISCIII/Canarias.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval The study was conducted with the approval of the Institutional Ethics Committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- 1 Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442.
- 2 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation on the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45–51.
- 3 Kuro-o M. Klotho. *Pflügers Arch. Eur J Physiol* 2010;459:333–43.
- 4 Lim K, Lu TS, Molostov G, et al. Vascular klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to FGF-23. *Circulation* 2012;125:2243–55.
- 5 Donate-Correa J, Mora-Fernández C, Martínez-Sanz R, et al. Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue. *Int J Cardiol* 2013;165:179–83.
- 6 Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-lida T, et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;242:626–30.
- 7 Chen TH, Kuro-O M, Chen CH, et al. The secreted klotho protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in Klotho mutant mice. *Eur J Pharmacol* 2013;698:67–73.
- 8 Kuro-o M. Klotho and the aging process. *Korean J Intern Med* 2011;26:113–22.
- 9 Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, et al. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:738–46.
- 10 Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, et al. Anti-oxidative effect of klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine* 2007;31:82–7.
- 11 Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, et al. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatr Gerontol Int* 2011;11:510–16.
- 12 Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, et al. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine* 2009;35:341–6.
- 13 Moe SM. Klotho: a master regulator of cardiovascular disease? *Circulation* 2012;125:2181–3.
- 14 Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:827–32.
- 15 Arking DE, Becker DM, Yanek LR, et al. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Human Genet* 2003;72:1154–61.
- 16 Imamura A, Okumura K, Ogawa Y, et al. Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese. *Clin Chim Acta* 2006;371:66–70.
- 17 Jo SH, Kim SG, Choi YJ, et al. Klotho gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean Population. *Int Heart J* 2009;50:23–32.
- 18 Semba RD, Cappola AR, Sun K, et al. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatr Soc* 2011;59:1596–601.
- 19 Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation: modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461–70.
- 20 Patel MR, Dehmer GJ, Hirshfeld JW, et al. Appropriateness criteria for coronary revascularization: a report of the American College Of Cardiology Foundation Appropriateness Criteria Task Force, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Thoracic Surgeons, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, and the American society of Nuclear Cardiology: endorsed by the American Society of Echocardiography, the Heart Failure Society of America, and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *Circulation* 2009;119:e488.
- 21 Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398:513–18.
- 22 Heijboer AC, Blankenstein MA, Hoenderop J, et al. Laboratory aspects of circulating alpha-Klotho. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:2283–7.
- 23 Siahianidou T, Garatzioti M, Lazaropoulou C, et al. Plasma soluble alpha-klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters. *Eur J Endocrinol* 2012;167:433–40.
- 24 Neidert MC, Sze L, Zwimpfer C, et al. Soluble alpha-klotho: a novel biomarker for the activity of GH-producing pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2013;168:575–83.
- 25 Kitagawa M, Sugiyama H, Morinaga H, et al. A decreased level of serum soluble klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *PLoS One* 2013;8:e56695.
- 26 Lee J, Jeong DJ, Kim J, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 2010;9:109.
- 27 Kusaba T, Okigaki M, Matui A, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca2+ channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:19308–13.
- 28 Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, et al. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:324–9.
- 29 Huang CL. Regulation of ion channels by secreted klotho: mechanisms and implications. *Kidney Int* 2010;77:855–60.
- 30 Chen CD, Podvin S, Gillespie E, et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19796–801.
- 31 Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, et al. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension. *Geriatr Gerontol Int* 2010;10:311–18.
- 32 Arking DE, Atzom G, Arking A, et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein, cholesterol, blood pressure, stroke and longevity. *Cir Res* 2005;96:412–18.
- 33 Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, et al. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1015–20.
- 34 Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:124–36.
- 35 Kendrick J, Chonchol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am J Kidney Dis* 2011;58:826–34.
- 36 Takeda E, Taketani Y, Morita K, et al. Sodium-dependent phosphate co-transporters. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:377–81.
- 37 Li X, Yang H, Giachelli C. Role of sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Cir Res* 2006;98:905–12.
- 38 Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PIT-1 and PIT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Published Online First:22 Aug 2013.
- 39 Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J* 2010;24:3438–50.
- 40 Donate-Correa J, Muros de Fuentes M, Mora-Fernández C, et al. FGF23/Klotho axis: phosphorus, mineral metabolism and beyond. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012;23:37–46.
- 41 Shroff R, Shanahan CM. Klotho: an elixir of youth for the vasculature? *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1–3.
- 42 Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, et al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation* 2004;110:1148–55.
- 43 Kusaba T, Okigaki M, Matui A, et al. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca2+ channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:19308–13.
- 44 Liu F, Wu S, Ren H, et al. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011;13:254–62.
- 45 Wang Y, Kuro-O M, Sun Z. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. *Aging Cells* 2012;11:410–17.
- 46 Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, et al. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:920–5.
- 47 Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, et al. Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate klotho in mice with colitis. *Gastroenterology* 2010;138:1384–94.
- 48 Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF-alpha reduce renal klotho expression through NFkappaB. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1315–25.

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Enfermedad Renal Crónica y Enfermedad Cardiovascular

La ERC constituye un importante problema de salud pública, con una incidencia y prevalencia crecientes en las últimas décadas. Uno de los aspectos más relevantes de esta enfermedad es su elevadísima morbimortalidad CV, que es entre 20 y 30 veces superior a la de la población general (Sarnak & Levey, 1999). Más aún, en el proceso evolutivo de la ERC, algunos estudios señalan que estos pacientes tienen mayor probabilidad de morir por un evento CV que de alcanzar un estadio de insuficiencia renal avanzada que precise del inicio de tratamiento renal sustitutivo (Centers for Disease Control and Prevention, 2010). Si nos referimos a la población en diálisis, la ECV es responsable de casi la mitad de las muertes de los pacientes en esta situación (Herzog *et al.*, 1998).

Este riesgo tan elevado es debido, en parte, a la mayor prevalencia de factores de riesgo clásicos como la edad avanzada, la hipertensión arterial (HTA), la diabetes mellitus y la dislipidemia en los pacientes con ERC. Sin embargo, es importante la participación de otros factores de riesgo CV específicos de la enfermedad renal, tales como las alteraciones del metabolismo mineral y la inflamación.

Se han demostrado claramente las implicaciones de los trastornos del metabolismo mineral, en especial de la hiperfosforemia, en la progresión de la ERC, en el desarrollo del HPTS y la osteodistrofia renal. Más allá de ello, estos trastornos han pasado a ocupar un lugar de gran relevancia en la patogénesis del daño vascular (Bhan & Thadhani, 2009), relacionándose con la aparición de complicaciones CVs y contribuyendo de un modo significativo al aumento de la morbimortalidad observado en estos pacientes.

Por otra parte, nuestro conocimiento sobre la ERC ha ido ampliándose a lo largo de los últimos años, modificando sustancialmente la concepción clásica de la misma. De este modo, actualmente se reconoce que la inflamación es una condición altamente prevalente en el paciente renal, siendo especialmente pronunciada en los estadios más avanzados de la ERC y en los pacientes sometidos a hemodiálisis (Stenvinkel, 2006). Este estado inflamatorio, donde diversas moléculas, entre ellas las citoquinas inflamatorias, juegan un papel clave, es determinante en la aparición de diversas complicaciones (Stenvinkel *et al.*, 2005), incluyendo el desarrollo y la progresión de la lesión vascular (Reiss & Glass, 2006), siendo asimismo un potente predictor independiente de mortalidad (Zimmermann *et al.*, 1999; Stenvinkel *et al.*, 2006; Jofré *et al.*, 2006).

I.2. Homeostasis mineral: una nueva perspectiva.

Nuestra comprensión del mecanismo de regulación homeostática del fósforo, así como de las interrelaciones fisiopatológicas de este elemento, han experimentado un gran avance en el último decenio. Entre estos novedosos aspectos destaca la descripción de un nuevo sistema de regulación del metabolismo mineral, el sistema compuesto por el FGF-23 y la proteína Klotho, reconocido actualmente como el principal regulador de la homeostasis del fósforo.

De forma clásica, se ha considerado que la regulación de los niveles de calcio y fósforo séricos dependía de la interacción de dos factores, la vitamina D activa o calcitriol (1,25-dihidroxitamina D₃) y la hormona paratiroidea (HPT), a través de sus acciones sobre los procesos de absorción intestinal, movilización ósea y excreción renal (Berndt & Kumar, 2009; Dusso *et al.*, 2005). El calcitriol, sintetizado en su forma activa en el riñón, actúa en el intestino aumentando la absorción del fósforo y el calcio provenientes de la dieta, y en el hueso, promoviendo la movilización de estos iones. Como resultado, sus niveles sanguíneos tienden a incrementarse. Por su parte, la HPT, secretada por las glándulas paratiroideas en respuesta a situaciones de hipocalcemia, promueve la resorción ósea y estimula la síntesis de calcitriol en el riñón. Además, la HPT induce fosfaturia al disminuir la reabsorción renal de fósforo, siendo el efecto final de esta hormona la elevación de los niveles de calcio sin que se produzca un aumento concomitante de la concentración de fósforo (Berndt & Kumar, 2009). Sin embargo, estudios recientes han identificado un nuevo regulador de la homeostasis del fósforo, el FGF-23 (Shimada *et al.*, 2001; Shimada, Hasegawa *et al.*, 2004). Esta hormona, sintetizada en el hueso en respuesta a la ingestión de fosfato en la dieta (Antoniucci *et al.*, 2006), es considerada como el principal regulador de la fosfatemia (Mirams *et al.*, 2004), actuando sobre los riñones y las glándulas paratiroideas (Shimada *et al.*, 2001; Consortium ADHR, 2000; Kuro-o, 2010a; Fukumoto & Yamashita, 2007).

A nivel renal, el FGF-23 bloquea la expresión de los cotransportadores sodio-fosfato tipo 2 (Na/Pi-2a y Na/Pi-2c), responsables de la reabsorción tubular de fósforo, con lo cual se produce un incremento en la excreción urinaria de este ión. También en el riñón, el FGF-23 inhibe la síntesis de la forma activa de la vitamina D, lo cual resulta en una reducción de la absorción intestinal de fósforo. Esta acción está claramente definida por el efecto diferencial que ejerce sobre la expresión génica de las dos enzimas que regulan el nivel de 1,25-(OH)₂ D₃ (**Tabla I.1**). Así, por una parte, el FGF-23 provoca la disminución de la expresión del gen *Cyp27b1*, que codifica la enzima 1 α -hidroxilasa, responsable de la conversión de la 25-hidroxitamina D₃ a calcitriol, mientras que por otro lado, estimula la

vía de degradación de esta hormona a través de la estimulación de la expresión del gen *Cyp24*, que codifica la enzima 24-hidroxilasa, responsable de la inactivación de la 1,25-(OH)₂ D₃ (Liu *et al.*, 2006; Wang & Sun, 2009a). Finalmente, el FGF-23 actúa sobre las glándulas paratiroides reduciendo la síntesis de HPT, disminuyendo así la resorción de fósforo en el hueso (**Tabla I.1**).

Tabla I.1 Funciones fisiológicas del FGF-23

	Actividad	Efecto
Riñón	Descenso en la expresión de los cotransportadores Na/Pi-2a y 2c.	Inhibición de la reabsorción de fosfato.
	Descenso de la expresión de 1 α -hidroxilasa.	Descenso de los niveles séricos de 1,25 dihidroxivitamina D.
	Incremento de la expresión de 24-hidroxilasa.	Descenso de los niveles séricos de 1,25 dihidroxivitamina D.
Paratiroides	Inhibición de la síntesis de HPT.	Homeostasis del calcio y el fósforo.
Otros tejidos	¿Lechos vasculares?	Desconocidos.

El FGF-23 pertenece al grupo de los llamados FGFs endocrinos (Itoh, 2010), caracterizados por requerir un cofactor para poder unirse y activar sus receptores cognados. De forma específica, el FGF-23 requiere Klotho, una proteína transmembrana que actúa como cofactor implicado en la unión y activación de los receptores de FGF (FGFRs) por el FGF-23 (Kurosu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2005). Por tanto, la presencia de esta proteína determina la especificidad del FGF-23 por el tejido diana. La expresión del gen *Klotho* se ha descrito en las glándulas paratiroides, los túbulos renales y el plexo coroideo (Kuro-o *et al.*, 1997).

Estudios recientes muestran que el calcitriol y la HPT estimulan la expresión y la secreción ósea del FGF-23 (Shimada, Hasegawa *et al.*, 2004; Saji *et al.*, 2009; Perward *et al.*, 2005; López *et al.*, 2011). La regulación positiva de la expresión ósea del FGF-23 por el calcitriol ocurre en horas (Shimada, Hasegawa *et al.*, 2004) y está mediada por su unión al RVD, el cual induce la heterodimerización con el receptor nuclear retinoide (RNR), complejo que se une a la región promotora del gen *FGF-23* y activa su expresión (Kuro-o, 2008). Se establece así un sistema de retroalimentación entre riñón, hueso y glándulas paratiroides en el que se fundamenta la adecuada homeostasis del fósforo (**Figura I.1**).

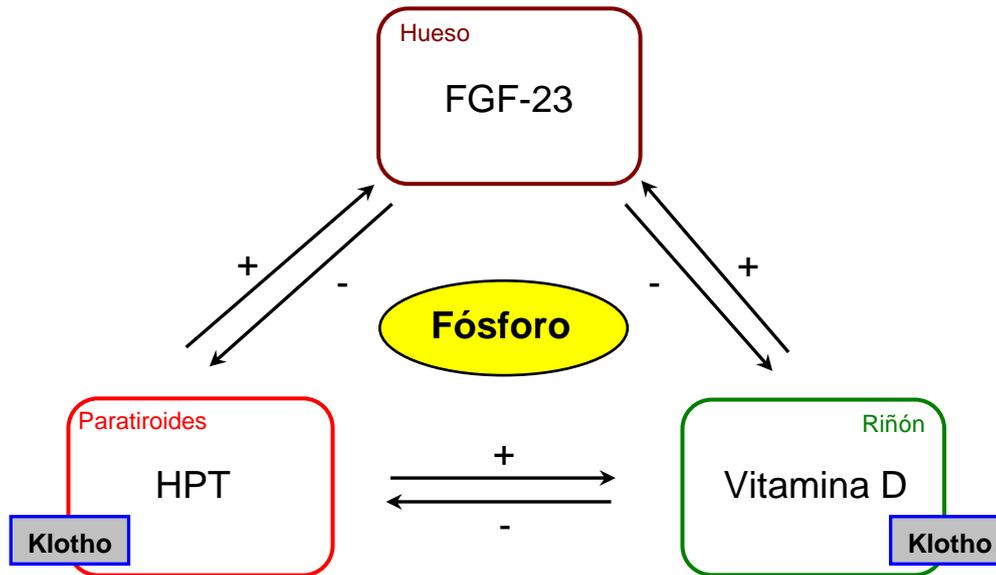


Figura I.1 Regulación fisiológica de los niveles séricos de fósforo.

La regulación fisiológica de los niveles séricos de fósforo se basa en la interacción entre la vitamina D, la HPT y el FGF-23.

I.3. Sistema FGF-23 / Klotho, inflamación y daño cardiovascular.

La pérdida progresiva de la función renal se asocia a la aparición de alteraciones de los parámetros del metabolismo mineral, incluyendo un incremento gradual en la concentración de fósforo y de HPT, y un descenso en los niveles de calcitriol (Levin *et al.*, 2007) (**Figura I.2**). Además, la progresión de la ERC conlleva el desarrollo de un verdadero síndrome inflamatorio crónico (Zimmermann *et al.*, 1999), donde las citoquinas se convierten en moléculas directrices. Dichas alteraciones, que se originan en fases tempranas de la ERC y que alcanzan niveles extremos en los estadios evolutivos finales, especialmente en individuos que precisan tratamiento renal sustitutivo, se relacionan con múltiples complicaciones y condicionan la supervivencia de estos pacientes (Block *et al.*, 2004; Stenvinkel *et al.*, 2005; Tetta *et al.*, 2001).

Aunque los niveles anormales de calcio, fósforo, HPT y vitamina D constituyen el grupo de alteraciones del metabolismo mineral que tradicionalmente se han asociado a un incremento del riesgo CV en los pacientes con ERC (Foley, 2009; Tentori *et al.*, 2008), actualmente conocemos que las alteraciones del sistema FGF-23/Klotho participan también en el incremento de riesgo en esta población.

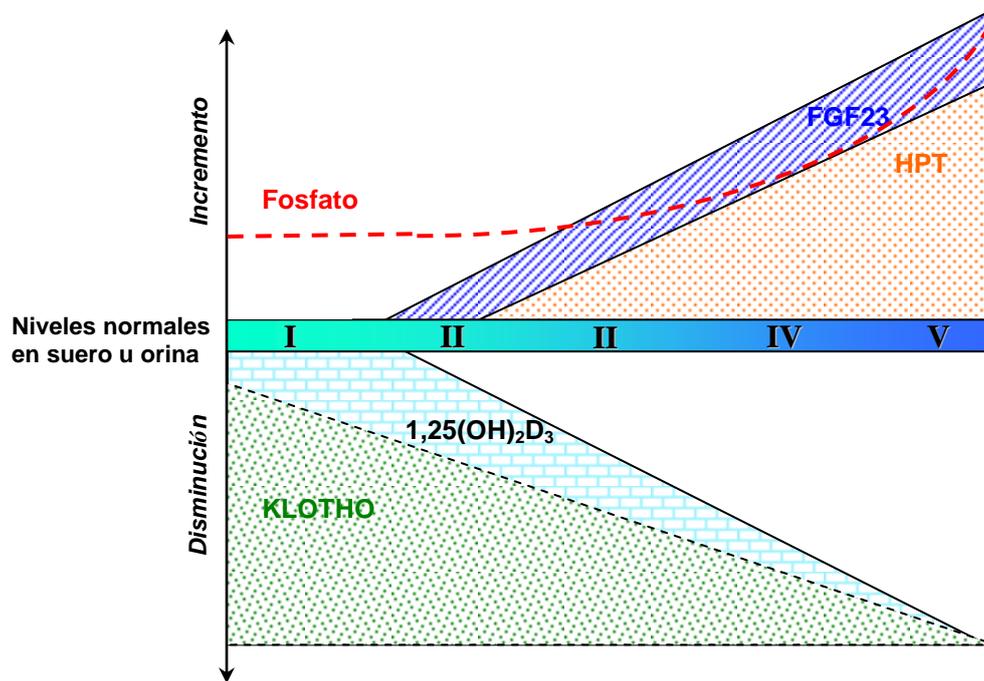


Figura I.2 Variaciones en los niveles de FGF-23, Klotho, PTH, vitamina D activa y fosfato durante la progresión de la ERC.

La primera alteración es el descenso en la producción de Klotho, que provoca un incremento en los niveles de FGF-23. El FGF-23, a su vez, disminuye la producción renal de vitamina D activa circulante, lo cual conlleva un aumento de los niveles de HPT. Como resultado se produce un estado de hiperfosforemia, bajos niveles de calcitriol y alta concentración de HPT en las últimas fases de la ERC.

Diversos estudios en pacientes en diálisis muestran un aumento dosis-dependiente del riesgo de mortalidad asociado al incremento de las concentraciones séricas del FGF-23, demostrando que su capacidad predictiva es independiente, e incluso superior, a la observada para los niveles séricos de fosfato (Gutiérrez *et al.*, 2008; Jean *et al.*, 2009). Del mismo modo, estudios realizados en pacientes con ERC han mostrado la asociación existente entre el FGF-23 y la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (Mirza *et al.*, 2009b; Gutiérrez *et al.*, 2009), la disfunción vascular (Mirza *et al.*, 2009c), la aterosclerosis (Mirza *et al.*, 2009a) y los eventos cardiovasculares (Kanbay *et al.*, 2010) (**Figura I.3**). Estos resultados, junto al incremento de los niveles del FGF-23 detectados en etapas tempranas de la ERC (**Figura I.2**), han llevado a considerar al FGF-23 como un potente predictor de toxicidad y mortalidad relacionada con el fósforo en pacientes que no presentan estados de hiperfosforemia severa, y como parámetro subrogado relacionado con un peor pronóstico CV. Más importante, la magnitud de la asociación entre eventos CVs y el FGF-23 parece ser más sólida que la observada con el nivel de fosfato sérico (Parker *et al.*, 2010).

Son especialmente interesantes estudios observacionales recientes que relacionan al FGF-23 con la disfunción endotelial, la enfermedad aterogénica y la aparición de eventos CV no solamente en población con ERC (Kanbay *et al.*, 2010), sino también en sujetos sin fallo renal (Parker *et al.*, 2010; Mirza *et al.*, 2009b). Estos resultados han llevado a considerar la posibilidad de que el FGF-23 no actúe simplemente como biomarcador de la alteración en los niveles de fosfato sino que, a concentraciones elevadas, pueda ejercer efectos nocivos directos sobre el sistema cardiovascular (**Figura I.3**). Con respecto a esta posibilidad, un trabajo reciente ha corroborado la asociación independiente entre los niveles del FGF-23 y la HVI en una amplia cohorte racialmente diversa de pacientes con ERC. Más importante aún, datos experimentales en el mismo estudio indican la existencia de un papel causal del FGF-23 en la patogénesis de la HVI, de forma independiente a Klotho, sugiriendo que un componente del riesgo CV en pacientes ERC podría ser atribuido directamente al FGF-23 (Faul *et al.*, 2011).

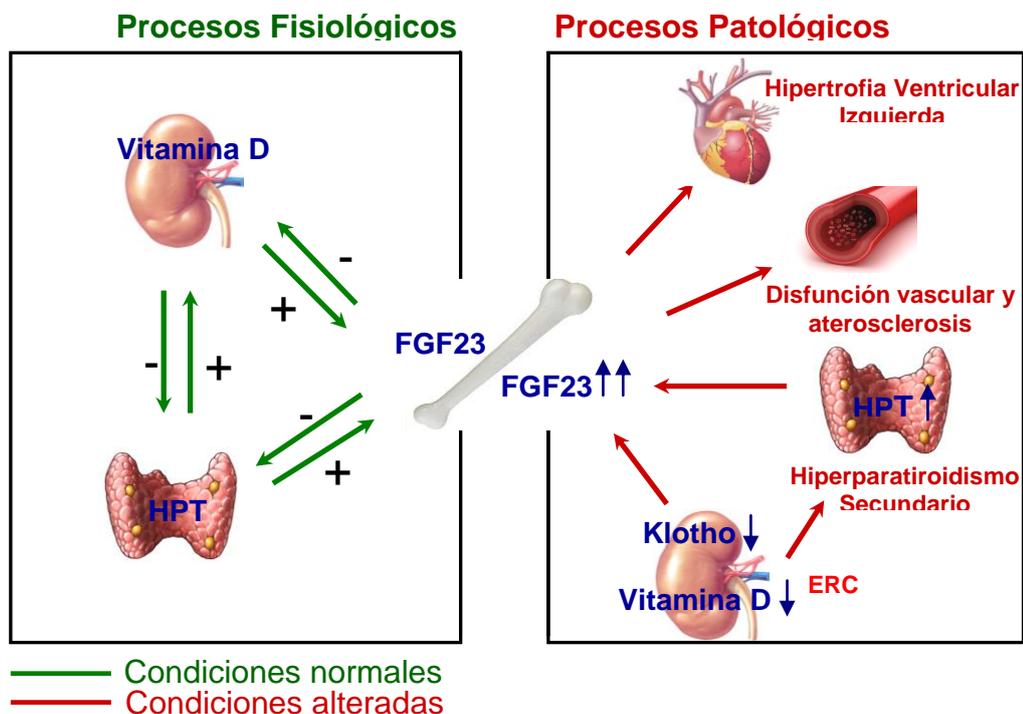


Figura I.3 Fisiología y fisiopatología del FGF-23.

Bajo condiciones fisiológicas, la regulación endocrina del metabolismo del fosfato tiene lugar mediante tres mecanismos de retroalimentación: la vitamina D circulante activa al promotor del gen *FGF-23* en el hueso. El FGF-23 secretado inactiva la producción de vitamina D en el riñón. Por el contrario, la HPT activa su producción. Finalmente, el FGF-23 desactiva al promotor de la HPT en las glándulas paratiroides. Los procesos patológicos derivados de la ERC en sus primeros estadios están relacionados con el incremento en la secreción de FGF-23 desde el hueso actuando en el riñón, donde Klotho se expresa menos, para mantener la homeostasis del fosfato. Esto tiene como resultado la supresión de la producción de vitamina D que desencadena la aparición del HPTS. El exceso del FGF-23 también se asocia con la aparición de disfunción vascular, la aterosclerosis y la HVI.

El FGF-23, como factor endocrino, presenta baja afinidad por los FGFRs, lo que determina el requerimiento de un cofactor para poder unirse a ellos y activarlos (Schlessinger *et al.*, 2000). Es así que el sistema FGF-23/Klotho tiene como elementos primarios la propia molécula del FGF-23, sus receptores y su correceptor obligatorio Klotho, proteína que además de su forma asociada a membrana es posible encontrarla en forma soluble en diferentes fluidos biológicos, como sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (Kurosu *et al.*, 2005; Imura *et al.*, 2004). La expresión limitada de Klotho restringe la acción mediada por el FGF-23 entre los múltiples tejidos que expresan los FGFRs, así como la potencial acción endocrina ejercida por la forma soluble de Klotho y las posibles acciones paracrinas y/o autocrinas de esta molécula (Donate-Correa *et al.*, 2012).

La proteína Klotho ha sido implicada en diferentes procesos biológicos, varios de ellos relacionados con la longevidad humana (**Tabla I.2**). Datos recientes indican la existencia de una relación directa entre la proteína Klotho soluble y la síntesis de calcitriol, la resistencia a insulina, el estrés oxidativo y la disfunción y calcificación vascular (Kuro-o, 2010). Esta forma soluble puede ser generada por dos mecanismos: un procesamiento alternativo del ARN (Matsumura *et al.*, 1998; Shiraki-Iida *et al.*, 1998), o una proteólisis por acción de Desintegrinas y Metaloproteinasas de membrana de tipo A (ADAM), como ADAM-17 y ADAM-10 (Chen *et al.*, 2007), que liberan el dominio extracelular de Klotho.

Tabla I.2 Funciones de la forma soluble de Klotho independientes de FGF-23

	Actividad	Efecto
Riñón	Inactivación de los cotransportadores NaPi-2a y -2c en el túbulo renal proximal.	Aumenta la fosfaturia.
	Activación de los canales iónicos TRPV5 y TRPV6.	Promueve la reabsorción de calcio.
	Activación del canal iónico ROMK1.	Promueve la eliminación de potasio por la orina.
Glándulas paratiroides	Incremento en la actividad ATPasa Na ⁺ /K ⁺	Regulación de la homeostasis del calcio.
	Incremento en la actividad ATPasa Na ⁺ /K ⁺	Estimulación de la expresión de HPT.
Plexo coroideo	Incremento en la actividad ATPasa Na ⁺ /K ⁺	Regulación de la homeostasis del calcio.
Efectos sistémicos	Descenso en la expresión de los cotransportadores NaPi-3.	Protección frente a calcificaciones vasculares.
	Inhibición de la vía de señalización insulina/IGF-1.	Incremento en la resistencia a insulina. Efectos anti-envejecimiento.
	Supresión de la actividad biológica de Wnt.	Efectos anti-envejecimiento.
	Incremento de la producción de óxido nítrico en células endoteliales.	Protección frente a la disfunción endotelial.

La forma soluble de Klotho es capaz de actuar a nivel del túbulo renal proximal inhibiendo la reabsorción de fósforo. Ello se produce por la reducción de la actividad de los cotransportadores Na/Pi-2a y Na/Pi-2c, sin la participación del FGF-23, mediante la degradación proteolítica de los mismos a nivel de membrana (**Tabla I.2**) (John *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010). Dado que los cotransportadores Na/Pi están ampliamente distribuidos en varios tejidos, el efecto inhibitor de Klotho, a diferencia del efecto del FGF-23, podría ser más generalizado. De hecho, la forma secretada de Klotho inhibe también a los cotransportadores Na/Pi tipo 3 (también conocidos como Pit 1 y Pit 2) (Hu *et al.*, 2010 y 2011), que se expresan en diversos tejidos como el epitelio intestinal, el hígado, el corazón y las células musculares lisas vasculares (CMLVs) (Jono *et al.*, 2000; Kakita *et al.*, 2004; Okuda *et al.*, 2006).

En los vasos, Klotho podría proteger frente a la calcificación vascular mediante inhibición de la expresión de Na/Pi-3, como se deduce de estudios donde la adición de Klotho recombinante soluble a cultivos de CMLVs es capaz de reducir la calcificación inducida por el fósforo mediante la disminución de la expresión de estos cotransportadores (Hu *et al.*, 2011). En este mismo escenario, la proteína humoral Klotho se ha relacionado con un papel protector frente a la disfunción endotelial al aumentar la producción de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales (Saito *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2000), lo que sugiere que Klotho está involucrado en la modulación de la función vascular a través de una vía que vincula al NO. Adicionalmente, la estimulación de la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) en el tejido vascular se ha sugerido como otro mecanismo de protección frente a la disfunción endotelial (Saito *et al.*, 1998).

Finalmente, dado que el descenso en la expresión de *Klotho* y la inflamación asociados con la enfermedad renal son causa del desarrollo de fenotipos progeroides en casi todos los tejidos y órganos, se ha examinado recientemente la relación entre la inflamación y la expresión de Klotho (Moreno *et al.*, 2011). Se ha demostrado así que las citoquinas inflamatorias TWEAK (*tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) provocan, tanto *in vitro* como *in vivo*, la reducción de la expresión de *Klotho*. La activación de estas citoquinas inflamatorias y la subsiguiente reducción de la expresión de *Klotho* podrían contribuir a explicar la relación entre la inflamación y las enfermedades caracterizadas por un envejecimiento acelerado de los tejidos, incluyendo la ERC.

Por todo lo dicho, el sistema FGF-23/Klotho aparece como un sistema biológico de gran relevancia potencial en relación a la patogenia del daño vascular. La mayor parte de

los estudios sugieren que esta implicación se basa en mecanismos indirectos relacionados con alteraciones del metabolismo mineral, pero no se ha valorado la posibilidad de que la pared vascular pueda ser un órgano diana para el FGF-23, ni el posible efecto directo de este sistema sobre dicho órgano. Por otra parte, casi todos estos estudios se han realizado *in vitro* o en modelos animales, sin llegar a valorar la expresión del FGF-23, de los FGFRs y de Klotho en el tejido vascular humano.

Por otra parte, estudios genéticos muestran que variantes del gen *Klotho* se asocian con la presencia de enfermedad aterosclerótica (Arking *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2009), aunque sólo existe un estudio previo que analiza la relación entre Klotho soluble y ECV. Este trabajo observó la existencia de una asociación significativa entre una mayor concentración de Klotho plasmático y un menor riesgo de ECV (Semba *et al.*, 2011). No existen estudios que examinen la relación entre los niveles séricos y los niveles de expresión génica de Klotho y la EAC, la principal causa de muerte en el mundo (Mathers & Loncar, 2006).

I.4. Tratamiento de las alteraciones del metabolismo mineral en la ERC: Beneficios adicionales.

Las alteraciones del metabolismo mineral, una complicación prácticamente universal de la ERC, tienen un gran impacto sobre diversos órganos y sistemas, así como sobre la supervivencia de estos pacientes. Por ello, el adecuado control de estos parámetros constituye un aspecto terapéutico esencial (Block, 2011; Barreto *et al.*, 2011).

En relación a los derivados de la vitamina D, se han desarrollado nuevas moléculas, como el paricalcitol, capaz de activar más selectivamente el RVD, con menores efectos calcémicos y fosfatémicos (Russell *et al.*, 1986; Silver *et al.*, 1985). Pero además, el tratamiento con paricalcitol se ha relacionado con otros efectos más allá del control del HPTS.

El estudio de mayor repercusión en relación con los beneficios adicionales aportados por el uso de paricalcitol ha sido el trabajo de Teng *et al.* (2003) que examinó el riesgo de mortalidad asociado con el uso de calcitriol frente a paricalcitol en más de 67.000 pacientes prevalentes en HD. Este estudio reveló que la terapia con paricalcitol se asoció a una reducción de un 16% del riesgo de mortalidad. En un análisis secundario de ese mismo estudio, se evaluó la supervivencia de los pacientes que cambiaron de un tratamiento a otro, observando del mismo modo una asociación entre la administración de paricalcitol y una menor mortalidad.

A nivel experimental, tanto estudios realizados *in vitro* como en modelos animales han mostrado que esta molécula es capaz de producir una reducción dosis-dependiente del sistema renina-angiotensina (Fryer *et al.*, 2007) y una inhibición de la calcificación vascular (Mizobuchi *et al.*, 2007), además de presentar efectos anti-inflamatorios (Tan *et al.*, 2008 y 2009; He *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, son pocos los estudios que han analizado el impacto que puede tener una terapia basada en el paricalcitol sobre el fenómeno inflamatorio a nivel clínico en estos pacientes (Alborzi *et al.*, 2008).

II. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo general profundizar en el conocimiento de las interrelaciones entre el metabolismo mineral, la inflamación y el daño vascular. Todas estas situaciones confluyen con frecuencia en el paciente con ERC, siendo factores que condicionan una elevada morbimortalidad cardiovascular.

A pesar de que cada vez resulta más evidente la relación entre el desequilibrio en el metabolismo mineral y la inflamación, y el papel crucial del eje FGF-23/Klotho en la regulación de la homeostasis del fósforo, poco se sabe del efecto de nuevas intervenciones farmacológicas empleadas en el tratamiento de las alteraciones del metabolismo mineral, asociadas a la enfermedad renal, sobre el estado inflamatorio y el eje FGF-23/Klotho. De igual modo, aún se desconoce la posible relación entre el dicho eje y el daño vascular.

Con estos antecedentes nos hemos propuesto la consecución de los siguientes objetivos concretos:

- I. Evaluar el efecto modulador de la inflamación que puede tener el paricalcitol en pacientes con hiperparatiroidismo secundario sometidos a hemodiálisis.
- II. Caracterizar la expresión de los componentes primarios del sistema FGF23/Klotho en el tejido vascular humano.
- III. Analizar la relación de Klotho con la presencia y severidad de enfermedad arterial coronaria.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Capítulo 1: Perfil antiinflamatorio del paricalcitol oral en pacientes en hemodiálisis: un estudio piloto, prospectivo y abierto.

III. 1.1 Diseño del estudio y participantes.

Estudio prospectivo, abierto, de carácter exploratorio, de pacientes sometidos a HD en un único centro.

Criterios de inclusión

- Un mínimo de 3 meses en terapia de HD.
- Condición clínica estable.
- Concentraciones séricas de calcio y fósforo menores de 10,5 y 6,0 mg/dL, respectivamente.
- Producto calcio-fósforo menor de 80 mg²/dL².
- Presentar HPTS bajo tratamiento con calcitriol durante al menos 6 meses.
- Niveles de HPT intacta menores a 500 pg/mL.

Criterios de exclusión

- Pacientes paratiroidectomizados.
- En tratamiento con calcimiméticos.
- Con enfermedad gastrointestinal severa, tabaquismo, dependencia del alcohol o abuso de drogas.
- Pacientes trasplantados.
- No seguimiento de prescripción en HD.

Antes de su inclusión definitiva en el estudio, se evaluó la existencia de enfermedades inmunológicas, tumorales o infecciosas, así como episodios inflamatorios agudos en el mes previo o la positividad para hepatitis B, C o VIH. Ningún paciente presentó enfermedad gastrointestinal severa, tabaquismo, dependencia del alcohol o abuso de drogas.

Se realizó un cálculo previo del tamaño muestral necesario para detectar una diferencia del 25% en la concentración sérica de IL-6 al final del estudio con un valor de α de 0,05 y un valor de β de 0,90. El resultado de dicho cálculo mostró que se necesitaban como mínimo 19 individuos. Así, 30 pacientes iniciaron el estudio aunque 5 no lo completaron (tres

recibieron un trasplante renal y dos interrumpieron el tratamiento). Por tanto, 25 pacientes completaron el estudio. Tras un periodo de lavado del calcitriol intravenoso de 3 semanas, se hizo la extracción basal de sangre e inmediatamente se inició la terapia con paricalcitol oral (1 µg/día) durante 12 semanas.

III. 1.2 Parámetros bioquímicos generales e inflamatorios.

La toma de muestras de sangre se realizó tras un periodo de ayuno de al menos 8 h, antes de la sesión de HD de mitad de semana. Los parámetros bioquímicos rutinarios se determinaron mediante métodos estándar. La concentración sérica de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-PCR) se determinó mediante un ensayo inmunturbidimétrico. Los niveles de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-18 mediante ELISA de alta sensibilidad, con unas concentraciones mínimas detectables de 0,10 pg/mL, 0,05 pg/mL, 0,70 pg/mL, 0,50 pg/mL y 12,5 pg/mL, respectivamente. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores de 10,8%.

III. 1.3 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, extracción de ARN y PCR a tiempo real.

Las células procedentes de sangre venosa total se aislaron mediante centrifugación en un gradiente de densidad. El ARN total se aisló utilizando reactivo TRI y su concentración y pureza se determinó midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm. Su integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio. Los niveles de expresión génica de *TNF- α* , *IL-10* e *IL-6* se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real empleando SYBR green como agente intercalante. Se diseñaron cebadores específicos y también cebadores para la *β -actina*, que se empleó como gen de expresión constitutiva. La secuencia de cebadores se recoge en la **Tabla III.1**.

Tabla III.1 Cebadores utilizados para la PCR cuantitativa a tiempo real.

Gen	Cebadores (5' a 3')	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>TNF-α</i>	gccaccacgctcttctgt	ggctacgggctgtcactc
<i>Interleucina-6</i>	gtatgaacagcgatgatgcac	gaaacggaactccagaagacc
<i>Interleucina-10</i>	acctgcctaacatgcttcgag	ctgggtcttggttctcagctt
<i>β-actina</i>	tccctggagaagagctacga	atctgctggaaggtggacag

III. 2 Capítulo 2: Expresión del sistema FGF-23/KLOTHO en tejido vascular humano.

III. 2.1 Muestras de tejido y pacientes

Las muestras de aorta torácica se obtuvieron de 44 pacientes (9 mujeres y 35 hombres; edad media $64,7 \pm 9,3$ años) que fueron sometidos a cirugía cardíaca (cirugía coronaria en 37 pacientes y reemplazo valvular en los 7 restantes). Las muestras de trombos se obtuvieron mediante aspiración por catéter desde el sitio de la oclusión coronaria durante la intervención coronaria percutánea primaria en dos pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) en el servicio de Cardiología del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife, España.

III. 2.2 Extracción de ARN, RT-PCR y PCR a tiempo real.

Se extrajo el ARN total de los tejidos mediante su completa homogeneización en reactivo TRI siendo posteriormente purificado. La calidad del ARN extraído se determinó en un sistema de electroforesis automatizado Experion™ y se cuantificó por absorción a 260 y 280 nm. El ADN complementario (ADNc) resultante de su retro-transcripción se empleó en la RT-PCR y en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Para la RT-PCR se emplearon cebadores cuya secuencia abarca distintos intrones para evitar amplificar regiones correspondientes al posible ADN genómico contaminante. Su secuencia se recoge en la **Tabla III.2**.

Tabla III.2 Cebadores utilizados para la RT-PCR de FGF-23, KLOTHO y FGFRs

Gen	Cebadores (5' a 3')		Tamaño (pb)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>FGF-23</i>	taccacctgcagatccacaa	gtttgctgagggatggta	649
<i>KLOTHO</i>	actccccagtcaggtggcgta	tgggccgggaaaccattgctgtc	349
<i>FGFR1</i>	taccaccgacaaagagatgg	ctggctgtggaagtactct	287
<i>FGFR2</i>	tggagcgatcgctcaccg	ctccaggcgctggcagaactgt	352
<i>FGFR3</i>	caccaccgacaaggagcta	gctcgagctcgagacatt	433
<i>FGFR4</i>	gggtcctgctgagtgtgc	gggtaactgtgctattcg	406

Secuencias de los cebadores empleados para identificar el ARNm del *FGF-23*, de *KLOTHO* y de los *FGFRs* por RT-PCR y tamaños esperados de los amplificadas.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Además, se secuenciaron para confirmar su identidad.

Los transcritos que codifican para *KLOTHO*, *ADAM-17*, *IL-10* y la *gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)* se midieron mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando tecnología TaqMan.

Los ensayos TaqMan utilizados para cada transcrito fueron: (Hs00183100_m1 [*KLOTHO*], Hs01041915_m1 [*ADAM17*], Hs0961622_m1 [*IL-10*], Hs00221003_m1 [*FGF-23*] y Hs99999905_m1 [*GAPDH*]). Los niveles de ARNm se estimaron por cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalizando los valores a los obtenidos por la expresión de *GAPDH*.

Cada muestra se cuantificó por triplicado incluyendo en cada reacción su correspondiente control negativo sin retro-transcripción para determinar la posible contaminación por ADN genómico.

III. 3 Capítulo 3: Los bajos niveles de KLOTTHO están asociados con la incidencia y severidad de la enfermedad arterial coronaria.

III. 3.1 Diseño del estudio y participantes.

Para determinar la relación entre Klotho soluble y la EAC, se seleccionaron pacientes mayores de 18 años sometidos a angiografía coronaria no urgente, como parte de un proceso de evaluación diagnóstica de enfermedad arterial coronaria.

Criterios de exclusión

- Infarto de miocardio previo.
- Angioplastia coronaria.
- Colocación de stent intracoronario o cirugía de derivación de la arteria coronaria.
- Inestabilidad hemodinámica.
- Arritmia cardíaca.
- Enfermedades inmunológicas o inflamatorias (tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o enfermedad inflamatorias del intestino)
- Enfermedad renal (definida como un filtrado glomerular estimado (FGe) menor a 60 mL/min/1,73 m²).

Para determinar la relación entre los niveles de expresión génica de *Klotho* y la EAC, se recuperaron fragmentos de aorta torácica de 144 pacientes sometidos a cirugía de derivación coronaria o de reemplazo valvular.

Ningún paciente recibió tratamiento con calcio, fosfato o vitamina D. Todos los protocolos cumplieron con los criterios de la Declaración de Helsinki y fueron revisados y aprobados por los comités éticos institucionales correspondientes. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

III. 3.2 Angiografía coronaria.

Se realizó mediante técnica estándar. Los angiogramas se analizaron sin conocer los valores de Klotho soluble y de expresión génica. Para la valoración de estenosis coronaria se consideraron cuatro arterias epicárdicas principales: el tronco de la arteria coronaria izquierda, la descendente anterior, la circunfleja y la coronaria derecha. Se definió un índice de severidad de estenosis (ISE) como la media de las estenosis máximas en cada una de

dichas arterias. Se definieron dos grupos: Grupo 1, sin EAC significativa, que comprendía a los sujetos con arterias coronarias normales (0% de estenosis) y a los pacientes con lesiones con una estenosis menor del 50% en cualquiera de las arterias coronarias epicárdicas; y Grupo 2, con EAC significativa, definida como la presencia de al menos una lesión estenótica que genere una reducción en el diámetro del lumen $\geq 50\%$ en cualquiera de estas arterias (Patel *et al.*, 2009).

III. 3.3 Variables bioquímicas.

La toma de muestras de sangre se realizó tras un periodo de ayuno de al menos 8 h, antes de la angiografía. Al igual que en el capítulo I, los parámetros bioquímicos rutinarios se determinaron mediante métodos estándar y la concentración sérica de hs-PCR se determinó mediante un ensayo inmunturbidimétrico. Los niveles de Klotho circulantes se determinaron mediante ELISA, con una concentración mínima detectable de 6,15 pg/mL. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores de 3,1% y 6,9%, respectivamente.

III. 3.4 Expresión vascular de Klotho: extracción de ARN, RT-PCR y qRT-PCR.

Tanto el procesado de las muestras de aorta torácica para extraer el ARN, como el estudio de la expresión génica de *Klotho* se realizó del mismo modo que el descrito en la sección correspondiente del capítulo II.

III. 3.5 Análisis estadístico

Las variables continuas aparecen reflejadas como media \pm desviación estándar o mediana (IQR) cuando corresponda. Los datos categóricos se presentan como frecuencias o porcentajes. Tras comprobar la distribución normal con el test Kolmogorov-Smirnov, los valores séricos y de expresión se transformaron a formato logarítmico antes de incluirse en el análisis. Las diferencias entre variables categóricas se compararon usando el test χ^2 . Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante un test t no pareado o mediante un análisis de la varianza unidireccional con un test Bonferroni *post-hoc*. El test de correlación de Spearman se empleó para evaluar la relación entre las concentraciones de Klotho soluble y otras variables.

Se realizó un análisis de regresión múltiple por pasos para determinar la asociación independiente entre los parámetros clínicos del paciente como potenciales valores predictores (edad, sexo, HT, DM, tabaquismo, hiperlipidemia, índice de masa corporal –

IMC-), las concentraciones de ácido úrico sérico, fósforo, hs-PCR y de Klotho soluble, y la severidad de la EAC como variable dependiente. Se realizaron estadísticos de colinealidad (tolerancia y factor de inflación de la varianza) para detectar correlaciones entre las variables independientes. Se realizó un análisis de regresión logística múltiple para determinar predictores independientes de la presencia de EAC significativa (EACS). Con este propósito, hemos adoptado tres modelos: en el modelo 1, hemos introducido factores de riesgo tradicionales; en el modelo 2, incluimos además el ácido úrico, el IMC y la hs-PCR; finalmente, en el modelo 3, ajustamos el análisis en función de las concentraciones de Klotho soluble. Con respecto al análisis de la expresión génica, cada muestra se cuantificó por triplicado y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias, siendo transformadas logarítmicamente para su análisis estadístico. Valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics V.19 (Corporación IBM, Somers, Nueva York, EEUU).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Capítulo 1: Perfil antiinflamatorio del paricalcitol oral en pacientes en hemodiálisis: un estudio piloto, prospectivo y abierto.

IV.1.1 Resultados

Veinticinco pacientes (12 mujeres y 13 hombres, con una edad media de 62 ± 15 años y un periodo medio en HD de 12 ± 5 meses) completaron el estudio y se incluyeron en el análisis. Todos los participantes fueron caucásicos en hemodiálisis (HD) tres veces por semana sin reutilización del dializador. Nueve de ellos (36%) fueron diabéticos. Todos ellos recibían terapia con quelantes de fosfato (13 hidrocloreuro de sevelamer, 12 carbonato de lantano y 6 acetato cálcico), y 8 pacientes recibían tratamiento con cinacalcet. La mayor parte de los pacientes recibieron terapia antihipertensiva (59% bloqueadores de los canales de calcio; 49% bloqueadores del sistema renina-angiotensina; 27% β -bloqueantes; 15% diuréticos; y un 10% α -bloqueantes). Veinte pacientes (80%) recibían estatinas y un 94% agentes estimulantes de la eritropoyesis.

Tras 12 semanas de tratamiento con paricalcitol oral, los niveles de calcio y fósforo séricos, así como el producto calcio-fósforo, no experimentaron variaciones significativas. Sin embargo, la concentración de HPT intacta sufrió una reducción ligera pero significativa (Tabla IV.1).

Tabla IV.1 Valores bioquímicos antes y después de la administración de Paricalcitol.

Variable	Antes	Después	P
Calcio (mg / dL)	$9,1 \pm 0,6$	$9,2 \pm 0,5$	NS
Fosfato (mg / dl)	$4,6 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,6$	NS
Ca x P ($\text{mg}^2 / \text{dl}^2$)	$43,8 \pm 12,8$	$43,6 \pm 10,7$	NS
HPT intacta (pg / ml)	317 ± 91	302 ± 83	<0,01
hs-PCR (mg / L)	$7,1 \pm 3,3$	$5,9 \pm 2,5$	<0,001
TNF- α (pg / ml)	$7,6 \pm 2,7$	$7,1 \pm 2,0$	<0,05
IL-1 (pg / ml)	$1,0 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$	NS
IL-6 (pg / ml)	$6,8 \pm 5,0$	$6,6 \pm 4,8$	<0,05
IL-10 (pg / ml)	79 ± 20	80 ± 19	0,06
IL-18 (pg / ml)	610 ± 95	591 ± 135	NS

NS, no significativo; HPT, hormona paratiroidea; hs-PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; IL, interleucina.

Con respecto a la evolución del perfil inflamatorio, mientras que los niveles de IL-1, IL-10 e IL-18 no presentaron variaciones, las concentraciones séricas de hs-PCR, TNF- α e IL-6 disminuyeron de forma significativa, con un descenso porcentual medio del 14,3% ($p<0,001$), 4,7% ($p<0,05$) y 5% ($p<0,05$), respectivamente. Las concentraciones séricas de IL-10 experimentaron un incremento medio de un 2,5%, que casi alcanzó significado estadístico ($p=0,06$). La evolución de los parámetros inflamatorios se muestra en la **Tabla IV.1** y en la **Figura IV.1**.

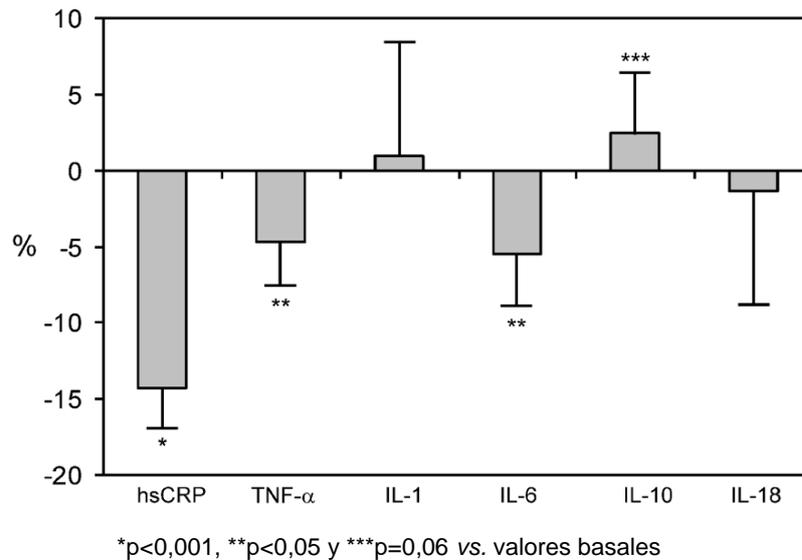


Figura IV.1 Porcentaje de variación media respecto a los niveles basales en las concentraciones séricas de parámetros inflamatorios tras 12 semanas de tratamiento con paricalcitol.

El balance entre factores pro- y anti-inflamatorios se evaluó mediante la variación de los cocientes entre los valores de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-18 (pro-inflamatorios) y de la IL-10 (anti-inflamatoria). Así, observamos una disminución significativa en los cocientes TNF- α /IL-10 e IL-6/IL-10 con respecto a los valores basales ($p<0,05$), mientras que los cocientes IL-1/IL-10 e IL-18/IL-10 no mostraron cambios significativos (**Figura IV.2**).

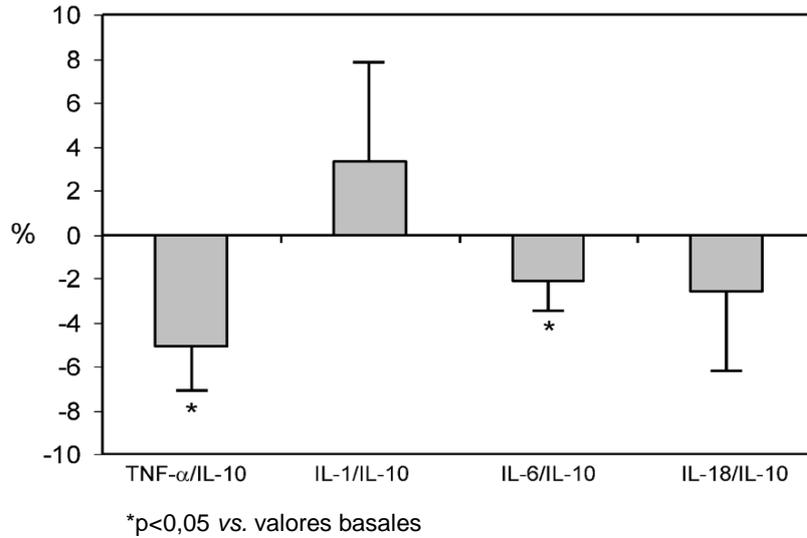


Figura IV.2 Variación porcentual media respecto al nivel basal de los ratios de los niveles séricos de parámetros inflamatorios (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) respecto a la citoquina anti-inflamatoria (IL-10) tras el tratamiento.

La **Figura IV.3** muestra la evolución de la expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias en células mononucleares de sangre periférica. Tras 12 semanas de tratamiento con paricalcitol, los niveles de expresión de *TNF- α* e *IL-6* experimentaron un descenso significativo, con reducciones porcentuales medias del 19,1% ($p<0,01$) y 17,5% ($p<0,001$), respectivamente. Asimismo, se produjo un incremento porcentual medio de un 17,7% en la expresión de *IL-10* ($p<0,01$).

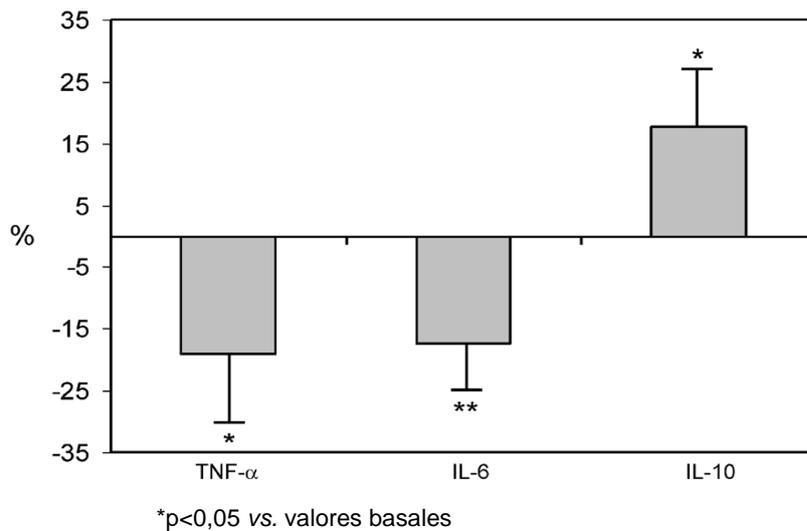


Figura IV.3 Porcentaje de variación media respecto al nivel basal de la expresión génica de TNF- α , IL-6 e IL-10 tras el tratamiento con paricalcitol.

Al analizar la posible influencia de las concentraciones de la HPT y de fosfato en la modificación del perfil inflamatorio tras el tratamiento con paricalcitol, no observamos diferencias significativas cuando los pacientes fueron clasificados en función a un nivel de HPT inferior o superior a 300 pg/ml, ni cuando fueron estratificados en función a una concentración de fósforo superior o inferior a 4,5 mg/dl (Tabla IV.2).

Tabla IV.2 Cambios porcentuales de las concentraciones séricas y de la expresión génica en sangre periférica de citoquinas, en función de las concentraciones de HPT intacta o fósforo sérico, tras la administración de paricalcitol.

	HPTi sérica		Fósforo sérico	
	<300pg/ml	>300pg/ml	<4,5pg/ml	>4,5pg/ml
Concentraciones séricas				
TNF- α	-10,3 (-13,3 / 1,6)	-3,9 (-17,5 / 3,4)	-11,0 (-19,8 / -1,96)	-1,9 (-10,0 / 3,4)
IL-1	-26,1 (-52,9 / 33,3)	7,1 (-40 / 57)	-8,9 (-35,8 / 66,6)	-16,6 (-40,0 / 50,0)
IL-6	-5,8 (-11,1 / 1,6)	-3,6 (-10,0 / 16,6)	-5,8 (-10,5 / 6,25)	-4,0 (-10,0 / 5,0)
IL-10	4,9 (1,9 / 6,0)	4,1 (-4,0 / 9,8)	5,5 (-0,7 / 7,2)	4,1 (-3,0 / 8,4)
IL-18	-0,2 (-16,9 / 3,6)	-1,3 (-16,9 / 14,2)	0,44 (-16,9 / 10,3)	-1,1 (-9,1 / 1,3)
Niveles de expresión				
TNF- α	-25,6 (-50,0 / -15,7)	-22,7 (-55,0 / -15,7)	-48,3 (-57,0 / -15,7)	-22,7 (-33,3 / -15,7)
IL-6	-28,5 (-36,6 / -14,2)	-10,5 (-26,6 / 13,0)	-12,4 (-30,0 / -7,9)	-25,9 (-27,7 / -10,0)
IL-10	11,4 (5,0 / 27,2)	9,0 (-6,2 / 33,3)	10,4 (3,3 / 17,8)	11,1 (0,1 / 33,3)

Los datos se expresan como media y rango intercuartílico. HPTi: hormona paratiroidea intacta.

IV.1.2 Discusión

Se ha comprobado que la utilización del activador selectivo del RVD paricalcitol se asocia con un beneficio significativo en la supervivencia cuando se lo compara con el uso de calcitriol (Teng *et al.*, 2003). Se ha sugerido que el paricalcitol presenta efectos pleiotrópicos beneficiosos más allá de la esfera ósea y mineral (Andress, 2006). Sin embargo, la mayoría de los estudios que han investigado estos efectos se han realizado *in vitro* o en modelos animales, siendo escasa la información proveniente de trabajos clínicos. Nuestros hallazgos demuestran, a nivel clínico, las propiedades anti-inflamatorias del paricalcitol, caracterizando sus efectos sobre las concentraciones séricas de las principales citoquinas inflamatorias, así como sobre la expresión génica de estas moléculas en células mononucleares de sangre periférica.

La inflamación es una condición altamente prevalente en los pacientes con ERC, habiéndose asociado a diversas complicaciones y a la morbi-mortalidad CV en esta población. Las citoquinas inflamatorias juegan un papel determinante en el fenómeno inflamatorio, estando relacionadas con el desarrollo de daño CV (Swaminathan & Shah, 2011; Tedgui & Mallat, 2006). Así, la inflamación participa en los procesos de calcificación vascular

que afectan a estos pacientes, donde la citoquina TNF- α juega un papel central (Boström, 2005; Al-Aly, 2008). Por otra parte, el *Cardiovascular Health Study* ha demostrado que los niveles de PCR e IL-6 son significativamente mayores en pacientes con insuficiencia renal comparados con pacientes con función renal normal (Shlipak *et al.*, 2003) y, más importante, que estos parámetros se asociaban de forma independiente con la mortalidad CV en pacientes en HD, siendo además el valor pronóstico de estos dos indicadores superior al de otros parámetros inflamatorios (Zocalli *et al.*, 2006; Barreto *et al.*, 2012). Estos hallazgos sugieren que la modulación de la inflamación, con la reducción de los niveles de estos marcadores, puede tener efectos beneficiosos sobre el riesgo CV en estos pacientes.

Desde un punto de vista clínico, son pocos los estudios que han analizado las propiedades anti-inflamatorias del paricalcitol en pacientes HD (Moe *et al.*, 2001; Stubbs *et al.*, 2010), mostrando además resultados poco concluyentes.

Los resultados de nuestro estudio muestran que la administración de paricalcitol induce una reducción significativa de las concentraciones séricas de hs-PCR y de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6, mientras que el nivel de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 se incrementó de forma casi significativa. Observamos asimismo una reducción en los cocientes TNF- α /IL-10 y de IL-6/IL-10.

Otro elemento de interés en este estudio es el análisis del perfil de expresión génica de citoquinas inflamatorias en células mononucleares de sangre periférica. Observamos que tras 12 semanas de administración de paricalcitol, los niveles de expresión de *TNF- α* y de *IL-6* experimentaron un descenso significativo promedio de un 19,1% ($p < 0,001$) y de un 17,5% ($p < 0,001$), respectivamente. Al contrario, el nivel de expresión de *IL-10* se incrementó significativamente en un 17,7% ($p < 0,01$). El conjunto de estas observaciones puede ser relevante dado que el fenómeno inflamatorio se caracteriza por la activación de estos elementos celulares, relacionándose el incremento en la expresión de estas moléculas con el desarrollo de eventos CV (Kostulas *et al.*, 1999; Akatsu *et al.*, 2003).

Una de las limitaciones más importantes de este trabajo es la ausencia de un grupo control, en especial de un grupo tratado con calcitriol. Sin embargo, dado que el cuidado general y la aproximación terapéutica a los pacientes no cambió durante el estudio, asumimos que los resultados observados son debidos a la administración de paricalcitol. Otras limitaciones potenciales son el reducido número de pacientes y el corto periodo de seguimiento en el estudio.

IV. 2 Capítulo 2: Expresión del sistema FGF-23/KLOTHO en tejido vascular humano.

IV. 2.1 Resultados

Con el objetivo de determinar la expresión de los componentes del eje FGF-23/KLOTHO (formado por el FGF-23, la proteína KLOTHO y los FGFRs) realizamos la amplificación de los ARNm de dichos genes por RT-PCR a partir de ADNc obtenido por transcripción inversa del ARN extraído. No se detectó expresión del gen *FGF-23* en ninguna de las muestras estudiadas, mientras que sí observamos la expresión de ARNm de *KLOTHO* en todas ellas, obteniendo un producto de amplificación del tamaño esperado (Figura IV.4). Con respecto a los FGFRs, observamos la expresión de FGFR1, FGFR2 y FGFR3, pero no de FGFR4. La identidad de los productos amplificados fue confirmada mediante secuenciación.

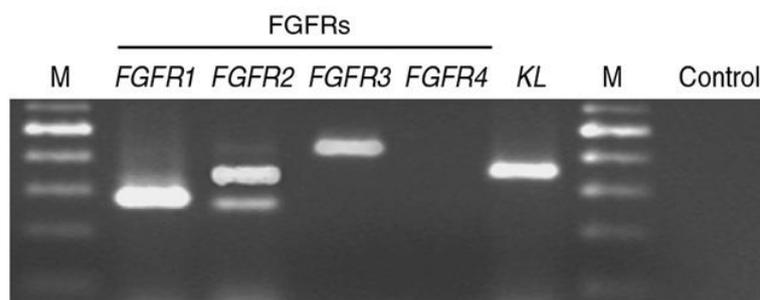


Figura IV.4 Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR. Productos de amplificación de los ARNm de los 4 *FGFRs* determinados y de *KLOTHO* (*KL*) mostrando la expresión de *FGFR1*, 2, 3 y *KLOTHO* en aorta humana. M, marcador de 100-pb. Control, RT-PCR sin retrotranscripción.

Como cabía esperar por los resultados de la RT-PCR, tampoco detectamos ARNm de *FGF-23* por qRT-PCR. Del mismo modo, sí detectamos ARNm de *KLOTHO* en todas las muestras de aorta ($4,85 \pm 5,43$ unidades arbitrarias [u.a.]), mostrando una expresión constitutiva de este cofactor de forma independiente a las características de los pacientes incluidos en el estudio (Figura IV.5). Mediante este mismo método, el estudio de expresión de los trombos coronarios mostró también la presencia de ARNm de *KLOTHO* pero no del *FGF-23* (Figura IV.6).

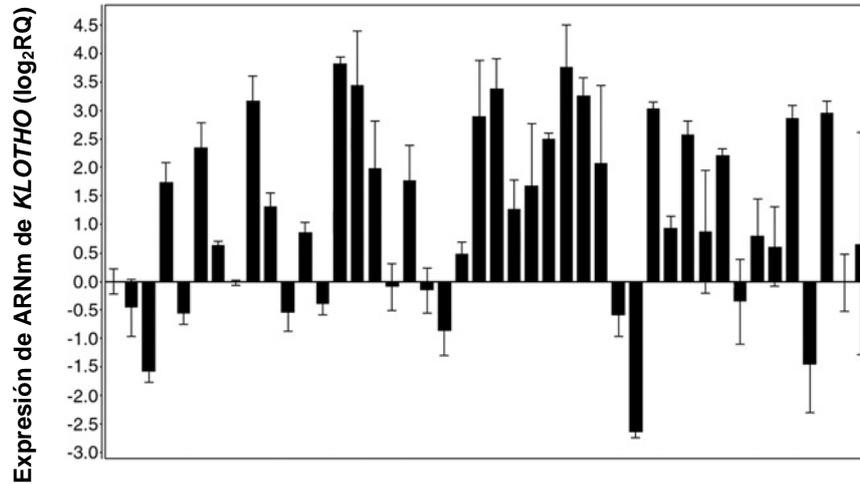


Figura IV.5 Expresión de ARNm de *KLOTHO* determinada por qRT-PCR en muestras de aorta de pacientes quirúrgicos (n=44). Los resultados representan la media de tres réplicas \pm la desviación estándar. Valor medio de expresión = $4,85 \pm 5,43$ u.a.

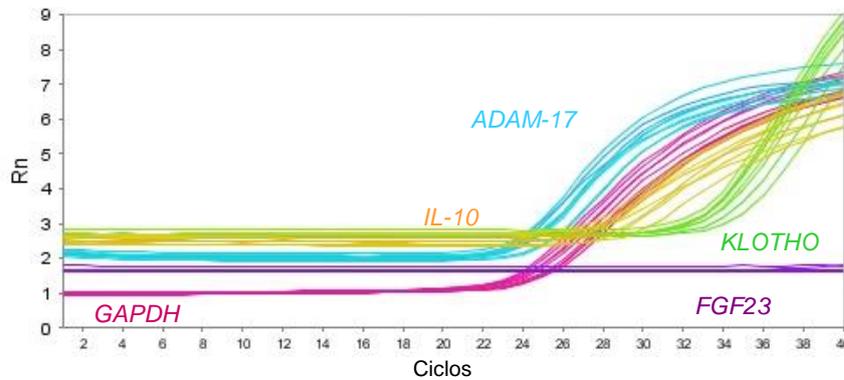


Figura IV.6 Curvas de amplificación de la PCR cuantitativa de *KLOTHO* y *FGF-23*. Los resultados muestran expresión de *KLOTHO*, *ADAM-17* e *IL-10*, pero no de *FGF-23* en trombos coronarios. Las reacciones se hicieron por triplicado.

Un análisis preliminar para determinar la existencia de una expresión diferencial de *KLOTHO* en función de las características del paciente, no mostró ningún resultado significativo cuando se comparó a los pacientes en función del sexo, antecedentes de diabetes o hipertensión, o por la presencia de lesiones coronarias ateroscleróticas en el estudio coronariográfico (los siete pacientes sometidos a reemplazo valvular presentaron

una coronariografía normal). Del mismo modo, no se detectó una correlación significativa entre los niveles de ARNm de *KLOTHO* y la edad.

Los valores de expresión medios de ARNm de *IL-10* y *ADAM-17* fueron $3,45 \pm 3,82$ y $1,30 \pm 0,89$ u.a., respectivamente. Al estudiar las posibles correlaciones entre estas variables y la expresión de *KLOTHO*, se observó que ésta estuvo directa y significativamente asociada con los niveles de expresión tanto de *ADAM-17* como de *IL-10* ($r = 0,54$, $p < 0,001$; $r = 0,51$, $p < 0,01$, respectivamente) (Figura IV.7).

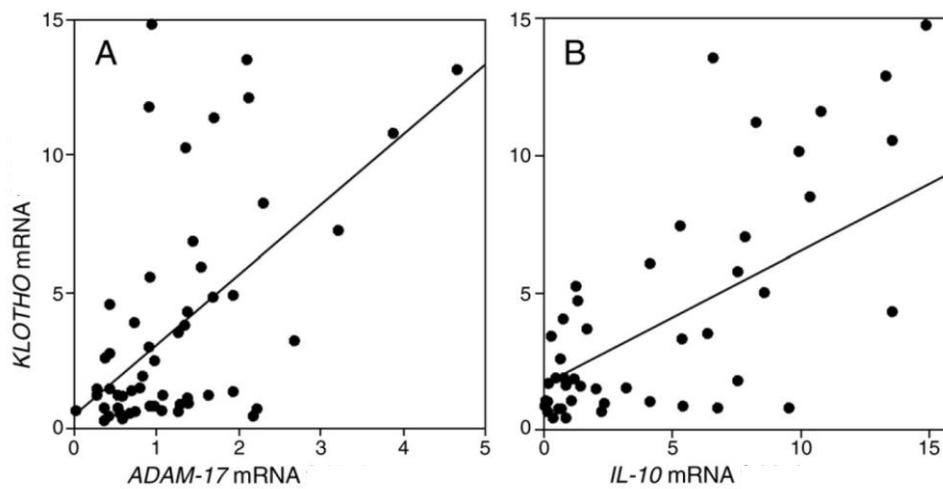


Figura IV.7 Relación entre el nivel de expresión de ARNm de *KLOTHO* y (A) la expresión de ARNm de *ADAM-17* ($r=0,55$; $p<0,001$) y (B) la expresión de ARNm de *IL-10* ($r=0,51$; $p<0,01$).

IV. 2.2 Discusión

El hallazgo más importante del presente estudio es la caracterización del patrón de expresión de los componentes del sistema FGF-23/*KLOTHO* en el tejido vascular humano. En concreto, nuestros resultados demuestran la expresión génica de *KLOTHO* y de dos de los receptores cognados de FGF-23 (*FGFR1* y *FGFR3*), así como la ausencia de expresión del gen de *FGF-23* y del receptor *FGFR4*. Además, demostramos que el nivel de expresión de *KLOTHO* está directa y significativamente asociado con los niveles de expresión de *ADAM-17* y de *IL-10*. Finalmente, observamos que *KLOTHO* se expresa también en trombos coronarios de pacientes con SCA.

La mayor parte de los trabajos que han estudiado el eje FGF-23/*KLOTHO* se han realizado *in vitro* o en modelos animales, y principalmente en órganos relacionados directamente con el metabolismo mineral. Son pocos los estudios que han abordado el

papel potencial de este sistema en la biología del sistema vascular (Parker *et al.*, 2010; Jo *et al.*, 2009; Majumdar *et al.*, 2010; Milovanova *et al.*, 2010; Mirza *et al.*, 2009a).

Así, en pacientes con ERC se ha observado que los altos niveles del FGF-23 se asocian, de manera independiente, con una mayor morbilidad y mortalidad CV (Gutiérrez *et al.*, 2008). Estos incrementos en los valores de FGF-23, incluso dentro del rango de la normalidad, se han relacionado también con defectos en la vasoreactividad y con un aumento de la rigidez arterial en la población general (Mirza *et al.*, 2009a; Mirza *et al.*, 2009c). Además, un subanálisis del *Heart and Soul Study* ha mostrado recientemente que las altas concentraciones de FGF-23 en pacientes con enfermedad coronaria estable, están asociadas con un mayor riesgo de mortalidad y de aparición de eventos CVs (Parker *et al.*, 2010). Estos resultados previos y los hallazgos presentados en este trabajo, indicando que el tejido vascular humano puede ser un órgano diana para FGF-23, sugieren la participación del eje FGF-23/KLOTHO en la enfermedad CV.

Aunque en la actualidad se desconoce el papel que puede desempeñar el sistema FGF-23/KLOTHO en el tejido vascular, se ha sugerido la existencia de un efecto nocivo de altos niveles del FGF-23 mediado por su unión a los FGFRs. Se han propuesto distintos mecanismos de acción para explicar esta posibilidad. Así, el FGF-23 podría actuar induciendo, de forma similar a como lo hace en riñón, una reducción de los niveles de Klotho, (Shimada *et al.*, 2004; Krajisnik *et al.*, 2007) molécula que parece jugar un papel beneficioso al inhibir el proceso de calcificación vascular (Hu *et al.*, 2011). Asimismo, también podría inducir una reducción de los niveles de vitamina D, factor crucial en el mantenimiento de la salud CV (Reddy-Vanga *et al.*, 2010). Se necesitan más estudios que determinen si el eje FGF-23/KLOTHO modula el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis mediante la regulación del metabolismo mineral o si este eje puede jugar un papel directo en la patología vascular.

Klotho es una proteína transmembrana que actúa como coreceptor para el FGF-23. Sin embargo, existe una forma soluble de Klotho que se forma por rotura proteolítica en la superficie celular del dominio extracelular de la proteína por la enzima anclada a la membrana ADAM-17 (Chen *et al.*, 2007). Nuestros datos muestran una correlación directa y robusta entre los niveles expresión de KLOTHO y de ADAM-17, lo que sugeriría que el tejido vascular puede ser una fuente de Klotho soluble.

Se ha señalado una función protectora de Klotho frente a la disfunción endotelial (Kawahara *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010). Un

estudio reciente realizado en ratas con hipertensión espontánea (Wang *et al.*, 2009) demostró que la administración del gen *Klotho* era capaz de incrementar la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, lo cual podría mediar los efectos antihipertensivos y renoprotectores de *Klotho*. Nuestros datos demuestran, por primera vez, que los niveles de expresión de *Klotho* en tejido vascular humano están relacionados directa y significativamente con los niveles de expresión de *IL-10*. Estos hallazgos indican nuevamente la existencia de una relación entre el eje FGF-23/KLOTHO y las rutas inflamatorias que podría jugar un papel importante en la fisiopatología de la ECV.

Finalmente, nuestro estudio demuestra además la expresión de *Klotho* en trombos coronarios obtenidos de pacientes con SCA. A pesar de que no pudimos realizar un análisis de las células del trombo, estudios previos han mostrado que los monocitos CD14+ constituyen el tipo celular predominante en dichas formaciones, (Wyss *et al.*, 2010) lo que sugiere que los monocitos que se acumulan en los trombos de los pacientes con SCA podrían expresar *Klotho*.

La principal limitación de este estudio es la ausencia de datos sobre el patrón de expresión de los genes estudiados (*FGF-23*, *KLOTHO* y *FGFRs*) en el tejido vascular de individuos sanos, por lo que no podemos excluir que la presencia de la enfermedad aterosclerótica pudiera influir en su expresión. Sin embargo, su expresión de forma independiente a las distintas características clínicas de los pacientes sugiere una expresión basal constitutiva. Además, en nuestro estudio no hemos medido los niveles séricos del FGF-23 o de KLOTHO, por lo que no podemos establecer si las concentraciones de estas moléculas pueden estar relacionadas con los niveles de expresión de los genes estudiados.

IV. 3 Capítulo 3: Los bajos niveles de KLOTHO están asociados con la incidencia y severidad de la enfermedad arterial coronaria.

IV. 3.1 Resultados

Para la determinación de la relación entre los niveles de Klotho soluble y la EAC, se consideró la inclusión de 491 pacientes de los que se excluyeron 120 por cumplir al menos uno de los criterios de exclusión. En la **Tabla IV.3** se muestran los datos demográficos y de laboratorio de los 371 pacientes finalmente incluidos.

Tabla IV.3 Características clínicas y determinaciones bioquímicas de los pacientes incluidos.

	Resumen	EAC-NS	EAC-S	Valor <i>p</i>
Características				
N (%)	371	138 (37,2%)	233 (62,8%)	<0,01
Edad (años)	65±11	63±10	66±11	NS
Mujeres (%)	33	36,7	30,6	NS
PA sistólica (mm Hg)	142±19	143±18	140±20	NS
PA diastólica (mm Hg)	77±11	77±11	77±11	NS
Índice de masa corporal (kg/m ²)	28,1±4,6	28±4	28±4	NS
Comorbilidades				
Diabetes mellitus (%)	40	23	49	<0,001
Hipertensión (%)	67	61,5	71	<0,05
Tabaquismo (%)	51	29	61	<0,001
Dislipemia (%)	54	47,5	55	NS
Medicación				
Bloqueantes del RAS (%)	63	63,1	64,2	NS
Aspirina (%)	71,4	58,6	78,9	<0,01
Estatinas (%)	65,7	52,8	73,3	<0,001
Analíticas				
Colesterol total (mg/dL)	196±44	197±44	193±43	NS
LDL-C (mg/dL)	117±39	120±39	112±38	NS
HDL-C (mg/dL)	48±12	47±12	48±12	NS
Triglicéridos (mg/dL)	151±85	149±81	154±91	NS
Ác. úrico (mg/dL)	7,2±2,0	7,2±1,9	7,2±2,2	NS
Cálcio (mg/dL)	9,4±0,4	9,4±0,4	9,4±0,4	NS
Fósforo (mg/dL)	3,7±0,6	3,6±0,7	3,7±0,6	NS
hs-PCR (mg/L)*	0,97 (0,46–1,80)	0,50 (0,32–0,86)	1,30 (0,81–2,30)	<0,001
Klotho (pg/mL)*	371 (243–626)	767 (532–995)	275 (212–345)	<0,001

*Los datos se expresan como media (IQR).

PA, presión arterial; HDL-C, lipoproteína de alta densidad-colesterol; hs-PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; LDL-C, lipoproteína de baja densidad-colesterol; NS, no significativo; EAC-NS, enfermedad arterial coronaria no significativa; EAC-S, enfermedad arterial coronaria significativa; RAS, sistema renina-angiotensina.

Un total de 233 pacientes (62,8%) presentaron EACS. En este grupo, la prevalencia de hipertensión ($p < 0,05$), diabetes melitus y tabaquismo ($p < 0,001$) fue mayor, así como su edad ($p < 0,01$) y sus niveles séricos de PCR ($p < 0,001$).

La concentración de Klotho soluble fue significativamente inferior en los pacientes con EACS ($p < 0,001$) (Figura IV.8). Del mismo modo, la concentración de Klotho sérico fue menor en pacientes con diabetes melitus (318 (236–460) vs. 364 (261–816) pg/mL, $p < 0,01$) y en fumadores (312 (228–423) vs. 442 (263–852) pg/mL, $p < 0,001$). No se apreciaron diferencias en cuanto a la presencia de hipertensión o dislipemia.

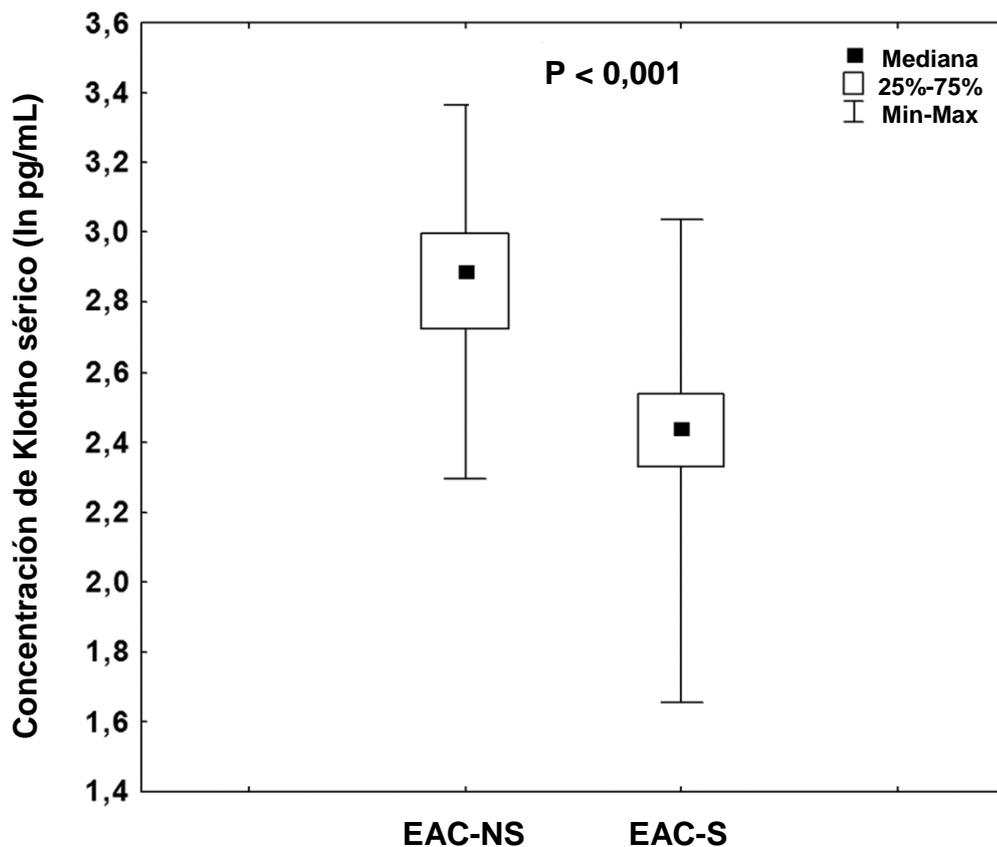


Figura IV.8 Diferencias entre las concentraciones de Klotho sérico de los pacientes con EAC-S y EAC-NS.

En la **Tabla IV.4** se muestran las características de los pacientes al estratificarlos en función de los terciles de Klotho soluble. Comparados con otros pacientes, los sujetos con mayores concentraciones de Klotho (tercil 3) tuvieron una prevalencia significativamente menor de diabetes y de tabaquismo ($p < 0,001$), así como menores concentraciones séricas de colesterol total ($p = 0,01$) y hs-PCR ($p < 0,001$).

Tabla IV.4 Características clínicas de los pacientes tras estratificar por los niveles de Klotho soluble.

	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	Valor p de tendencia
Características				
N (%)	120	128	123	
Edad (años)	66±11	65±11	64±10	NS
Mujeres (%)	31	33	35	NS
PA sistólica (mm Hg)	143±18	142±18	139±20	NS
PA diastólica (mm Hg)	77±12	77±11	77±11	NS
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27±4	28±4	28±4	NS
Comorbilidades				
Diabetes mellitus (%)	45	47	25	<0,001
Hipertensión (%)	69	68	65	NS
Tabaquismo (%)	57	58	31	<0,001
Dislipemia (%)	55	58	49	NS
Analíticas				
Colesterol total (mg/dL)	201±48	198±38	188±42	0,01
LDL-C (mg/dL)	121±41	121±36	119±38	NS
HDL-C (mg/dL)	47±11	48±12	47±12	NS
Triglicéridos (mg/dL)	147±76	153±84	153±93	NS
Ác. úrico (mg/dL)	7,2±2,0	7,2±1,9	7,1±2,1	NS
Cálcio (mg/dL)	9,4±0,4	9,4±0,4	9,3±0,4	NS
Fósforo (mg/dL)	3,7±0,5	3,7±0,7	3,6±0,7	NS
hs-PCR (mg/L)*	1,3 (0,8–2,3)	1,1 (0,5–2,1)	0,6 (0,3–0,92)	<0,001
Índice de severidad de la estenosis (%)	43,5±22	33,6±21,7	4,4±10,6	<0,001

*Los datos se expresan como media (rango intercuartílico).

PA, presión arterial; HDL-C, lipoproteína de alta densidad-colesterol; LDL-C, lipoproteína de baja densidad-colesterol; NS, no significativo.

Con respecto a las lesiones coronarias, tanto la estenosis máxima observada en cada arteria epicárdica como el ISE fueron significativamente menores en los pacientes incluidos en el tercil 3 ($p<0,0001$) (Tabla IV.4). Los sujetos con arterias coronarias normales (0% de estenosis) presentaron mayores niveles de Klotho soluble que los pacientes con estenosis <50% o con EACS [933 (761–1071) vs. 506 (364–586) y 275 (213–344) pg/mL, respectivamente, $p<0,0001$].

Los niveles de Klotho soluble se relacionaron negativamente con la edad ($r=-0,10$; $p<0,05$), los niveles de fósforo ($r=-0,13$; $p=0,01$), los niveles de hs-PCR ($r=-0,39$, $p<0,001$), así como con el ISE ($r=-0,69$; $p<0,0001$). El ISE se relacionó significativamente también con la edad ($r=0,17$; $p<0,01$) y con la hs-PCR ($r=0,65$; $p<0,0001$).

Para testar la asociación independiente entre Klotho soluble y la severidad de la estenosis, se realizó un análisis de regresión múltiple por pasos con el ISE como variable dependiente. El resultado mostró que las concentraciones de Klotho soluble estuvieron inversamente asociadas con la EAC ($R^2=0,67$; $p<0,001$) (Tabla IV.5). La presencia de colinealidad se determinó examinando la tolerancia y el factor de varianza de la inflación (FVI) para cada variable de la regresión. Los valores de tolerancia y de FVI fueron mayores que 0,8 y menores que 1,25 respectivamente para todas las variables, descartándose así la presencia de colinealidad.

Tabla IV.5 Análisis de regresión múltiple por pasos para el IES como variable dependiente.

Índice de severidad de la estenosis	β	SE	t	Valor p
Variable independiente				
Log hs-PCR	0,55	0,73	17,5	<0,001
Log Klotho soluble	-0,36	0,002	-11,1	<0,001
DM	0,13	1,58	4,24	<0,001
Tabaquismo	0,09	1,60	2,73	0,007
Edad	0,07	1,60	2,33	0,02
HT	0,07	1,68	2,73	0,02

Los resultados del modelo de regresión logística, usando la presencia/ausencia de EACS como variable dependiente, se presentan en la Tabla IV.6. Los factores de riesgo tradicionales para la ECV (edad, sexo, tabaquismo, HT, DM, hiperlipidemia) se introdujeron como covariables, con modelos adicionales en los cuales el IMC, el ácido úrico sérico, la hs-PCR (modelo 2) y las concentraciones de Klotho soluble (modelo 3) fueron añadidas como covariables. En el modelo 1, la edad, el tabaquismo y la DM aparecieron como factores de riesgo independientes para la aparición de EACS. En el modelo 2, además de los factores ya comentados, la PCR se asoció también con la aparición de EACS. Finalmente, el modelo 3 incluyó los niveles de la concentración de Klotho soluble, mostrando que dichos niveles constituyen un factor protector frente a la aparición de EACS.

Tabla IV.6 Análisis de regresión logística multivariable para la presencia de EAC-S.

Variable independiente	OR (95% IC)	Valor p
Modelo 1		
Edad	1,03 (1,01 to 1,06)	0,001
Sexo	1,18 (0,70 to 1,99)	0,53
Tabaquismo	5,12 (3,04 to 8,62)	<0,001
Hipertensión	1,37 (0,80 to 2,23)	0,24
Diabetes	3,22 (1,92 to 5,39)	<0,001
Hiperlipidemia	0,96 (0,59 to 1,55)	0,87
Modelo 2 (modelo 1 + IMC, ácido úrico, hs-PCR y fósforo)		
Edad	1,03 (1,00 to 1,06)	0,01
Sexo	1,02 (0,54 to 1,90)	0,94
Tabaquismo	4,91 (2,68 to 8,98)	<0,001
Hipertensión	1,78 (0,95 to 3,36)	0,07
Diabetes	3,21 (1,78 to 5,87)	<0,001
Hiperlipidemia	0,90 (0,51 to 1,58)	0,87
Índice de masa corporal	0,97 (0,91 to 1,03)	0,34
Ác. úrico	1,01 (0,88 to 1,16)	0,87
hs-PCR	8,12 (4,52 to 14,58)	<0,001
Fósforo	1,40 (0,93 to 2,10)	0,10
Modelo 3 (modelo 2 + Klotho soluble)		
Edad	1,03 (1,00 to 1,07)	0,04
Sexo	1,41 (0,58 to 3,39)	0,44
Tabaquismo	3,38 (1,48 to 7,71)	0,004
Hipertensión	2,38 (0,98 to 5,78)	0,055
Diabetes	2,75 (1,15 to 6,54)	0,02
Hiperlipidemia	0,55 (0,24 to 1,26)	0,16
Índice de masa corporal	1,01 (0,93 to 1,11)	0,70
Ác. úrico	0,99 (0,82 to 1,19)	0,96
hs-PCR	12,03 (4,62 to 31,29)	<0,001
Fósforo	1,14 (0,63 to 2,06)	0,64
Klotho Soluble	0,92 (0,88 to 0,99)	<0,001

Expresión vascular de Klotho y EAC

Un total de 70 pacientes (32 hombres y 38 mujeres; edad 65 ± 7 años) sometidos a cirugía cardiaca se incluyeron en el estudio tras cumplir con los criterios de inclusión. Al comparar los pacientes en función de la presencia (N=46) o ausencia (N=24) de EACS, no se observaron diferencias en cuanto a la edad, el sexo o la prevalencia de HT, DM o dislipemia, o con cualquier terapia o dato de laboratorio. Sin embargo, sí que hubo una

mayor prevalencia de tabaquismo en los pacientes con EACS (45,6% vs. 12,5%, $p < 0,001$). De forma interesante, estos sujetos presentaron unos niveles de expresión de *Klotho* en el tejido vascular significativamente menores ($p < 0,01$) (Figura IV.9).

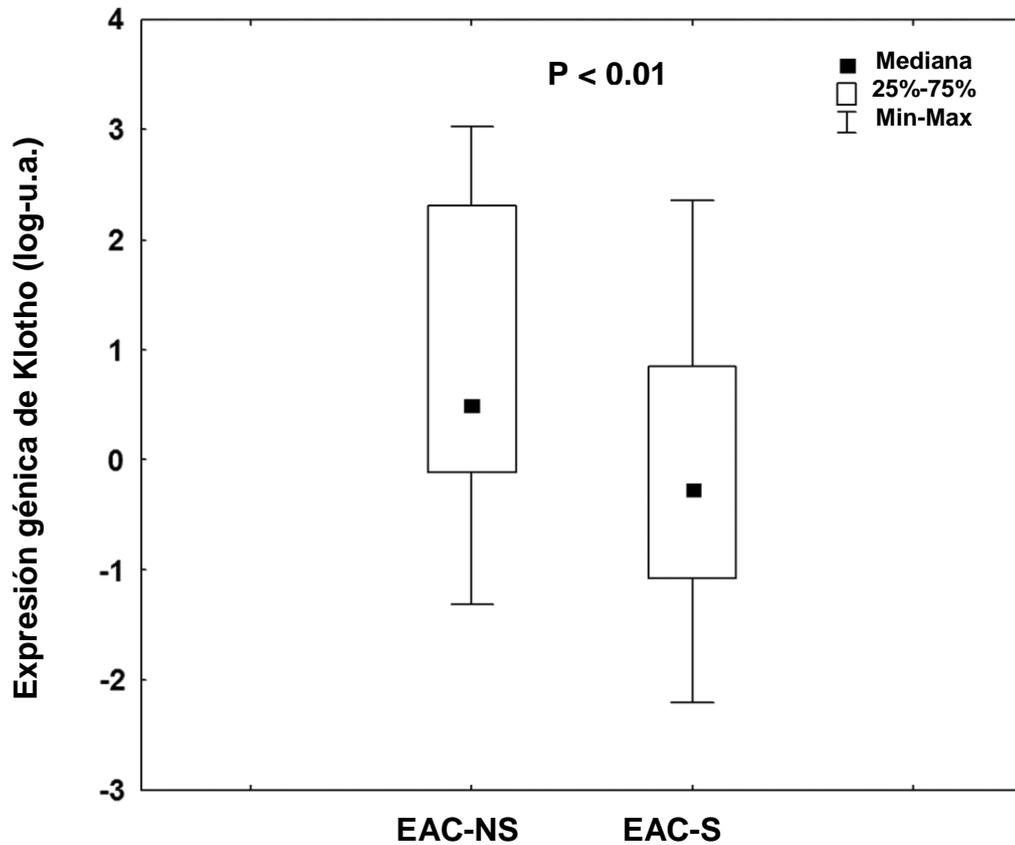


Figura IV.9 Diferencias entre los niveles de expresión de *Klotho* en el tejido vascular

El análisis de regresión logística multivariable usando como variable dependiente la presencia/ausencia de EACS, y a los factores de riesgo CV tradicionales y la expresión de *Klotho* como covariables, mostró que los niveles de expresión de *Klotho* están asociados con un menor riesgo de EACS (Tabla IV.7).

Tabla IV.7 Análisis de regresión logística multivariable para la presencia de EAC-S en el estudio de expresión vascular de *Klotho*.

Variable independiente	OR (95% IC)	Valor p
Modelo		
Edad	1,01 (0,94 a 1,08)	0,73
Sexo	1,00 (0,32 a 3,13)	0,99
Tabaquismo	4,86 (1,10 a 21,3)	<0,05
Hipertensión	1,02 (0,26 a 3,89)	0,97
Diabetes	2,14 (0,65 a 7,04)	0,20
Dislipemia	1,17 (0,29 a 4,58)	0,82
Expresión génica de <i>Klotho</i>	0,85 (0,73 a 0,99)	<0,05

IV. 3.2 Discusión

Nuestros datos muestran que los pacientes con EACS tienen menores concentraciones de Klotho soluble, así como menores niveles de expresión vascular del gen que codifica esta proteína. Más aún, ambos descensos aparecen asociados con la presencia y severidad de la EAC de forma independiente a los factores de riesgo CV clásicos como la edad, la DM, la HT, el tabaquismo, la dislipemia y la inflamación. Si estos descensos en los niveles solubles y de expresión de Klotho pueden directamente promover o favorecer el desarrollo de la aterosclerosis es una posibilidad que requiere de un mayor estudio.

Los ratones mutantes para Klotho muestran múltiples desórdenes similares a los relacionados con el envejecimiento en humanos, incluyendo disfunción endotelial y aterosclerosis. De hecho, estudios experimentales muestran que Klotho está asociado con el mantenimiento de la integridad endotelial (Kusaba *et al.*, 2010) mediante acciones que comprenden la reducción del estrés oxidativo y el incremento de la producción de NO, mejorando así la vasodilatación dependiente del endotelio (Saito *et al.*, 1998). Más aún, la administración de la forma soluble de Klotho mejora el fenotipo de envejecimiento acelerado (Chen *et al.*, 2007). Además, se ha sugerido que la proteína Klotho puede jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad aterosclerótica (Kuro-o *et al.*, 1997; Ikushima *et al.*, 2006).

En humanos, los estudios realizados que analizan la relación entre Klotho y la EAC son muy escasos, siendo estudios genéticos en su mayoría. Estos últimos muestran que existen variantes del gen Klotho asociadas con aterosclerosis carotídea (Oguro *et al.*, 2010), infarto de miocardio (Arking *et al.*, 2005) y EAC (Arking *et al.*, 2003; Jo *et al.*, 2009). Sin embargo, en estos trabajos no se determinó ni los niveles de Klotho soluble ni los de expresión génica. Solamente un estudio previo (Semba *et al.*, 2011) ha mostrado una relación entre Klotho soluble y ECV (definida como EAC, fallo cardiaco, infarto de miocardio o enfermedad arterial periférica). De forma similar a nuestro estudio, Semba *et al.* encontraron que los niveles de Klotho soluble se asociaban de forma independiente con la presencia de ECV y que el riesgo de su aparición era menor en sujetos con mayores concentraciones de Klotho.

Una característica importante de nuestro estudio es el relativamente bajo porcentaje de población mayor de 65 años (56,8% vs. >90% en el estudio de Semba *et al.*), dato relevante dada la reducción de los niveles de Klotho con el envejecimiento. Además,

también es importante el hecho de que ninguno de los sujetos de nuestro estudio padecía de enfermedad renal (vs. 24% en el estudio de Semba *et al.*), ya que la ERC se ha definido como un estado de deficiencia de Klotho (Koh *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2011).

Trabajos experimentales han indicado que Klotho podría estar involucrado en la patogénesis de la calcificación vascular (Hu *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012). En este contexto, la acción de Klotho se ha relacionado con el papel del fósforo, actuando, por una parte, como sustancia fosfática mediante la modulación de la excreción renal de fosfato, y por otra, a través de su efecto sobre los cotransportadores de tipo III, PiT-1 y PiT-2, presentes en las CVMLs, donde juegan un papel crucial en la calcificación de dichas células inducida por fosfato (Li *et al.*, 2006; Crouthamel *et al.*, 2013). Los animales que carecen de Klotho presentan un incremento en la expresión de estos cotransportadores y del factor de transcripción osteogénico CBFA1/RUNX2 en las CVMLs, lo que indica que el descenso en los niveles de Klotho produce calcificación. Más aún, cuando se añade Klotho a CVMLs cultivadas *in vitro*, se produce un descenso en la captura de fosfato a consecuencia de la inactivación de los cotransportadores tipo III, previniendo así el cambio de fenotipo de dichas células de un fenotipo muscular a uno osteocondrogénico (Hu *et al.*, 2011).

Nuestro trabajo es el primer estudio que intenta relacionar la expresión vascular de Klotho con la EAC en humanos. Un estudio previo de nuestro grupo mostró por primera vez que el gen *Klotho* se expresa en la pared vascular humana (Donate-Correa *et al.*, 2013). En este estudio, hemos demostrado que los pacientes con EAC presentan una reducción en los niveles de expresión de Klotho. Además, esta relación fue independiente de otros factores de riesgo CV. Desde un punto de vista mecanístico, la proteína Klotho está involucrada en el mantenimiento de la salud vascular y, por tanto, la disrupción de su homeostasis puede ser un factor importante en el desarrollo de ECV (Moe, 2012; Donate-Correa *et al.*, 2012; Shroff & Sanahan, 2011). Así, como se ha observado en ratones deficientes en Klotho, esta proteína protege frente a la disfunción endotelial, un factor clave en la patogénesis de la aterosclerosis (Nagai *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 1998; Shimada *et al.*, 2004; Kusaba *et al.*, 2010). Estas alteraciones se recuperan por completo tras parabiosis con el ratón salvaje (Saito *et al.*, 1998). Por otra parte, en modelos animales de enfermedad aterosclerótica, la liberación de Klotho en el organismo resulta en una mejora en la disfunción endotelial, en un incremento en la producción de NO y en la prevención de la aparición de remodelaciones vasculares adversas (Saito *et al.*, 1998).

Finalmente, la relación bidireccional entre Klotho y la inflamación es relevante. Klotho es capaz de proteger tanto a las CMVLs como a las endoteliales frente a la inflamación y la

oxidación, ambos factores críticos en la patogénesis de la enfermedad vascular (Maekawa *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Tanto la inflamación sistémica como la local han sido relacionadas con el descenso en la expresión renal de *Klotho* (Moreno *et al.*, 2011; Thurston *et al.*, 2010; Ohyama *et al.*, 1998), mientras que la neutralización de las citoquinas inflamatorias TWEAK y TNF α provoca una reversión en los niveles de expresión y una preservación en los niveles circulantes de *Klotho* (Moreno *et al.*, 2011; Thurston *et al.*, 2010). Por tanto, es posible especular que la aterosclerosis -un desorden inflamatorio crónico- está asociada con un desajuste en la expresión vascular de *Klotho* y con una reducción en las concentraciones de *Klotho* soluble, lo que a su vez puede potenciar rutas oxidativas e inflamatorias que provoquen el desarrollo y progresión del daño vascular.

A pesar de que el presente estudio presenta varias fortalezas (es un estudio poblacional basado en muestreo en adultos, la presencia y severidad de la EAC se analizó concienzudamente, los datos incluyeron factores de riesgo CV y la presencia de ERC fue tomada como factor excluyente al considerarse un factor confusor en la deficiencia de *Klotho*), reconocemos algunas limitaciones. Primero, en el estudio no se midieron las concentraciones séricas de la vitamina D, el FGF-23 y de la HPT (factores todos ellos relacionados con el metabolismo de *Klotho* y del calcio-fósforo, con impactos potenciales en la calcificación vascular y la ECV) y, por tanto, no fue posible estudiar su potencial influencia en la relación entre *Klotho* y la EAC. En segundo lugar, el número de pacientes es relativamente bajo, por lo que los datos no pueden generalizarse a toda la comunidad. En tercer lugar, a pesar de que tuvimos en cuenta los factores tradicionales de riesgo CV, sería plausible la existencia de un factor confusor potencial no controlado o residual que afectase a esta relación *Klotho*-EAC. Finalmente, dado el diseño transversal del estudio, sólo podemos demostrar asociaciones sin llegar a poder inferir su direccionalidad o su causalidad. Al ser éste el primer estudio que relaciona *Klotho* con EAC, se precisan futuros estudios experimentales y clínicos que confirmen nuestros hallazgos, que exploren las relaciones entre *Klotho* y el sistema CV y que evalúen su papel potencial como nuevo biomarcador de ECV.

V. CONCLUSIONES

De los resultados presentados en la presente memoria se derivan las siguientes conclusiones:

- I. La administración del activador selectivo del RVD paricalcitol a pacientes en HD se asocia con efectos anti-inflamatorios significativos. Estos efectos pueden contribuir a los beneficios clínicos aportados por este tratamiento en la supervivencia de los pacientes.

- II. La pared vascular humana expresa los genes que codifican los elementos primarios del sistema FGF-23/Klotho, específicamente los FGFRs 1, 2 y 3, y el co-receptor Klotho. Ello sugiere que la pared vascular humana puede ser un órgano diana para la acción de FGF-23 y, por otra parte, que puede ser una fuente de Klotho soluble. Así mismo, indica el papel potencial de este sistema en la fisiología y fisiopatología vascular.

- III. La reducción tanto de los niveles séricos como de la expresión génica en la pared vascular de Klotho, se asocia con la presencia y severidad de la EAC, independientemente de los factores de RCV tradicionales.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Akatsu T, Nakamura M, Satoh M, Hiramori K. Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci* 2003;105:39-44.
2. Al-Aly Z. Arterial calcification: A tumor necrosis factor-alpha mediated vascular Wnt-opathy. *Transl Res* 2008;151:233-39.
3. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z, Light RP, Agarwal R. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension* 2008;52:249-55.
4. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 2006;69:33-43.
5. Antonucci DM, Yamashita T, Portale AA. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3144-9.
6. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein, cholesterol, blood pressure, stroke and longevity. *Cir Res* 2005;96:412-18.
7. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Human Genet* 2003;72:1154-61.
8. Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Temmar M, Lemke HD, Tribouilloy C, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA; European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and predialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2012;77:550-6.
9. Barreto FC, de Oliveira RA, Oliveira RB, Jorgetti V. Pharmacotherapy of chronic kidney disease and mineral bone disorder. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12:2627-40.
10. Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology* 2009;24:17-25.
11. Bhan I, Thadhani R. Vascular calcification and ESRD: a hard target. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:S102-5

12. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2208–18.
13. Block GA. Therapeutic interventions for chronic kidney disease-mineral and bone disorders: focus on mortality. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20:376-81.
14. Boström K. Proinflammatory vascular calcification. *Cir Res* 2005;96:1219-20.
15. Centers for Disease Control and Prevention. National Chronic Kidney Disease Fact Sheet: General Information and National Estimates on Chronic Kidney Disease in the United States, 2010. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC;2010.
16. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19796–801.
17. Consortium ADHR. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 2000;26:345–8.
18. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, Chavkin NW, Wallingford MC, Peterson DF, Li X, Liu Y, Chin MT, Levi M, Giachelli CM. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:2625-32.
19. Donate-Correa J, Mora-Fernández C, Martínez-Sanz R, Muros-de-Fuentes M, Pérez H, Meneses-Pérez B, Cazaña-Pérez V, Navarro-González JF. Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue. *Int J Cardiol* 2013;165:179-83.
20. Donate-Correa J, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. FGF23/Klotho axis: phosphorus, mineral metabolism and beyond. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012;23:37-46.
21. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:8–28.
22. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, Feldman HI, St John Sutton M, Ojo A, Gadegbeku C, Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Tiemann K, Brand M, Hill JA, Moe OW, Kuro-O M, Kusek JW, Keane MG, Wolf M. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 2011;121:4393–408.

23. Foley RN. Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1136–9.
24. Fryer RM, Rakestraw PA, Nakane M, Dixon D, Banfor PN, Koch KA, Wu-Wong JR, Reinhart GA. Differential inhibition of renin mRNA expression by paricalcitol and calcitriol in C57/BL6 mice. *Nephrol Physiol* 2007;106:76-81.
25. Fukumoto S, Yamashita T. FGF23 is a hormone-regulating phosphate metabolism—unique biological characteristics of FGF23. *Bone* 2007;40:1190–5.
26. Guerrero F, Montes de Oca A, Aguilera-Tejero E, Zafra R, Rodríguez M, López I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated to inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:2206-12.
27. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* 2009;119:2545–52.
28. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008;359:584-592.
29. He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/b-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 90-103.
30. Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 1998;339:799-805.
31. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J* 2010;24:3438–50.
32. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:124–36.
33. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, Chihara Y, Kida I, Ogihara T. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:827–32.
34. Imamura A, Okumura K, Ogawa Y, Murakami R, Torigoe M, Numaguchi Y, Murohara T. Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary ar-

- tery disease but not for vasospastic angina in Japanese. *Clin Chim Acta* 2006;371:66–70.
35. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004;565:143–7.
36. Itoh N. Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 2010;342:1–11.
37. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2792-6
38. Jo SH, Kim SG, Choi YJ, Joo NR, Cho GY, Choi SR, Kim EJ, Kim HS, Kim HJ, Rhim CY. KLOTTHO gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean population. *Int Heart J* 2009;50:23–32.
39. Jofré R, Rodríguez-Benítez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:S274–S280.
40. John GB, Cheng CY, Kuro OM. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis* 2011;58:127–34.
41. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000;87:10–7.
42. Kakita A, Suzuki A, Nishiwaki K, Ono Y, Kotake M, Ariyoshi Y, Miura Y, Ltoh M, Oiso Y. Stimulation of Na-dependent phosphate transport by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2004;174:17–24.
43. Kanbay M, Nicoleta M, Selcoki Y, Ikizek M, Aydin M, Eryonucu B, Duranay M, Akcay A, Armutcu F, Covic A. Fibroblast growth factor 23 and fetuin A are independent predictors for the coronary artery disease extent in mild chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1780-6.
44. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1015–20.

45. Kostulas N, Pelidou S, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke* 1999; 30: 2174-2179
46. Krajisnik T, Björklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerström G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007;195:125–31.
47. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45–51.
48. Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:239–45.
49. Kuro-o M. Overview of the FGF23–Klotho axis. *Pediatr Nephrol* 2010;25:583–90.
50. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem* 2006;281:6120–3.
51. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science* 2005; 309:1829–33.
52. Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, Sonomura K, Adachi Y, Shibuya M, Shirayama T, Tanda S, Hatta T, Sasaki S, Mori Y, Matsubara H. *Klotho* is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca²⁺ channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:19308–13.
53. Kuwahara N1, Sasaki S, Kobara M, Nakata T, Tatsumi T, Irie H, Narumiya H, Hatta T, Takeda K, Matsubara H, Hushiki S. HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging *klotho* protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Int J Cardiol* 2008;123:84-90.
54. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL. 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 Int* 2007;71:31–8.

55. Li X, Yang H, Giachelli C. Role of sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Cir Res* 2006;98:905–12.
56. Lim K, Lu TS, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, Hsiao LL. Vascular klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to FGF-23. *Circulation* 2012;125:2243–55.
57. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011;13:254–62.
58. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1305–15.
59. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Guerrero F, de Oca AM, Pineda C, Shalhoub V, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 *in vivo*. *Kidney Int* 2011; 80:475–482.
60. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine* 2009;35:341–6.
61. Majumdar V, Nagaraja D, Christopher R. Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;403:412–6.
62. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442.
63. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:626–30.
64. Milovanova L, Kozlovskaja LV, Milovanov Iu S, Bobkova IN, Dobrosmyslov IA. Mechanisms of phosphorus and calcium homeostatic disorders in the development of cardiovascular events in patients with chronic renal diseases. The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho. *Ter Arkh* 2010;82:66–72.
65. Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE. Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate? *Bone* 2004;35:1192–9.

66. Mirza MA, Hansen T, Johansson L, Ahlström H, Larsson A, Lind L, et al. Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol Dial Transplant* 2009a;24:3125–31.
67. Mirza MA, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis* 2009c;205:385–90.
68. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE. Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis* 2009b;207:546–51.
69. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int* 2007;72:709-15.
70. Moe SM, Zekonis M, Harezlak J, Ambrosius WT, Gassensmith CM, Murphy CL, Russell RR, Batiuk TD. A placebo-controlled trial to evaluate immunomodulatory effects of paricalcitol. *Am J Kidney Dis* 2001;38:792-802.
71. Moe SM. Klotho: a master regulator of cardiovascular disease? *Circulation* 2012;125:2181–3.
72. Moreno JA, Izquierdo MC, Sánchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramírez R, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokines Tweak and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1315–25.
73. Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Nakamura T, Kurabayashi M, Kuroo M. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:738–46.
74. Nakamura T Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R, Kurabayashi M. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol* 2002;89:149–56.
75. Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension. *Geriatr Gerontol Int* 2010;10:311–18.
76. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y, Kuro-o M, Nabeshima Yi, Nagail R. Molecular cloning of rat

- klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:920–5.
77. Okuda I, Maruno H, Kohno T, Yamase H, Mori K, Kokubo T. Evaluation of imaging before lung volume reduction surgery for pulmonary emphysema; fused image of multi-detector row computed tomography and scintigram. *Kyobu Geka* 2006;59:197–203.
78. Otero A, De Francisco ALM, Gayoso P, García F, on behalf of the EPIRCE Study. Prevalence of chronic renal disease in Spain; results of the EPIRCE study group. *Nefrología* 2010;30:78-86.
79. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, Shlipak MG, Whooley MA, Ix JH. The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Ann Intern Med* 2010;152:640–8.
80. Patel MR, Dehmer GJ, Hirshfeld JW, Smith PK, Spertus JA. Appropriateness criteria for coronary revascularization: a report of the American College Of Cardiology Foundation Appropriateness Criteria Task Force, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Thoracic Surgeons, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, and the American society of Nuclear Cardiology: endorsed by the American Society of Echocardiography, the Heart Failure Society of America, and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *Circulation* 2009;119:1330-52.
81. Perwad F, Azam N, Zhang MY, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology* 2005;146: 5358–5364
82. Reddy-Vanga S, Good M, Howard PA, Vacek JL. Role of vitamin D in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2010;106:798–805.
83. Reiss AB, Glass AD. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects. *J Invest Med* 2006;54:123-31
84. Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Suppression by 1,25(OH)2D3 of transcription of the pre-parathyroid hormone gene. *Endocrinology* 1986; 119:2864-66
85. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:767-72.

86. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Matsumura Y, Masuda H, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:324–9.
87. Saji F, Shiizaki K, Shimada S, Okada T, Kunimoto K, Sakaguchi T, Hatamura I, Shigematsu T. Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats. *Nephron Physiol* 2009;111:59–66
88. Sarnak MJ, Levey AS. Epidemiology of cardiac disease in dialysis patients. *Seminars in Dialysis* 1999;12:69-76
89. Schlessinger J, Iotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 2000;6:743–50.
90. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatr Soc* 2011;59:1596–601.
91. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004;19:429–35.
92. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6500–5.
93. Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation* 2004;110:1148–55.
94. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett* 1998;424:6–10.
95. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, Furberg CD, Psaty BM. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003;107:87–92.
96. Shroff R, Shanahan CM. Klotho: an elixir of youth for the vasculature? *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1–3.

97. Silver J, Russell J, Sherwood LM. Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4270-73
98. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005;67:1216–1233.
99. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: The hidden enemy. *Nephrology (Carlton)* 2006;11:36–41.
100. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:353-361.
101. Swaminathan S, Shah SV. Novel inflammatory mechanisms of accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Kidney Int* 2011;80:453-63.
102. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009;76:1248-57.
103. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D Receptor-mediated sequestration of NF- κ B signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1741-52.
104. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86:515-81.
105. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol. *N Engl J Med* 2003;349:446–56.
106. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 2008;52:519–30.
107. Tetta C, David S, Mariano F, De Nitti C, Panichi V. Alterations of the cytokine network in hemodialysis. *J Nephrol* 2001;14:22-9.
108. Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, Vandewalle A, Besselsen DG, Mühlbauer M, Jobin C, Kiela PR, Ghishan FK. Tumor ne-

- crosis factor and interferon-gamma down-regulate klotho in mice with colitis. *Gastroenterology* 2010;138:1384–94.
109. Wang HL, Xu Q, Wang Z, Zhang YH, Si LY, Li XJ, Yang QH, Xiao H. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. *Clin Chim Acta* 2010;411:386–90.
110. Wang Y, Kuro-O M, Sun Z. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. *Aging Cells* 2012;11:410–17.
111. Wang Y, Sun Z. Current understanding of Klotho. *Ageing Res Rev* 2009a;8:43–51.
112. Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension* 2009;54:810–7.
113. Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, Spanaus KS, Yonekawa K, Wischnowsky MB, Corti R, Kucher N, Roffi M, Eberli FR, Amann-Vesti B, Gay S, von Eckardstein A, Lüscher TF, Maier W. Cellular actors, toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2010;31:1457–69.
114. Yu X, Ibrahimi OA, Goetz R, Zhang F, Davis SI, Garringer HJ, Linhardt RJ, Ornitz DM, Mohammadi M, White KE. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* 2005;146:4647–56.
115. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis. *Kidney Int* 1999;55:648–58.
116. Zocalli C, Tripepi G, Mallamachi F. Dissecting Inflammation in ESRD: Do cytokines and C-reactive protein have a complementary prognostic value for mortality in dialysis patients?. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:169-73.