

Yupanqui Alberto Caldas Zuleta

Regulación de los
transportadores de fosfato
mediante receptores
nucleares LXR y FXR

Departamento

Anatomía Patológica, Medicina Legal y
Forense y Toxicología

Director/es

Sorribas Alejaldre, Víctor

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO MEDIANTE RECEPTORES NUCLEARES LXR Y FXR

Autor

Yupanqui Alberto Caldas Zuleta

Director/es

Sorribas Alejaldre, Víctor

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

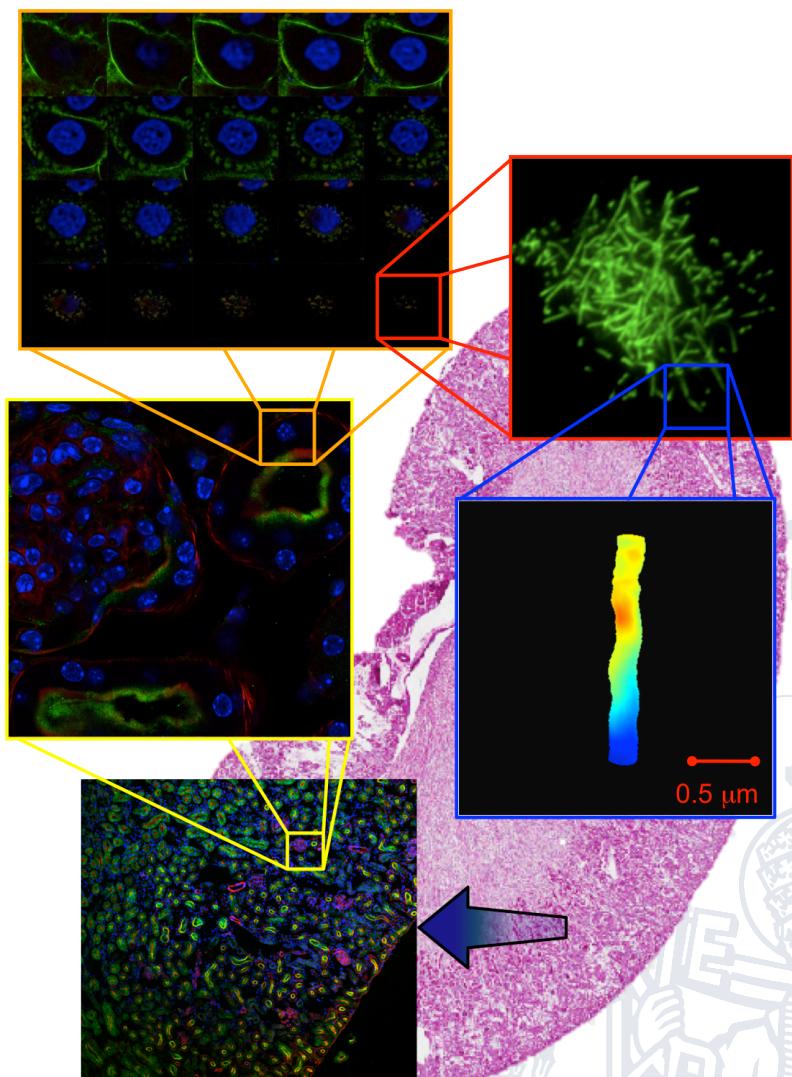
Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

2013



TESIS DOCTORAL

REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO MEDIANTE RECEPTORES NUCLEARES LXR Y FXR



YUPANQUI ALBERTO CALDAS ZULETA



Facultad de Veterinaria **Universidad Zaragoza**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, MEDICINA
LEGAL Y FORENSE Y TOXICOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO MEDIANTE RECEPTORES NUCLEARES LXR Y FXR

Memoria presentada por Yupanqui Alberto Caldas Zuleta, Licenciado en Química, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, bajo la dirección de Víctor Sorribas Alejaldre, Catedrático de Toxicología de la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Marzo de 2013

Este trabajo ha sido realizado con la subvención de una beca predoctoral del NIH (National Institute of Health) de los Estados Unidos (referencia 3R01 AG026529) y una beca de movilidad para la investigación de la Diputación General de Aragón (Referencia FMI37/10)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos aquellos que me han sido parte de este logro:

A la Universidad de Zaragoza y a Víctor por su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

Al profesor Moshe Levi y a la Universidad de Colorado Denver por la posibilidad de desarrollar parte del proyecto de investigación en Denver.

A mis amigos del laboratorio con los que he compartido grandes experiencias: Héctor, Eduardo, Ana, Cecilia, María Jesús y Michael.

A mi familia por su soporte. Finally, thank you to my lovely wife who has supported me all the way through.

GBUA.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	6
1. EL RIÑÓN COMO ÓRGANO FUNDAMENTAL EN LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO.....	8
1.1. Transportadores de fosfato renales.....	10
1.2. NaPi2a.....	11
1.3. NaPi2c.....	12
1.4. Los transportadores tipo III.....	13
2. LA FUNCIÓN DEL INTESTINO EN LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO	13
2.1. NaPi2b.....	15
2.2. Los PiTs.....	15
2.3. Absorción paracelular.....	16
3. FACTORES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES NAPI.....	16
3.1. Concentración de fosfato.....	17
3.2. FGF23.....	18
3.3. Hormona paratiroidea (PTH).....	19
3.4. Interacciones con las proteínas de dominios PDZ.....	21
3.5. Función de los lípidos en la regulación de los transportadores de Pi.....	23
3.6. Vitamina D	24
4. PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO	26
4.1. Desórdenes genéticos.....	27
4.2. Enfermedad renal crónica	27
4.3. Hiperfosfatemia	28
4.4. Nefropatía diabética	28
5. RECEPTORES NUCLEARES Y LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO.	30
5.1. Liver X Receptor (LXR) y Farnesoid X Receptor (FXR)	30
5.2. El Receptor de la Vitamina D (VDR)	33
6. MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO.....	34
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. REACTIVOS	38
1.1. Agonistas de FXR y LXR.....	38
2. INSTRUMENTACIÓN	39
3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	41
4. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE BORDE DE CEPILLO (BBM).....	43
4.1. Materiales, reactivos y aparatos.....	43
4.2. Procedimiento para las BBM de riñón.....	43

4.3. Procedimiento para las BBM de Intestino	44
5. INMUNOFLUORESCENCIA EN RIÑONES E INTESTINO DE RATA Y RATÓN ..	45
5.1. Perfusion completa de la rata in vivo.....	45
5.2. Materiales, reactivos y aparatos.....	46
5.3. Procedimiento.....	46
5.4. Tratamiento de las muestras	46
5.5. Inmunofluorescencia	47
6. INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS.....	47
6.1. Líneas Celulares.....	47
6.2. Materiales, aparatos y reactivos.....	48
6.3. Procedimiento.....	48
7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS- BCA (PROTOCOLO PIERCE)	49
8. EXTRACCIÓN DE ARN	49
9. TRANSCRIPCIÓN REVERSA	50
10. WESTERN-BLOTS (SDS-PAGE)	50
10.1. Procedimiento.....	50
10.2. Anticuerpos primarios utilizados.....	51
10.3. Anticuerpos secundarios utilizados	52
11. SÍNTESIS DE ADNc Y PCR CUANTITATIVAS	52
11.1. Síntesis de ADN complementario desde ARN total o transcripción reversa	52
11.2. Procedimiento.....	52
11.3. Amplificación del ADN complementario de interés con cebadores específicos mediante PCR	53
12. TRANSPORTE DE VESÍCULAS	54
13. TRANSPORTE DE PI EN CÉLULAS.....	54
14. RACE EN CÉLULAS OK	55
14.1. Extracción de ARN total de células OK	56
14.2. Obtención de secuencias parciales de células OK	56
14.3. Amplificación de los extremos 5' y 3' de los transcritos de OK	57
14.4. Secuenciación y ensamblaje de las secuencias	58
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
V. RESULTADOS	61
<i>INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS.....</i>	62
1. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES. 62	62
2. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO POR PARTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES FXR Y LXR.....	62
3. MODELO CELULAR INTESTINAL PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO.....	62
4. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES. 63	63
4.1. Regulación de los transportadores de fosfato intestinales por el Pi.....	64
4.2. Adaptaciones crónicas a alto y bajo fosfato	67
4.3. Adaptaciones agudas de bajo a alto fosfato.....	73
4.4. Publicaciones generadas de este apartado	77

5. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO POR PARTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES FXR y LXR.....	79
5.1. Las células OK expresan NaPi2c, PiT1, PiT2 y PIST.	80
5.2. La células OK pueden ser usadas como modelo de estudio de la regulación de los transportadores renales NaPi, por medio de los receptores nucleares FXR y LXR.....	84
2.2.1 Resultados de concentración letal por LDH intracelular:.....	84
2.2.2 Determinación de la activación de los receptores nucleares.	85
2.2.3 El uso de agonistas de FXR y LXR induce cambios en el contenido lipídico en células OK.	86
2.2.4 FXR y LXR modulan el transporte de Pi en células OK y la expresión de NaPi4.....	89
5.3. Efectos de los tratamientos agudos con agonistas de FXR y LXR en los transportadores de fosfato de ratón.	91
5.4. Efecto del tratamiento crónico de los agonistas del LXR en los transportadores de fosfato.....	93
5.5. Publicaciones generadas de este apartado	102
6. MODELO CELULAR PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES.....	103
6.1. Publicaciones generadas asociadas a este apartado	112
VI. DISCUSIÓN	113
1. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES	114
2. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO POR PARTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES FXR Y LXR.	120
3. MODELO CELULAR PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES.....	127
VII. CONCLUSIONES	131
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
IX. ANEXOS	147

I. RESUMEN

La homeostasis del fosfato inorgánico (Pi) se controla mediante una serie de mecanismos neuroendocrinos, que actúan sobre el intestino, hueso y riñón. Estos mecanismos se alteran en situaciones patológicas como la enfermedad renal crónica, durante la cual puede generarse hiperfosfatemia. Ésta, junto a las dislipidemias, son factores asociados al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La nefropatía diabética combina todos estos factores, ya que la acumulación de lípidos en el riñón acelera la insuficiencia renal. El estudio de estas patologías ha permitido el descubrimiento de los receptores nucleares LXR (*Liver X Receptor*) y FXR (*Farnesoid X Receptor*), y el establecimiento de nuevas estrategias farmacológicas basadas en sus activaciones. Hemos demostrado que LXR y FXR parecen regular la expresión de los transportadores de fosfato en intestino y riñón, y así como la fosfatemia.

Con respecto a los transportadores de fosfato NaPi2b y PiT1 y su importancia en la absorción intestinal de Pi, hemos demostrado que: 1) NaPi2b y PiT1 se expresan en la membrana apical de enterocitos; 2) la expresión es mayor en duodeno y yeyuno, al igual que lo es el transporte de Pi; y 3) durante la adaptación crónica a dieta baja en fosfato, la expresión NaPi2b se incrementa solamente en yeyuno, mientras que esa expresión es también máxima en la adaptación aguda a dieta alta en fosfato.

Los transportadores de Pi son regulados también por FXR y LXR en células renales OK (Opossum Kidney) y en íleon de ratón, concluyendo que: 1) los agonistas de LXR reducen la expresión de NaPi2b en intestino, y de NaPi2a, NaPi2c, y PiT2 en riñón; 2) estos agonistas disminuyen la concentración de Pi en sangre e incrementan la excreción de Pi en la orina; y 3) los resultados observados en ratón, son reproducibles en el modelo celular renal, células OK, y en éstas se observa una menor expresión de NaPi4.

Finalmente, hemos establecido el primer modelo celular para el estudio de los transportadores de Pi: 1) las células CaCo-2_{BBE} expresan el transportador de fosfato NaPi2b; 2) el transporte de Pi es sodio dependiente, en condiciones fisiológicas (1 mM Pi en medio de cultivo); 3) hay un incremento de hasta 5 veces en el transporte de fosfato sodio independiente, como respuesta a medios con altas concentraciones de Pi (4 mM Pi); 4) estudios de inhibición y cinéticas de Michaelis-Menten evidencian la presencia de un nuevo transportador de Pi, sin identificar.

II. OBJETIVOS

Nuestro **objetivo principal** ha sido la caracterización de los efectos de los agonistas de los receptores nucleares FXR y LXR en los transportadores renales e intestinales de fosfato, y para ello hemos establecido los siguientes objetivos parciales:

- 1) Identificar los diferentes transportadores de fosfato expresados en el intestino delgado.
 - Caracterizar la abundancia en proteína y ARN de los diferentes transportadores de fosfato en los tres segmentos del intestino delgado de rata.
 - Evaluar la respuesta de los transportadores de fosfato a dietas con concentraciones alta y baja de fosfato, en los tres diferentes segmentos del intestino delgado.
- 2) Determinar los efectos de los agonistas del FXR y LXR en modelos celulares (*in vitro*).
 - Determinar las concentraciones citotóxicas de los agonistas del FXR y LXR en cultivo celular.
 - Determinar las concentraciones farmacológicas para la activación de los genes diana de los agonistas de LXR y FXR.
 - Determinar los efectos en el transporte de fosfato a las concentraciones farmacológicas.
- 3) Evaluar los efectos de los agonistas de los receptores nucleares FXR y LXR en ratón (*in vivo*).
 - Analizar cambios en la expresión de los transportadores de fosfato en riñón e intestino.
 - Medir los cambios en las concentraciones de fosfato en sangre y orina, y las concentraciones de las hormonas más importantes en la regulación del fosfato.

- 4) Establecer un modelo celular para el estudio de la regulación de los transportadores de fosfato en intestino, y mejorar el existente para el riñón.

III. INTRODUCCIÓN

El fosfato inorgánico (Pi) es el anión más abundante en el cuerpo humano y es un componente esencial de diferentes procesos biológicos: metabolismo de ATP, síntesis de fosfolípidos y otros componentes de la membrana celular, de ácidos nucleicos, constituyente de hueso, transducción intracelular de señales, control del pH, etc. En el hueso se encuentra el mayor porcentaje de Pi (80% a 85% del total del organismo), aunque también está presente en los fluidos extracelulares (alrededor del 1%) en forma de ion libre. En esta tesis doctoral nos hemos ocupado de este último, es decir, de la regulación de la concentración de Pi en los fluidos extracelulares por parte de los transportadores de fosfato [1, 2] .

El control de la homeostasis del Pi se lleva a cabo mediante una serie de mecanismos neuroendocrinos, que actúan sincronizadamente sobre el intestino, hueso y riñón (Figura 1). En estos tejidos se expresan principalmente los transportadores de Pi de tipo II, los cuales son, en últimas, los efectores responsables de mantener dicha homeostasis.

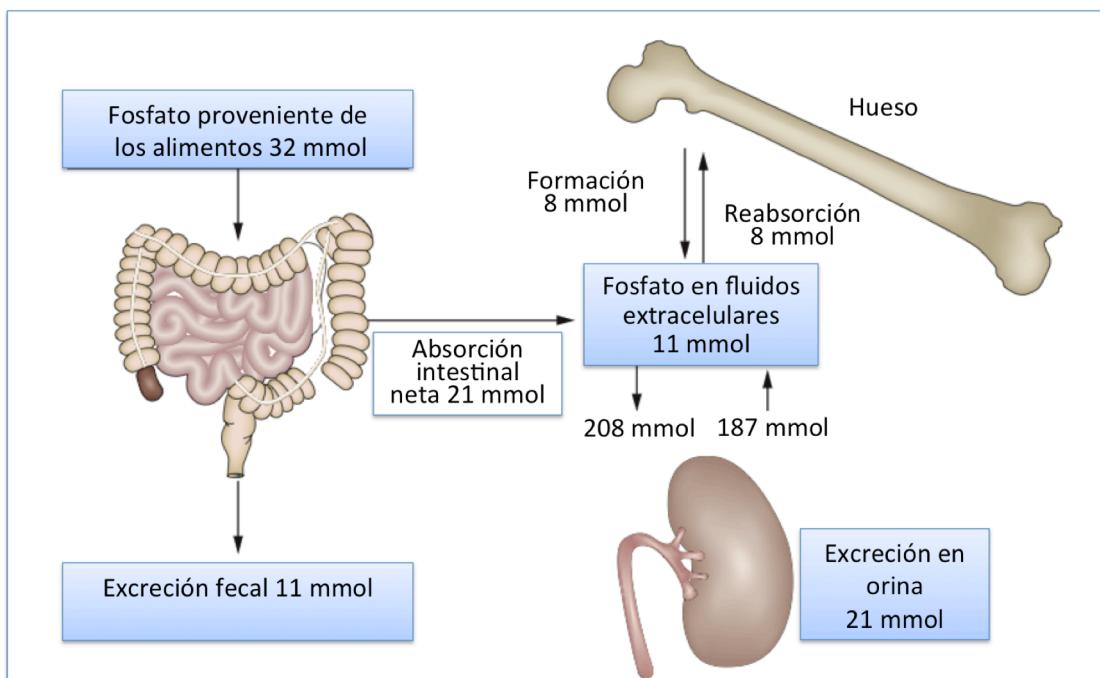


Figura 1. Órganos involucrados en la regulación del fosfato inorgánico. También se indican las cantidades aproximadas de fosfato metabolizado en estos órganos, en condiciones fisiológicas. Modificado de Amir S. *Nature Reviews Nephrology* 6, 657-665, 2010.

La homeostasis del fosfato es el resultado neto de tres mecanismos:

- 1) La absorción del fosfato proveniente de los alimentos (aproximadamente entre 800 y 1200 mg al día en humano adulto), de los cuales el 70% es absorbido y el remanente excretado en la materia fecal.
- 2) De la liberación de los huesos
- 3) De la cantidad excretada/reabsorbida en el riñón, órgano que hasta ahora se había considerado el principal órgano en la regulación de la homeostasis del Pi.

En condiciones fisiológicas en el hombre, la concentración de Pi libre en el plasma sanguíneo está en un rango fisiológico de entre 0.9 y 1.4 mM. Sin embargo, esta concentración puede verse alterada como suele ocurrir, por ejemplo, en insuficiencia renal crónica. En este caso tiene lugar una hiperfosfatemia, que está asociada a un gran número de complicaciones vasculares y renales, como la aterosclerosis o calcificación vascular medial [3, 4].

Por todo ello, el estudio de la regulación de los transportadores de Pi es de gran interés científico y relevancia clínica.

1. EL RIÑÓN COMO ÓRGANO FUNDAMENTAL EN LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO.

El riñón es considerado el órgano más importante en la regulación de la homeostasis del fosfato en condiciones normales. Por él se ultrafiltra el fosfato de la sangre, pero que en condiciones normales un 70% aproximadamente de ese fosfato es reabsorbido en el túbulo proximal, y el resto es excretado con la orina. Esa cantidad excretada es similar a la cantidad absorbida por el intestino en condiciones normales, lo cual proporciona un equilibrio entre ingestión y excreción que, sin embargo, puede verse afectado por muchos factores.

La unidad funcional fundamental del riñón es la nefrona [1]. En cada riñón humano hay entre 0.6×10^6 y 1.4×10^6 nefronas, mientras que el de

ratón cuenta con unas 30.000 [5]. Los componentes fundamentales de la nefrona son el corpúsculo de Malpighi (constituido por el glomérulo y la cápsula de Bowman), el túbulo proximal (porción contorneada y recta), el asa de Henle, el túbulo distal (contorneado y recto) y el túbulo colector, todos de origen metanéfrico. El túbulo colector, que incluye, el túbulo colector cortical, el túbulo colector de la médula externa y el túbulo colector de la médula interna, no es considerado parte de la nefrona porque embriológicamente no deriva del blastema metanéfrico. Sin embargo, todos los componentes de la nefrona y el túbulo colector están relacionados funcionalmente (Figura 2).

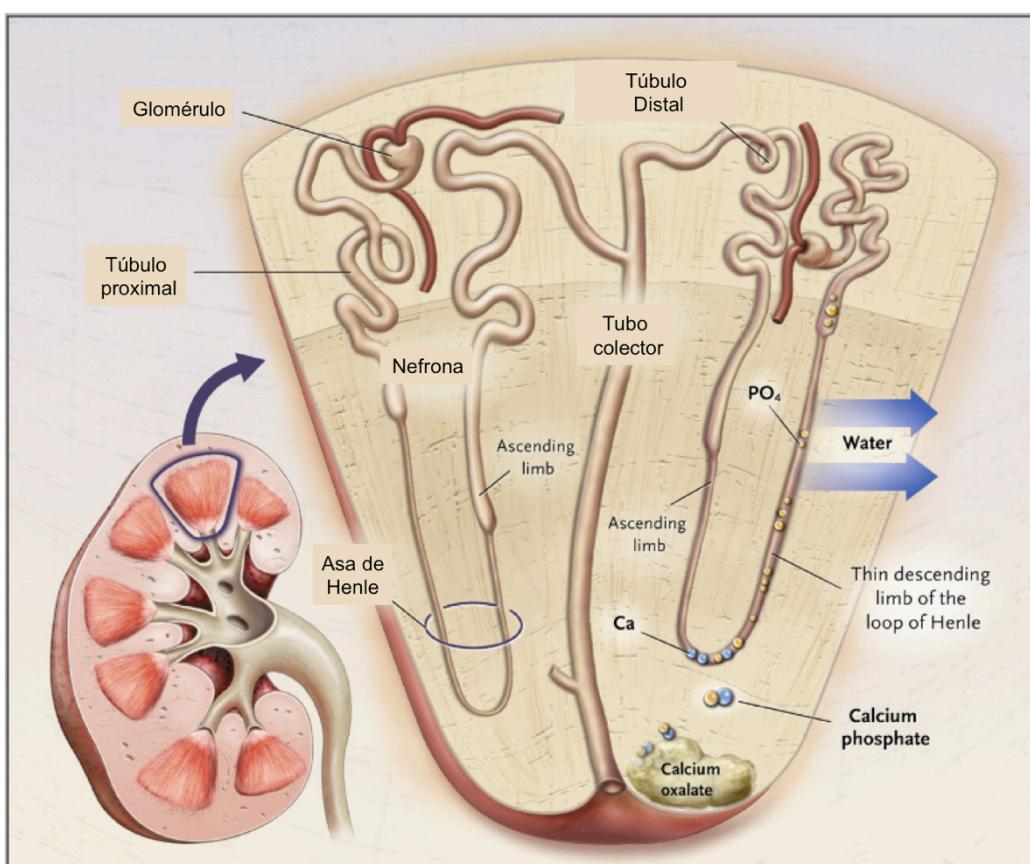


Figura 2. Esquema de la nefrona humana. Modificado de Prie, D. N Engl J Med 2010.

En el riñón, la reabsorción del Pi y su regulación se lleva a cabo principalmente en el túbulo proximal. Por él se reabsorbe el 60-70 % del fosfato total reabsorbido por el riñón, mientras que el resto se reabsorbería en los segmentos distales de la nefrona [6]. El proceso de reabsorción de Pi en el túbulo proximal es mediado por los transportadores que allí se expresan.

1.1. Transportadores de fosfato renales

En la membrana apical en borde en cepillo de las células del túbulo proximal se expresan los transportadores de fosfato (cotransportadores sodio/fosfato, NaPi), proteínas encargadas de la reabsorción del fosfato del fluido tubular. Estos transportadores usan la energía libre del gradiente electroquímico del Na^+ para transportar fosfato al interior de la célula. Diferentes factores dietéticos, hormonales y metabólicos afectan a la expresión, tráfico y función de los transportadores de fosfato, y por ende a la regulación de la homeostasis del fosfato.

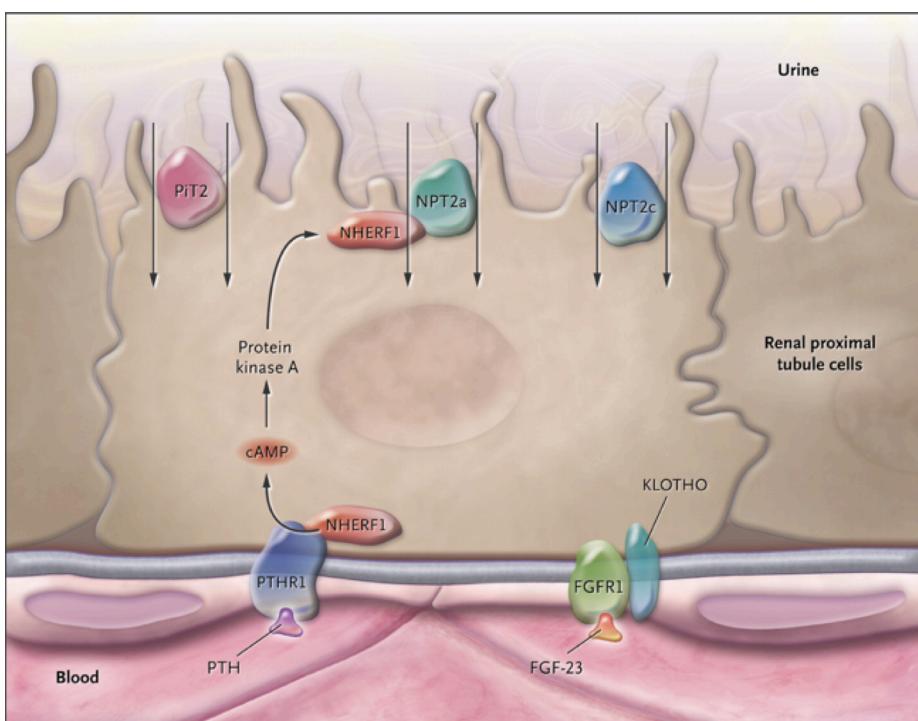


Figura 3. Expresión de los transportadores de fosfato en las células del túbulo proximal. Modificado de Prie, D. N Engl J Med 2010;362:2399-409.

Tres familias diferentes de transportadores NaPi han sido identificadas en el riñón: tipo I (NaPi-1; Npt1; SLC17), tipo II (**NaPi2a o NaPi-IIa**, Npt2a, SLC34A1; **NaPi2c o NaPi-IIc**, Npt2c, SLC34A3), y tipo III (**PiT-1**, SLC20A1; **PiT-2**, SLC20A2)[7]. Los transportadores involucrados en la reabsorción de fosfato en el túbulo proximal son, al menos, NaPi2a, NaPi2c y PiT2, y la expresión de todos ellos en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal ha sido descrita recientemente [8, 9] (Figura 3). En los dos

primeros, principalmente el NaPi2a, se ha enfocado el estudio de la regulación del transporte de fosfato.

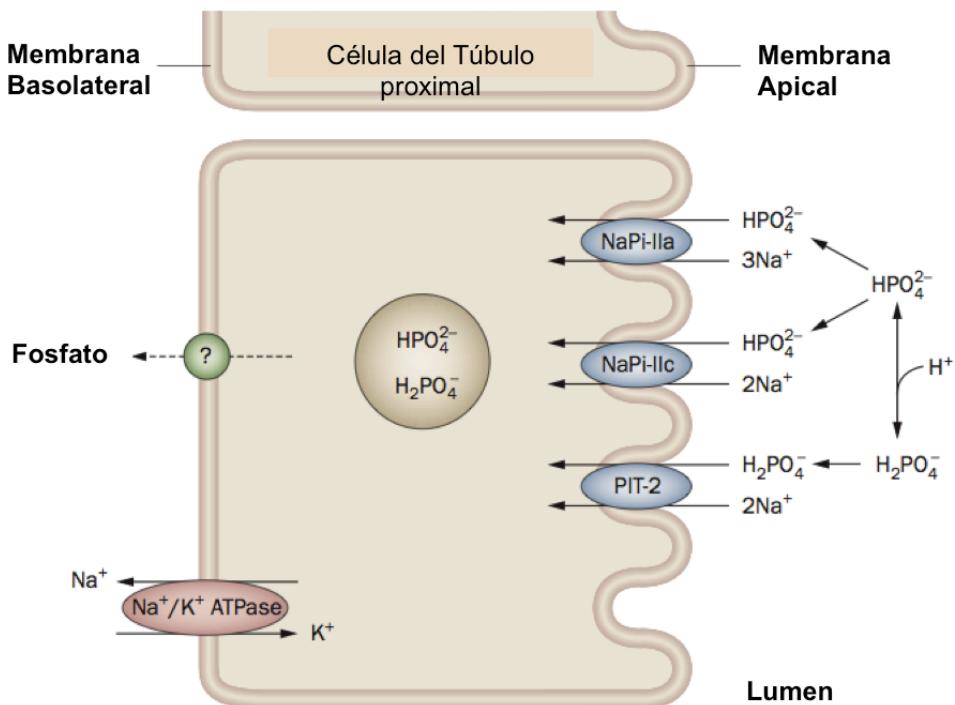


Figura 4. Localización de los transportadores de fosfato en el túbulo proximal del riñón. Modificado de Alizadeh Naderi, A. S. & Reilly, R. F. Nat. Rev. Nephrol. 2010

1.2. NaPi2a.

NaPi2a pertenece a la familia de los SLC34, del inglés *Solute Carrier Family 34*, también conocidos como transportadores de Pi de tipo II, que son similares entre muchas especies incluido humanos [10, 11]. El NaPi2a es la isoforma predominante en el túbulos proximal del riñón, y se expresa predominantemente en los segmentos S1 y S2 del túbulos proximal. Varios estudios del ratón carente de NaPi2a (NaPi2a K.O.) muestran su importancia fisiológica, ya que es responsable de casi el 70% de la reabsorción del Pi de la orina primaria[12]. Sin embargo, este porcentaje puede ser aún mayor, ya que otros transportadores pueden suplir en el ratón la ausencia de NaPi2a. Por eso, más recientemente se ha estimado que en condiciones normales, NaPi2a puede encargarse de más del 90 % de la reabsorción [13].

Dada la elevada expresión del NaPi2a y la importancia en la regulación de la reabsorción del fosfato en el riñón, en las últimas décadas los estudios fosfato inorgánico se han enfocado en este transportador. Gracias a experimentos de electrofisiología, se ha determinado que es un transportador reogénico, ya que por cada Pi (HPO_4^{2-}) que transporta introduce 3 átomos de sodio (3 Na^+), transportándose, por lo tanto, una carga positiva neta de +1 al interior celular [14]. Aparentemente NaPi2a sólo transporta fosfato divalente (HPO_4^{2-}) lo cual lo hace más activo a pH básicos [13], ya que la concentración de ese sustrato aumenta con el pH. Posee una afinidad de 0.1 mM para el Pi y 70 mM para el Na^+ . Recientemente se ha reportado que, al igual que la isoforma NaPi2c, mutaciones en el gen Npt2a también dan origen a enfermedades hereditarias poco comunes como el raquitismo hereditario con hipofosfatemia y síndrome de Fanconi, pero que evidencian la importante función que este transportador renal desempeña en la regulación de la concentración del fosfato en el plasma [15].

1.3. NaPi2c.

El tercer miembro de la familia SLC34, NaPi2c, es el transportador de Pi identificado más recientemente. Se expresa también en el riñón y se publicó inicialmente en 1996 como un transportador muy abundante durante las primeras fases de crecimiento [16]. Luego, Segawa y cols. demostraron que en el riñón adulto continúa expresándose, manteniendo una actividad basal de reabsorción de fosfato en el túbulo proximal. Esta actividad complementaría la actividad de NaPi2a hasta un 30% de la reabsorción total, lo cual fue confirmado recientemente en estudios realizados en ratones del KO de NaPi2c. En humanos, el transportador NaPi2c también presenta una relevancia clínica, ya que ciertas patologías se han relacionado con mutaciones en el gen de Npt2c como en HHRH, del inglés *Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria* (raquitismo hereditario con hipofosfatemia e hipercalciuria). Al igual que los otros transportadores de tipo dos, NaPi2c transporta fosfato divalente, y por ello presenta mayor actividad a pH elevados. Sin embargo, a diferencia del NaPi2a, NaPi2c es un transportador neutro, es decir, que transporta 2 átomos de sodio por cada

grupo fosfato (PO_4^{2-}), posee una menor afinidad para el Pi (Km de 0.33 mM), y de 70 mM para el Na^+ [13]. No se ha descrito expresión del NaPi2c en otros tejidos aparte del riñón.

1.4. Los transportadores tipo III.

La familia SLC20 está compuesta por los transportadores Pit-1 y Pit-2. Fueron identificados en los años 90 como proteínas involucradas en infecciones virales. Pit-1 se clonó como el receptor del virus de la leucemia del gibón (GLVR1), descubierto por Ohara y cols. en 1990. Posteriormente, Kavanaugh y cols. (1994) lo identificaron como un transportador de fosfato sodio-dependiente, tras su expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* y en líneas celulares. Este mismo grupo, utilizando idénticos modelos de expresión, descubrieron que el receptor del virus de la leucemia de ratón (Ram-1) también actuaba como transportador de fosfato sodio-dependiente. Posteriormente se comprobó que Pit-2, al igual que NaPi-IIa y NaPi-IIc, se expresa en el riñón de rata y de ratón. Pit-1 y Pit-2 transportan fosfato monovalente, por lo que son más activos a pH bajo. Son también electrogénicos, ya que mueven dos sodios por cada fosfato monovalente.

2. LA FUNCIÓN DEL INTESTINO EN LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO

Hasta hace poco se consideraba que el único órgano encargado de la mantener la regulación de la homeostasis del fosfato era el riñón, y que el intestino sería, simplemente, un órgano que permitiría la absorción del fosfato a favor de su gradiente electroquímico. A esta conclusión se había llegado gracias a estudios previos sobre los mecanismos de absorción intestinal de fosfato, hechos por McHardy y Parsons, quienes propusieron que la absorción intestinal seguía principalmente un proceso pasivo (paracelular, Figura 5). Es decir, la absorción sería no-saturable, y se realizaría a lo largo de todo el intestino, es decir, el intestino delgado y el grueso, especialmente el colon. Sin embargo, este último sería fisiológicamente irrelevante ya que las concentraciones necesarias para observar absorción significativa son más de 1000 veces mayores que la concentración de fosfato en sangre [17]. (Figura 5)

Posteriormente, también se determinó la existencia de un segundo mecanismo, el transporte transcelular, el cual mostró ser dependiente de sodio [18] (Figura 5). Más tarde, estudios *in vitro* en segmentos de intestino y vesículas aisladas de membrana de borde de cepillo (BBM del inglés *brush border membranes*) permitían confirmar que el transporte de Pi tenía una componente Na-dependiente.

Ahora se considera que, en intestino delgado, el principal transportador es NaPi2b (SLC34A2) un transportador de tipo II que fue clonado y caracterizado inicialmente por el grupo del Prof. Murer en 1998 [19], y que en la ultima década se ha transformado en un foco de investigación, ya que se considera una diana farmacológica para prevenir la hiperfosfatemia asociada a la enfermedad renal crónica.

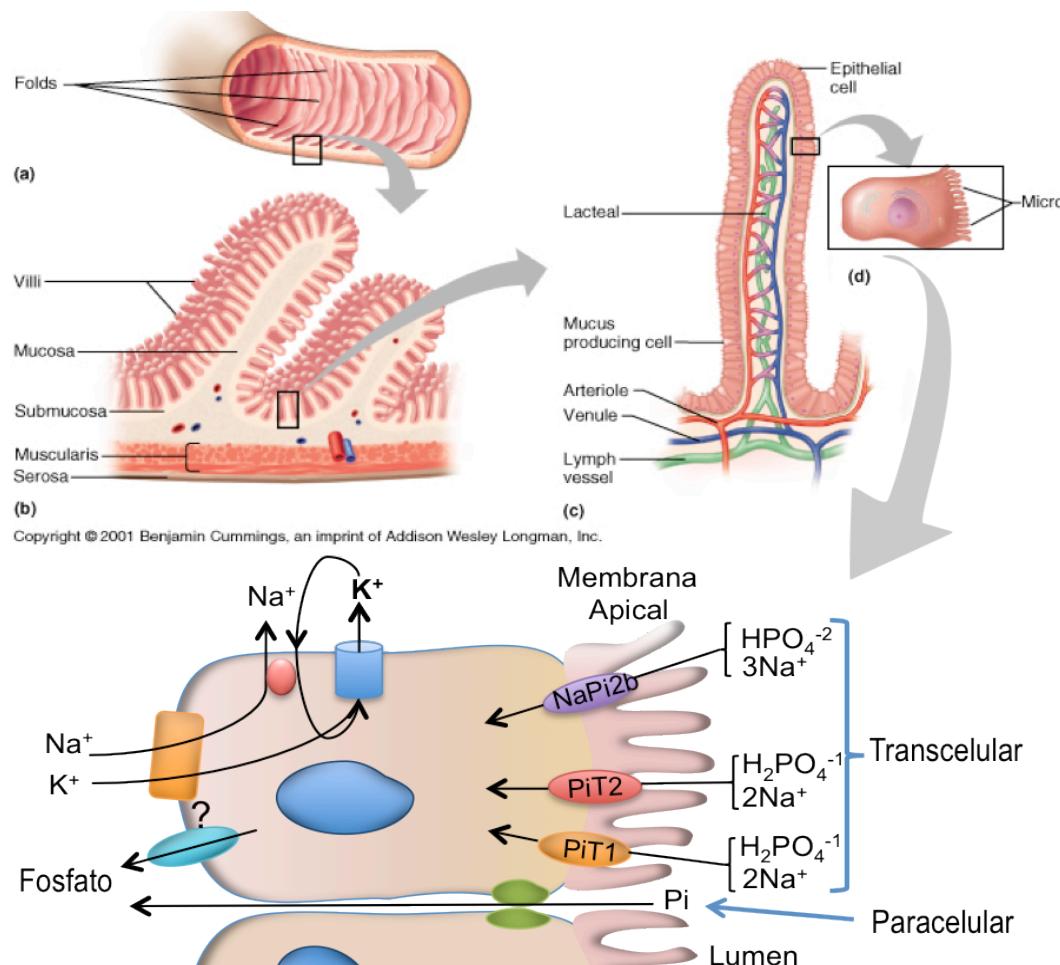


Figura 5. Transporte de fosfato intestinal. Representación esquemática de la expresión y localización de los transportadores de fosfato y los diferentes factores involucrados en el transporte de fosfato intestinal. Modificado de Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman, Inc. 2001.

2.1. NaPi2b

Este transportador tipo II es el segundo de las tres isoformas que conforman la familia SLC34A, no sólo se le considera el principal transportador responsable de la absorción de fosfato en el intestino delgado, sino que también tiene una función importante en otros tejidos como el pulmón, las glándulas mamarias, el hígado o los testículos. En la mayoría de estos tejidos, el transportador se localiza en la membrana apical. Al igual que el NaPi2a, es un transportador reogénico que tiene preferencia por el fosfato divalente, aunque unos trabajos realizados por nuestro grupo de investigación muestran un efecto del pH más moderado que en el caso de NaPi2a y -2c. Este transportador está regulado por la vitamina D y por dietas bajas en fosfato [20]. NaPi2a y NaPi2b son bastante homólogos en su secuencia aminoacídica, con las diferencias más llamativas en su extremo carboxilo. Las constantes cinéticas de afinidad aparente (K_m) de este transportador para el Pi y el Na son: K_m Pi = 10 μ M y K_m Na = 33 mM [13, 21].

Se han determinado diferencias en la expresión de NaPi2b entre especies animales. Por ejemplo, en rata y humanos se ha demostrado que NaPi2b se expresa principalmente en duodeno y yeyuno, lo cual coincide con el segmento del intestino considerado como el que presenta la mayor absorción de fosfato en condiciones normales [22]. Por el contrario, el ratón presenta la mayor expresión de NaPi2b en el íleon, que es el segmento con mayor transporte de fosfato en esta especie de roedor. Por todo ello, la investigación científica se ha centrado en la regulación de este transportador de fosfato tipo II, ya que una intervención farmacológica que permitiera su inhibición podría tener un alta relevancia clínica y económica en el marco de la enfermedad crónica renal, como será discutido mas adelante.

2.2. Los PiTs.

Ambos transportadores tipo III son miembros de la familia SLC20A: PiT1 y PiT2. Los dos se expresan en el intestino delgado, pero la función y los

mecanismos que regulan estos transportadores en el intestino presentan aún muchas incógnitas, principalmente el PiT1. Esto es debido a que, aunque se ha determinado su expresión en la BBM de los enterocitos del intestino delgado de rata y ratón, aparentemente no presenta modificaciones en su expresión en respuesta a cambios de la concentración de fosfato de la dieta, o incluso a hormonas. Por contra, estudios recientes de nuestro grupo aún sin publicar, muestran que la expresión del PiT2 en BBM de enterocitos de íleon de rata se incrementa como respuesta a adaptaciones crónica de ratas a dietas de bajo fosfato.

2.3. Absorción paracelular.

Como se ha mencionado anteriormente, el paso paracelular es una ruta de absorción intestinal pasiva que depende del gradiente electroquímico de Pi a lo largo de la mucosa intestinal. La absorción se realiza a través de las llamadas uniones estrechas (*tight junctions*) en las que las proteínas ocludinas y claudinas tendrían una función importante, ya que éstas no sólo forman parte del complejo de proteínas de adhesión que unen células adyacentes, sino que también regulan el flujo de iones que atraviesan los espacios intercelulares. Un ejemplo es el caso de la absorción de magnesio en el intestino, ya que mutaciones en la Claudina 16 generan patologías que se caracterizan por bajo contenido de magnesio en sangre. Aunque el mecanismo de la regulación de estas proteínas, y la formación y regulación de las uniones estrechas ha sido estudiada por mucho tiempo, la absorción paracelular de fosfato es un área todavía poco explorada. [23-25]

3. FACTORES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES NAPI.

La homeostasis del fosfato inorgánico (Pi) se controla mediante una serie de mecanismos neuroendocrinos (PTH, FGF23, vitamina D, etc.) que actúan sincronizadamente sobre el intestino, hueso y riñón (Figura 6). Aunque el riñón es el principal órgano encargado de regulación de esta homeostasis, estudios recientes han demostrado que el intestino también tiene gran importancia en este proceso [26]. A continuación se analizan los diferentes factores involucrados en mantener esta homeostasis.

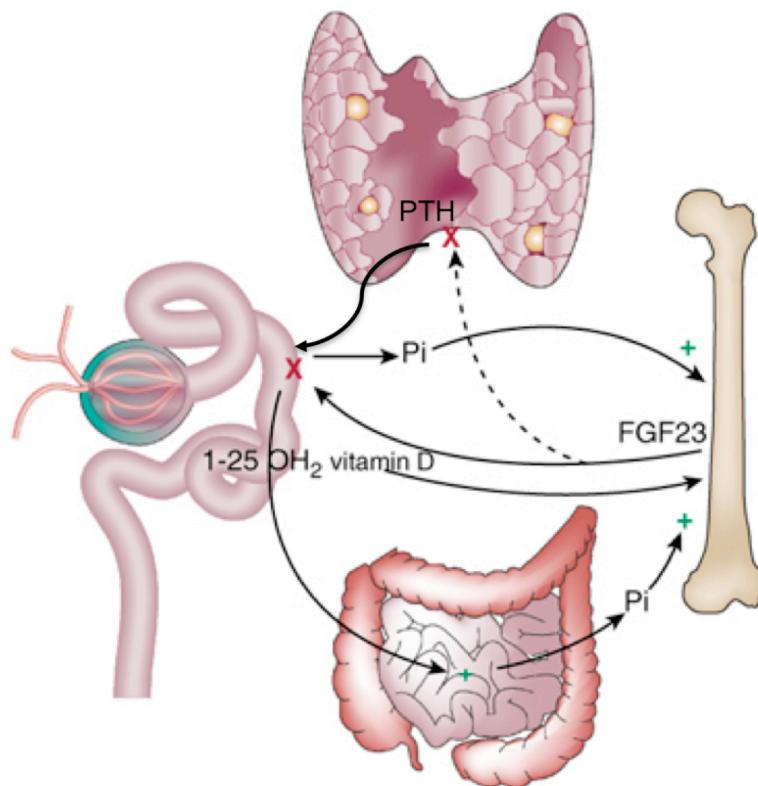


Figura 6. Principales factores involucrados en la homeostasis del fosfato. Modificado de Prie, D. Kidney Int (2009) 75.

3.1. Concentración de fosfato.

La regulación de los transportadores de fosfato renales e intestinales por medio de la concentración de fosfato de la dieta ha sido uno de los procesos mejor estudiados, cinética y molecularmente. La ingesta de una dieta baja en fosfato induce una absorción total por parte del intestino y, a la vez, una reabsorción prácticamente total del fosfato en el túbulo renal. Por el contrario, dietas altas en Pi producen un descenso en la absorción intestinal y reabsorción renal de Pi, y consecuentemente, una mayor excreción de Pi en la orina y heces. Estos cambios son rápidos y prácticamente independientes de las concentraciones plasmáticas de las hormonas más conocidas que regulan la homeostasis de fosfato. Por ello, se ha especulado sobre la existencia de un factor humorral involucrado en estos efectos que todavía no ha sido identificado. De todas formas, también hay evidencias de un efecto directo a consecuencia de las concentraciones de Pi extracelulares, sobre todo en pruebas con líneas celulares renales.

Los efectos generados por dietas de alto o bajo Pi tanto en el intestino como en el riñón, se explican por cambios en la abundancia de los transportadores en la BBM, tanto en el tejido intestinal como en el riñón. Estos cambios se han determinado experimentalmente mediante inmunoadsorción (*Western blot*) e inmunohistoquímica en intestino delgado, túbulos renales y en líneas celulares. También se han confirmado con pruebas *in vitro* de transporte de Pi radioactivo (^{32}P) en tejido animal (para el caso del intestino), o en vesículas membranosas aisladas de BBM de mucosa intestinal o túbulo proximal de riñón. Así por ejemplo, se ha descrito un incremento de NaPi2a, NaPi2c, y PiT2 en la membrana de borde en cepillo en respuesta a dietas de bajo Pi [13, 27, 28], y un incremento de NaPi2b en el intestino delgado. Además, trabajos en nuestro grupo han determinado que diferentes segmentos del intestino delgado de rata responden de modo diferente a dietas de alta y baja concentración de fosfato. Dichas adaptaciones, como en el caso del duodeno de rata, en donde cambios agudos de la concentración de Pi (de baja a alta) inducen un mayor transporte y una mayor expresión del transportador NaPi2b, se han podido corroborar en un nuevo modelo intestinal de transporte de fosfato. Todo esto forma parte de los estudios realizados en esta tesis doctoral. (Giral-Caldas AJP renal 2009)

3.2. FGF23.

La hormona conocida como FGF23, factor 23 de crecimiento de fibroblastos (del inglés *Fibroblast Growth Factor 23*) es el miembro más destacado de las llamadas fosfatoninas, las cuales son un grupo de factores humorales en el plasma sanguíneo con efecto fosfatúrico, es decir, incrementan la excreción de Pi por la orina. El término “fosfatonina” fue introducido en 1994 por Cai y cols. a partir de estudios de osteomalacia inducida por tumor [29, 30].

El FGF23 fue descubierto en estudios que buscaban determinar la causa de la osteomalacia inducida por tumor asociada a hipofosfatemia [31]. Estos investigadores demostraron que el FGF23 es una hormona producida por los osteocitos, con capacidad de regular la homeostasis del fosfato,

manteniendo una conexión directa entre el hueso y el riñón. Cambios en la formación de hueso y en la concentración de Pi en sangre, estimulan la secreción de esta hormona por los osteocitos, ya que estas células tienen la capacidad modular el depósito de Pi en los huesos. Cuando la concentración de Pi en sangre se incrementa, bien sea por una dieta rica en Pi o por liberación desde el hueso, el FGF23 es expresado por los osteocitos y actúa sobre el túbulo proximal del riñón limitando la reabsorción, con el consecuente incremento en la excreción de Pi en la orina. Aunque el mecanismo exacto de acción del FGF23 en el riñón no se ha estudiado tanto como los efectos del PTH, se sabe que el FGF23 provoca una reducción en la expresión de NaPi2a y NaPi2c en el túbulo proximal. Este efecto está mediado por el receptor del FGF23 (FGFR1) y el co-receptor de la proteína Klotho, que inducen una cadena de señales entre las cuales las que destacan la fosforilación de la quinasa reguladora de señal extracelular, ERK (del inglés *extracellular signal-regulated kinase*), y del factor de transcripción Erg-1 (*early growth response-1 gene*). La fosforilación de estas proteínas es requerida para inducir la degradación del NaPi2a de las BBM. FGF23 también inhibe la expresión de vitamina D, e incrementa su catabolismo al inducir la expresión de la enzima 24-OH hidroxilasa.

3.3. Hormona paratiroides (PTH).

Esta hormona, secretada por las glándulas paratiroides, está constituida por 84 aminoácidos en su forma madura. Su síntesis y secreción está finamente regulada por la concentración extracelular de calcio iónico, y es secretada al torrente sanguíneo cuando la concentración plasmática de calcio disminuye, lo cual la convierte en uno de los reguladores más importantes de la homeostasis del calcio. Su acción se ejerce principalmente sobre el riñón y el hueso, cuyas células expresan el receptor de PTH de tipo 1 (PTH1R)[32].

La PTH estimula directamente la reabsorción tubular de calcio en el riñón, mientras que en el hueso induce la liberación de calcio de la matriz. Además de las acciones reguladoras sobre la homeostasis del calcio a cargo de la PTH, hay que añadir su función en el mantenimiento de las concentraciones

sanguíneas de fosfato por medio de la inhibición de la reabsorción en los túbulos proximal y distal del riñón. Aún así, hay que hacer notar que otros factores son más importantes que la PTH en la regulación de la homeostasis del fosfato, particularmente la concentración de Pi de la dieta. La regulación proximal sobre el transporte de fosfato mediada por PTH, ha sido un mecanismo muy estudiado en los últimos veinte años. Esta hormona inhibe la actividad de los cotransportadores Na/Pi de la membrana de borde en cepillo del túbulos renal, induciendo fosfaturia. Este efecto se relaciona, una vez más, con una disminución en el número de transportadores en la membrana apical, en especial de NaPi2a, aunque también se ha descrito su efecto sobre NaPi2c (Traebert et al. 2000; Traebert et al. 2000). Los efectos prolongados de la PTH conducen también a un descenso en el contenido de ARNm de NaPi2a (Kempson et al. 1995).

De nuevo, la caracterización de los mecanismos celulares implicados en la acción de la PTH se han realizado tanto en modelos animales como en líneas celulares renales. En este último caso, se ha usado principalmente la línea OK (*opossum kidney*), debido a que es la única línea celular renal identificada que muestra precisamente ese control del transporte de Pi por la PTH (Teitelbaum et al. 1984; Malmstrom et al. 1986). De hecho, fue el receptor PTH1R de la línea celular OK uno de los primeros en ser clonado y caracterizado (Juppner et al. 1991).

El PTH1R pertenece a la superfamilia de receptores asociados a proteínas G (GPCR), y debido a sus características estructurales se engloba dentro de la clase II o familia B, junto a los receptores de secretina, calcitonina, glucagón y otras hormonas peptídicas. Por lo tanto la acción del transportador esta asociada a la actividad de proteínas G heterotriméricas: en el caso de PTH, Gs, que induce la vía de PKA a través de la activación de la enzima adenilato ciclase y la producción de AMPc, y Gq que activa la vía de PKC a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Lederer et al. 1998; Pfister et al. 1999; Traebert et al. 2000).

En estudios experimentales se han utilizado diferentes péptidos

correspondientes a secuencias parciales de la PTH. Los péptidos utilizados con más frecuencia son PTH(1-34) y PTH(3-34), ya que se ha comprobado que la porción final de la hormona de 84 aminoácidos no se requiere para que sea funcionalmente activa. Pero además se ha demostrado que la eliminación de los primeros aminoácidos del péptido, como en el caso de PTH(3-34), es suficiente para eliminar la activación de la ruta del AMPc, y tan sólo se conserva la respuesta a través de la PLC y la PKC. Ambos péptidos 1-34 y 3-34 son capaces de inhibir el transporte de fosfato en células OK, pero el PTH(3-34) lo reduce en menor grado (Pfister et al. 1999). Posteriormente, se ha demostrado que la activación de la vía de PKC tan sólo ocurre en la zona luminal o membrana apical, mientras que la ruta del AMPc y PKA se activa en la región luminal y en la basolateral (Traebert et al. 2000).

Además de provocar la activación de las rutas clásicas de PKA y PKC, el receptor de PTH también induce la activación de la cascada de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), a través de la vía de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Quamme et al. 1994; Cole 1999; Bacic et al. 2003). La activación de ERK también participa en la regulación del transporte de fosfato renal. No se conoce en detalle su mecanismo de acción, pero la activación de ERK está asociada a la de tirosina quinasas, PI-3K y proteína quinasa C (Lederer et al. 2000).

3.4. Interacciones con las proteínas de dominios PDZ.

Es un grupo de proteínas que poseen dominios de interacción conocidos como “PDZ”, llamados así por las siglas de las tres primeras proteínas en que se identificaron (**PSD95** –*Postsynaptic density protein 95*-, **Dlg**–*Drosophila discs large protein*-, **ZO-1** –*zonula occludens protein 1*–). Este tipo de proteínas se encarga del transporte, localización y andamiaje de proteínas de membrana, así como de la formación de grupos de proteínas de distinta función en la membrana (por ejemplo, receptores, quinasas y transportadores) para la transducción de señales. Algunas proteínas PDZ cumplen una función muy importante en el transporte, localización y ensamblaje de complejos de señalización supramoleculares, y parecen actuar *en vivo* organizando estos

complejos, así como en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. Para que una célula se comunique de manera eficaz con sus vecinas, los receptores y efectores de las mismas deben estar localizados y organizados en las regiones apropiadas de las células. Esta organización es particularmente crítica en aquellas células más especializadas del organismo. Además, durante los últimos años ha emergido la idea de que las proteínas PDZ son componentes cruciales en la polarización ápico-basal de las células epiteliales, y en la expresión asimétrica de proteínas en los dos dominios de membrana. Para ello, es necesario que exista una correcta expresión de las proteínas de membrana en las células epiteliales polarizadas, proceso que consta de numerosos pasos: 1) Distribución desde la red *trans*-Golgi (“*trans*-Golgi network”, TGN) al dominio de membrana correcto (apical o basolateral), 2) anclaje y/o retención en la membrana plasmática, 3) endocitosis seguida, bien de reciclaje a la membrana plasmática o de marcaje para degradación en lisosomas, o de reparto al dominio de membrana opuesto (por ejemplo transcitosis). Las proteínas PDZ han estado implicadas en uno o más de estos pasos, tanto de proteínas de membrana apical como basolateral.

Se han identificado varias proteínas PDZ (NHERFs, Shank2, PIST, y Ezrin) que interactúan con los transportadores de fosfato, particularmente con los transportadores tipo II (NaPi2a, NaPi2b, y NaPi2c). La interacción ocurre gracias a la existencia de secuencias específicas en el extremo C-terminal de estos transportadores conocidas como sitios de unión a dominios PDZ. Las interacciones de NaPi2a y NaPi2c con proteínas de la familia NHERF han sido muy estudiadas. Son cuatro los miembros de esta familia: NHERF1 (EBP50), NHERF2 (E3KARP), NHERF3 (PDZK1), y NHERF4 (PDZK2). De éstas, las interacciones con NHERF1 y PDZK1 han sido las más caracterizadas, ya que parecen ser las más importantes en el tráfico de los transportadores de fosfato a la membrana apical. Nuestro grupo ha descubierto que NaPi2a y NaPi2c interactúan de modo diferente con NHERF1 y PDZK1. Por ejemplo, en ratones transgénicos carentes de PDZK1 (PDZK1-KO), NaPi2c pierde la capacidad de adaptarse (al no expresarse en la BBM renal) cuando estos animales se alimentan con una dieta baja en fosfato [33]; NaPi2a y NaPi2b no se ven

afectados, sin embargo. En cambio, en el NHERF1 KO, la regulación de NaPi2a es la preferentemente afectada, ya que su presencia en la BBM se ve reducida. Recientes estudios de nuestro grupo demuestran que en las interacciones entre los transportadores de fosfato renales de tipo II con las proteínas PDZ, NaPi2a presenta una mayor afinidad por NHERF1, y que a la vez NaPi2c interactúa principalmente con PDZK1 en células adaptadas a bajo Pi. La afinidad de NaPi2c por PDZK1 es demostrada en un modelo de ratones transgénicos (PDZK1^{-/-}) en el cual NaPi2c no responde a adaptaciones a bajo fosfato. Finalmente, estudios que aún no hemos publicado muestran que NHERF1 también es importante para la regulación del transportador intestinal NaPi2b.

3.5. Función de los lípidos en la regulación de los transportadores de Pi.

La membrana plasmática consiste en un ensamble dinámico y organizado de lípidos, y proteínas. Presenta pequeños dominios o microdominios, llamados también balsas lipídicas o *lipid rafts*, que permiten que grupos de proteínas con afinidad lipídica similar, se encuentren e interactúen. Estos microdominios tienen en común una concentración elevada de colesterol y esfingolípidos, lo cual genera zonas en la membrana más gruesas y menos fluidas [34-44] (Figura 7)

Los *lipid rafts* pueden incorporar o excluir proteínas de un modo selectivo, y así generar un espacio en la membrana para que proteínas afines puedan interactuar entre sí o bien con lípidos. Estos dominios regulan, además, diferentes funciones celulares y transducciones de señales, como por ejemplo PDGF, EGF, receptores endoteliales, adenilatociclase, MAP quinasa, ERK y PKC [45-53].

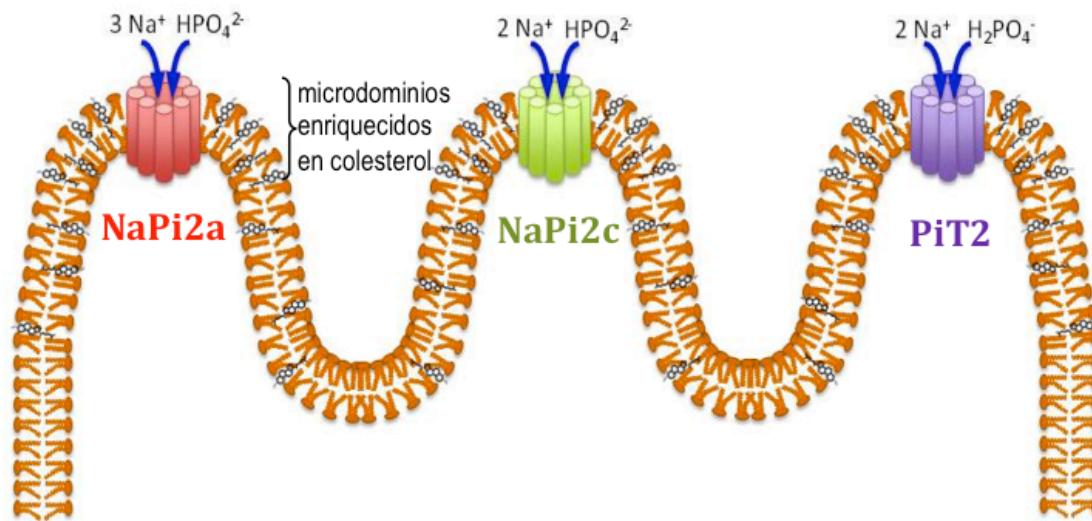


Figura 7. La modulación de la expresión de los transportadores NaPi en la membrana celular por parte del perfil lipídico.

Muchas de estas proteínas son importantes para la regulación de los transportadores de fosfato y en la modulación de la transducción de señales, o incluso en la regulación de éstas por parte de los microdominios, lo cual, puede causar a su vez, alteraciones en la regulación de los transportadores de fosfato [54-58].

Los lípidos participan en el tráfico de proteínas, concretamente en procesos de endocitosis y exocitosis, de modo que las perturbaciones en el contenido de colesterol u otros lípidos consiguen alterar los mecanismos de endocitosis dependiente o no de clatrininas. [59-67] En el laboratorio del Dr. Levi, se ha mostrado que los transportadores de fosfato renales se encuentran presentes en estos microdominios, y que cambios en la concentración de colesterol en modelos celulares y en vesículas aisladas de riñón de rata, cambian la expresión y actividad de los transportadores de fosfato.

3.6. Vitamina D

La vitamina D es esencial para la vida, ya que es un factor determinante en la regulación de la homeostasis del calcio. También es un factor importante en el metabolismo de fosfato, aunque todavía hay muchas dudas con respecto a los mecanismos de regulación de los transportadores de fosfato. La

capacidad de regular la homeostasis de calcio y fosfato hace de esta vitamina un centro de enfoque de investigación, no sólo sobre los mecanismos fisiológicos que regulan el metabolismo óseo, sino también sobre una amplia gama de efectos biológicos, tales como la modulación del sistema inmunitario y el control de otras hormonas como la PTH.

La vitamina D misma es en sí una pro-hormona que ha de ser convertida al metabolito activo 1,25-dihidroxi-vitamina D [1,25(OH)2D] o calcitriol. Éste actúa principal, aunque no únicamente, mediante su receptor nuclear (VDR, del inglés *Vitamin D Receptor*) el cual será descrito mas adelante. Este receptor altera la transcripción de genes específicos responsables de las respuestas biológicas que provoca, principalmente la absorción intestinal de calcio y Pi, y la osificación. La activación de la vitamina D por conversión de 25-hidroxi-vitamina D (calcidiol o colecalciferol) a 1,25(OH)2D (calcitriol), ocurre principalmente en los túbulos renales proximales, y depende de la captación endocítica del complejo calcidiol ligado a una proteína extracelular (DBP, *Vitamin D Binding Protein*), de su procesamiento en los lisosomas, y del tránsito de calcidiol, ligado a una proteína intracelular (principalmente la IDBP3, *Intracellular Vitamin D Binding Protein 3*), a la mitocondria. En esta organela el calcidiol es metabolizado por la 1-alfa hidroxilasa, una enzima que también se encuentra en muchas otras células en las que el calcitriol tiene un papel auto o para-crino, controlando la diferenciación y proliferación celulares. Por lo tanto, la producción local de 1,25(OH)₂D₃ depende de la disponibilidad de su precursor, por lo que no sorprende la asociación de deficiencias de vitamina D con cánceres y enfermedades autoinmunes. La producción neta de calcitriol también depende de su tasa de degradación por la 24-beta hidroxilasa mitocondrial a 1,24,25-trihidroxivitamina D. La expresión de la 1-alfa-hidroxilasa se ve estimulada por la hormona paratiroides, y por bajos niveles circulantes de Pi, calcio y calcitriol, mientras la 24-beta hidroxilasa es inhibida por estos factores [68, 69].

El aumento del transporte intestinal de fosfato por parte de la vitamina D se conoce desde la década de los 60s, cuando Harrison y Harrison [70], mostraron que inyecciones de vitamina D en pollos aumentaban la absorción intestinal de fosfato. Dichos estudios fueron confirmados 20 años mas tarde

por Fuchs y Peterlik, utilizando vesículas de BBM intestinales de pollos [71, 72]. Posteriormente, Hattenhauer y cols. mostraron que dicho efecto era debido al aumento de la expresión de NaPi2b en el intestino delgado de ratones, efecto confirmado por varios investigadores en la rata [73, 74]. La mayor expresión de NaPi2b provocada por la vitamina D se explicaría parcialmente por una mayor transcripción del gen Npt2b en ratas jóvenes. En ratas adultas, sin embargo, aunque hay una mayor expresión de la proteína NaPi2b no se observan cambios en el ARNm.

La regulación de los transportadores de fosfato renales por parte de la vitamina D es aún menos clara, ya que estudios en animales transgénicos muestran una relación indirecta. Experimentos en ratones KO del receptor de la vitamina D ($VDR^{-/-}$) presentan una expresión disminuida de los tres transportadores renales de Pi, NaPi2a, NaPi2c, y PiT2, así como un menor transporte de Pi en vesículas de BBM renales. Tanto la expresión de transporte como las de los tres transportadores consiguen recuperarse en ratones de ($VDR^{-/-}$) cuando los animales son alimentados con dietas de rescate (alto contenido de Ca y Pi). Además, otros modelos, como el ($FGF23^{-/-}$), presentan hiperfosfatemia y concentraciones elevadas de vitamina D en sangre, así como una expresión elevada del transportador de fosfato renal NaPi2a. Sitara y cols. han hipotetizado con que la hiperfosfatemia en estos ratones es debida a la elevada concentración de vitamina D. Esto lo demuestran al estudiar ratones doble KO de $FGF23^{-/-}$ y $1\alpha\text{OHasa}^{-/-}$, en el que consiguen el bloqueo del paso final en la síntesis del calcitriol en el riñón, y como consecuencia, una disminución en la concentración de la vitamina D en estos ratones, y por ende, la disminución de la concentración de Pi en plasma[75]

4. PÉRDIDA DE LA HOMEOSTASIS DEL FOSFATO

Muchos factores pueden conducir a la pérdida de la homeostasis del fosfato, desde una sobrecarga exógena de fósforo, hasta infecciones, traumatismos y patologías, que pueden afectar la función renal. En general los desórdenes o enfermedades con más relevancia que pueden inducir una pérdida de la regulación del fosfato, bien hacia la hipofosfatemia o

hiperfosfatemia, se pueden clasificar en dos grupos, desórdenes genéticos y la enfermedad renal crónica.

4.1. Desórdenes genéticos

Existe un grupo de enfermedades hereditarias, afortunadamente poco frecuentes, que tienen en común la generación de un raquitismo asociado a hipofosfatemia. De ellas destaca el XLH (*X-Linked Hypophosphatemic Rickets*), ya que es el raquitismo hereditario más común, con una incidencia de 1 persona por cada 20000. La causa de este raquitismo XLH es una mutación en el gen PHEX (*Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome*). Las otras hipofosfatemias hereditarias son el ADHR (*Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets*) que se genera por una mutación en el gen de FGF23, y el ARHR (*Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets*), que indirectamente afecta la expresión de FGF23 por una mutación en el gen DMP1 (*Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1*).

El segundo grupo de raquitismos hipofosfatémicos hereditarios son los que dependen de mutaciones directas sobre los transportadores de fosfato renales, como las que afectan al gen de NaPi2c generando HHRH (*Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria*) [12], o al gen de NaPi2a, que provoca ARFS (*Autosomal Recessive Fanconi Syndrome*) [15].

4.2. Enfermedad renal crónica

Hay un sinnúmero de factores no hereditarios que pueden generar cambios patológicos en la concentración plasmática de fosfato, como por ejemplo la edad, el alcoholismo, los trasplantes, el síndrome de inmunodeficiencia (SIDA), la diabetes mellitus, y por supuesto la enfermedad renal crónica. Todas estas condiciones afectan principalmente a la reabsorción de Pi en el túbulo proximal. La enfermedad renal crónica es un problema de salud universal, ya que estudios recientes estiman que la prevalencia de Enfermedad Renal Crónica (ERC nivel 1-4) en el mundo es del 13% [76]. En los Estados Unidos el número de pacientes que reciben asistencia por ERC pasó de 10.000 en 1973 a 547.982 en el 2008, con un coste total de \$39.460

millones en ese año, basado en datos del Instituto de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK) del instituto Nacional de Salud (NIH, National Institute of Health) (<http://www.usrds.org/atlas.aspx>). De esos enfermos se considera que casi el 44% de ellos (en estado final de ERC, fallo renal), son diabéticos, y por lo tanto padecen de una nefropatía diabética, haciendo de la diabetes la principal causa de la enfermedad renal crónica [77, 78].

4.3. *Hiperfosfatemia*

Una de las principales consecuencias de la ERC es la hiperfosfatemia, debido a la perdida de la capacidad de regular la homeostasis del fosfato por parte del riñón. Esto es debido a que el proceso degenerativo de las nefronas induce a la incapacidad de filtrar el Pi de la sangre y excretarlo en la orina. Este mecanismo degenerativo del riñón, aunque no ha sido claramente determinado, se ha estudiado principalmente en el marco de la nefropatía diabética. La relevancia de ésta en el progreso de la enfermedad renal crónica, se discutirá más adelante.

Se considera que existe hiperfosfatemia cuando la concentración de fosfato libre en sangre está por encima del rango normal de la población humana, 0.9-1.6 mM. Aunque la principal causa es la enfermedad renal crónica, existen otras circunstancias o estados que pueden originar también concentraciones elevadas de Pi en sangre, entre ellas el fallo renal agudo, calcinosis tumoral, acidosis respiratoria, dosis elevadas de vitamina D, etc.

La hiperfosfatemia está directamente relacionada con la calcificación vascular, y estos dos factores son dos de los tres que están directamente relacionados con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. El tercer factor, la dislipidemia, se presenta igualmente en el síndrome de la nefropatía diabética.

4.4. *Nefropatía diabética*

La diabetes mellitus es una causa muy importante de la enfermedad renal crónica y está asociada a varios factores que son determinantes en el

desarrollo de las enfermedades cardiovasculares [79]. En el riñón, los pacientes con diabetes presentan un proceso degenerativo, inflamatorio y esclerosante denominado nefropatía diabética, y que además, presenta una acumulación anormal de lípidos [80], lo cual ha sido descrito durante los últimos cien años [81]. La consecuencia inmediata de esta glomerulopatía es una disminución de la tasa de filtrado glomerular [82]. Uno de los principales indicadores de ERC avanzada es la aparición de hiperfosfatemia [83], condición que igualmente ha sido relacionada con las enfermedades cardiovasculares, especialmente la calcificación vascular medial, que es uno de los principales factores de mortalidad [84].

La nefropatía diabética presenta varios componentes importantes:

- 1) El metabolismo reducido de la glucosa que induce hiperglicemia (diabetes) genera a una alta concentración de productos de glicosilación avanzada, y moléculas reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Se cree que éstas puedan estar directamente relacionadas con la inflamación de la nefrona.
- 2) Una gran acumulación de lípidos en el riñón.
- 3) Un proceso inflamatorio y esclerosante de la nefrona. Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Levi, demuestran que la hiperglicemia y la dislipidemia son causa de la inflamación en la nefrona, ya que experimentalmente, cuando la concentración plasmática de glucosa se controla y se reduce la síntesis de lípidos en modelos animales, el proceso degenerativo de la nefrona se reduce. Esto se logra al activar receptores nucleares como el FXR (*Farnesoid X Receptor*) y el LXR (*Liver X Receptor*), ya que son factores de transcripción que directa o indirectamente regulan el metabolismo de la glucosa, lípidos y el gasto energético, y además están relacionados con la regulación de la inflamación [79, 85, 86].

Los efectos de la activación de los receptores nucleares FXR y LXR en la regulación de los transportadores de fosfato han sido el objetivo principal de esta tesis doctoral.

5. RECEPTORES NUCLEARES Y LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO.

El síndrome metabólico es un término utilizado recientemente que está directamente asociado a las enfermedades renales y cardiovasculares. Se caracteriza por la existencia simultánea de diabetes tipo II, hipertensión, obesidad y resistencia a la insulina [87]. Recientemente se ha observado que la acumulación de lípidos en muchos tejidos está asociada a lipotoxicidad, inflamación y disfunción celular. En condiciones fisiológicas la célula mantiene dicha homeostasis mediante un control de la entrada y salida de lípidos, su síntesis, y su catabolismo. Trabajos recientes [88, 89] muestran que, en ratas con glomerulopatías mediadas por dislipidemia, ciertas proteínas como el *steroid receptor RNA activator 1* (SR-A1) tipo A, y de tipo B (CD36 o SR-B1), que son receptores importantes de ácidos grasos y LDL oxidado, se encuentran activadas. La salida de lípidos (*eflujo*) está regulada principalmente por el receptor nuclear LXR, que tiene la función de sensor principal de colesterol intracelular, y regula también la expresión de transportadores de colesterol, tales como el *ATP-binding cassette A1* (ABCA1) y SR-B1. El LXR, en colaboración con el también receptor nuclear FXR, modula la expresión de los SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*), los cuales son considerados los principales reguladores de la síntesis celular de lípidos [90]. En concreto, SREBP1c regula la síntesis de triglicéridos y SREBP2 induce la síntesis de colesterol.

5.1. Liver X Receptor (LXR) y Farnesoid X Receptor (FXR)

Con el fin de controlar la dislipidemia asociada a diversas patologías, se están utilizando varias aproximaciones farmacológicas mediante el uso de agonistas que activan los receptores nucleares LXR y FXR [91]. Éstos tienen un efecto modulador de la síntesis y regulación de lípidos tanto en el hígado y el riñón como en otros tejidos, que a su vez regulan la expresión de SREBP y otras proteínas asociadas con la síntesis y metabolismo de lípidos.

El estudio de los receptores nucleares LXR y FXR es un área de investigación con mucha actividad en los últimos 10 años, aunque los

principales estudios se han centrado en el hígado y en el aparato cardiovascular. En la última década, numerosos artículos evidencian la relevancia que estos receptores nucleares tienen en el riñón [79, 88, 89]. Sin embargo, la relación directa de los receptores nucleares LXR y FXR con los transportadores de fosfato no se ha determinado. Sí que se conoce, sin embargo, los efectos de otros receptores nucleares que pueden llegar a afectar la expresión de los transportadores de fosfato, entre ellos el receptor de la vitamina D (VDR), cuyo efecto es el mejor establecido y estudiado.

Los receptores FXR (NR1H4) (alfa y beta) y LXR (NR1H3) (alfa y beta) pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares hormonales que forman parte de los factores de transcripción activados por ligandos [90]. Tras su activación, estos receptores forman heterodímeros con el también receptor nuclear RXR (*Retinoid X Receptor*), y se trasladan al núcleo para allí cumplir su función como factores de transcripción (Figura 8).

Inicialmente se descubrió que, en el hígado, los óxidos del colesterol (oxiesteroles) son los ligandos endógenos del LXR, mientras que los ácidos biliares lo son para el FXR [92], que actúan controlando la síntesis (a partir de colesterol), metabolismo y excreción de los ácidos biliares. De este modo, el organismo mantiene la cantidad necesaria de sales biliares para el buen funcionamiento del sistema enterohepático, sin alcanzar concentraciones elevadas que podrían llegar a ser tóxicas para los hepatocitos.

La intensa investigación desarrollada sobre los receptores nucleares ha llegado a demostrar la importante función de estos factores de transcripción, no sólo en la regulación hepática de colesterol y ácidos biliares, sino también en una regulación sistémica del metabolismo de los lípidos.

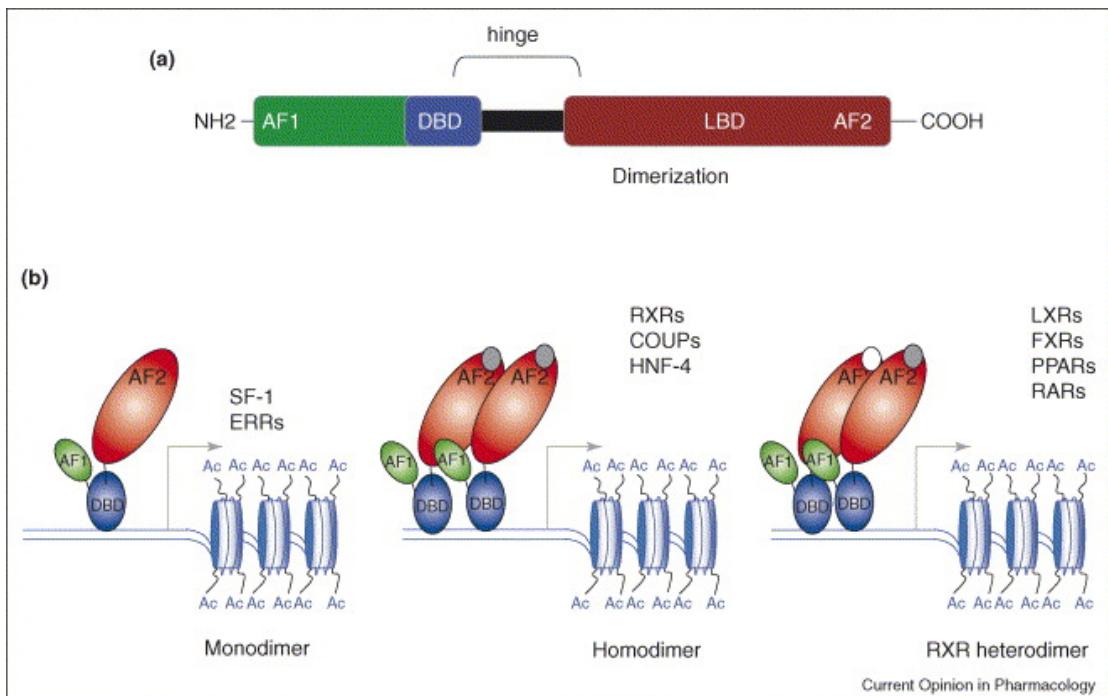


Figura 8. Representación esquemática de los receptores nucleares. (a) Los Receptores nucleares (RNPs) se componen de varios dominios funcionales. La región variable N-terminal contiene el dominio activador (AF1) no-dependiente del ligando. El dominio conservado DBD (*DNA binding domain*) es responsable de reconocer las secuencias de ADN específicos. El punto de unión que conecta DBD y LBD (*ligand binding domain*) es una zona muy conservada que contiene el sitio de dimerización. y el sitio donde se une el ligando. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de transactivación ligando-dependiente AF2. (b) RNPs pueden activar la transcripción como monómeros y/o dímeros, bien sea homodímeros o heterodímeros con RXR (*retinoid X receptor*) [1].

La isoforma LXR β se expresa ubicuamente, en cambio la LXR α se expresa especialmente en tejido enterohepático, macrófagos, tejido adiposo, pulmón, bazo, y riñón. FXR α se expresa también en tejido enterohepático, riñón, y glándulas adrenales, sin embargo FXR β es un pseudogen en el hombre, roedores y otros mamíferos. LXR y FXR controlan la expresión de SREBP a través de una activación-inhibición coordinada, que permite la modulación de la variedad de lípidos en varios tejidos (Figura 9, [93]).

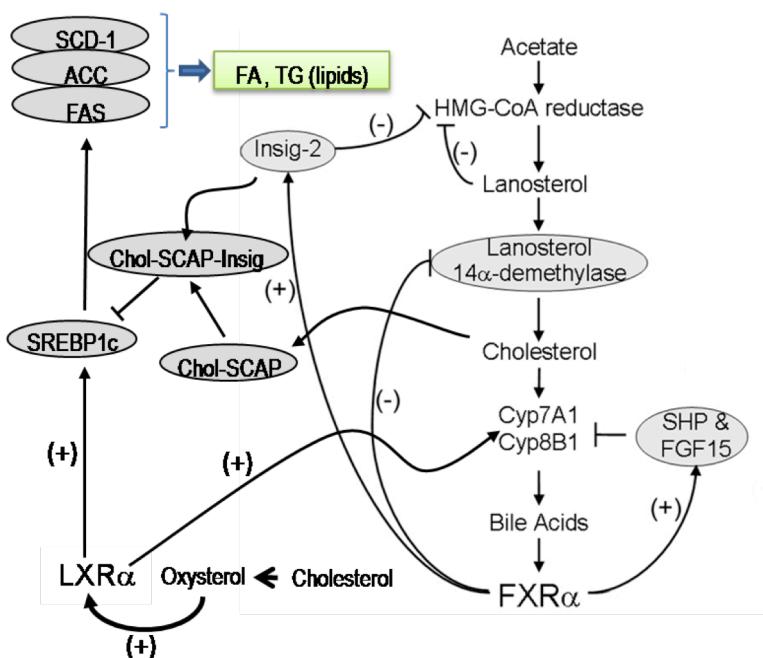


Figura 9. Regulación coordinada de lípidos y ácidos biliares por parte de los receptores nucleares FXR y LXR. En sombra se representan algunas de las proteínas diana de estos factores de transcripción.

5.2. *El Receptor de la Vitamina D (VDR)*

Al igual que los receptores nucleares LXR y FXR, el VDR es un receptor nuclear tipo II ya que forma heterodímeros con el RXR, y que regula principalmente la expresión de genes diana a través de secuencias consenso en el promotor de dichos genes. Como ya hemos indicado, VDR es el receptor para la hormona $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y aunque su estrecha relación con la regulación del metabolismo mineral ha enfocado la atención de VDR en órganos como el riñón, hígado e intestino, también cumple funciones importante en otros procesos fisiológicos e inmunológicos. Prueba de ello es el alto grado de expresión en leucocitos, sistema nervioso central y sistema linfático. VDR también regula la síntesis de la vitamina D en tejidos diferentes al hígado y riñón, como son la piel, el colon, el páncreas y el sistema vascular, y aunque la vitamina D sintetizada en estos órganos no contribuye significativamente a su concentración sanguínea, sí que consigue mantener la actividad normal de la célula en la que es sintetizada[94].

Mucho del conocimiento que se tiene del papel que cumple la vitamina D en la homeostasis del fosfato, y principalmente el transporte de fosfato intestinal, se ha obtenido por medio de modelos animales en los que se ha eliminado la expresión de VDR, lo que en parte refleja la importancia de este receptor. Estudios *in vitro* han demostrado la presencia de secuencias consenso en el promotor de NaPi2b en roedores, que explicarían el aumento de la expresión de NaPi2b tras tratamientos de vitamina D en ratas, aunque el análisis del gen de NaPi2b humano no muestra resultados similares[74].

6. MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO

Los modelos celulares son una herramienta fundamental en el desarrollo de las ciencias biomédicas, ya que en ellos podemos estudiar con gran detalle los mecanismos celulares que forman parte de los diferentes procesos fisiológicos. Estos modelos pueden ser bien sean cultivos celulares primarios o líneas permanentes, pero su comportamiento se debe aproximar a los procesos fisiológicos reales.

En el estudio de la función renal se han utilizado numerosas líneas celulares continuas, derivadas de los distintos tipos celulares que componen la nefrona. Entre las líneas renales más utilizadas podemos citar: MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) de túbulo distal, MCT (Mouse Cortical Tubule), HEK (Human Embryonic Kidney), A6 de túbulo conector, LLC-PK1 (*Porcine Kidney 1*) y OK (*Opossum Kidney*) de túbulo proximal, y líneas de podocitos, entre otras.

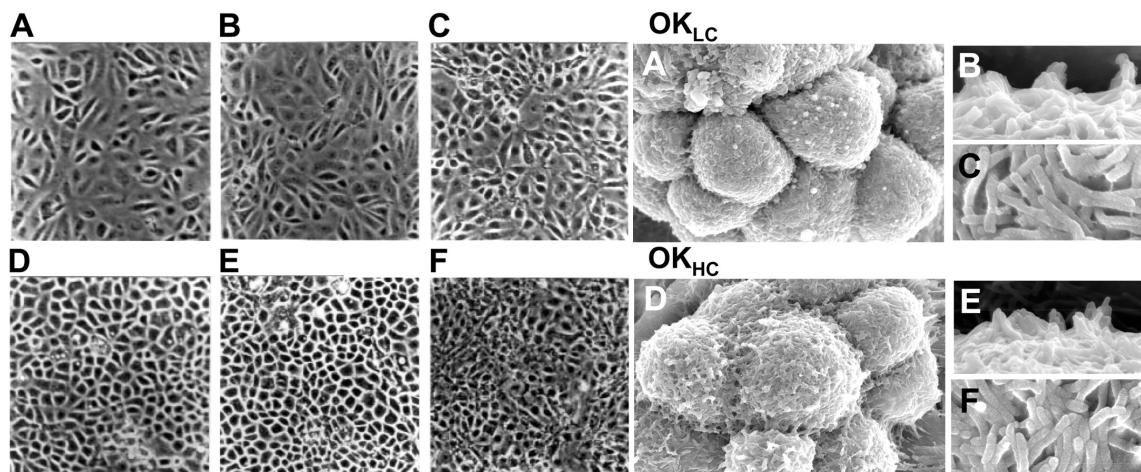


Figura 10. Morfología de las células OK. Aquí se muestran dos de los diferentes clones de las células OK (OKL y OKH) que forman monocapas y presentan microvellosidades [95]

Aunque para el estudio de la función de transportadores renales del túbulo proximal se han utilizado varias líneas celulares, las células OK (*Opossum Kidney*), que se aislaron a partir de un riñón completo de zarigüeya (Koyama et al. 1978), se considera el modelo celular más aproximado y el mejor establecido durante más de 30 años.

La línea celular permanente OK se obtuvo a partir de tejido renal completo de una hembra de zarigüeya norteamericana (*Didelphis virginiana*). No se realizó una selección clonal (Koyama et al. 1978), lo cual resultó en una mezcla heterogénea de células procedentes de distintas porciones de la nefrona. En su origen, estas células se aislaron para facilitar los estudios de caracterización del cromosoma X, debido al pequeño tamaño de los cromosomas X en esta especie, que permitía distinguirlos más fácilmente de los autosomas y, por tanto, aislarlos para su estudio.

Rápidamente se observó que esta línea celular mostraba características epiteliales, polaridad con presencia de microvellosidades, formación de monocapa, y a veces la formación de domos cuando se encuentran hiperconfluentes) (Figura 10). Además de determinó que podía ser utilizada como modelo para el estudio de la fisiología renal, en especial en la caracterización de varios transportadores de túbulo proximal y sus regulaciones, lo que dio origen a varios subclones. Hubo un cambio radical en el campo de aplicación de la línea OK, y eso se debió fundamentalmente al

descubrimiento de una de las propiedades más significativas que muestra esta línea celular: su respuesta al tratamiento con hormona paratiroidea (PTH) y por ende la reducción de la expresión del NaPi2a (NaPi4). Esto dio origen al subclón OKP, que ha sido el utilizado en esta tesis doctoral.

La capacidad de responder a la hormona PTH atribuye a las células OK una cualidad única frente a otras líneas celulares del túbulo proximal, como las LLC-PK1 o JTC-12.P3, que no poseen dicha característica (Malmstrom et al. 1986), lo cual convirtió a las células OKP en un referente en el estudio del transporte de fosfato dependiente de Na^+ , y su regulación por PTH y otros factores hormonales o dietéticos (concentración de Pi) [96]. Recientemente, nuestro grupo ha podido determinar que las células OKP expresan los diferentes transportadores de Pi renales, que se encontró tanto en el hombre como en rata y ratón, haciendo este modelo celular aún más relevante.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados durante el proyecto han sido de calidad para análisis o para biología molecular. Con excepción de los agonistas que se describen a continuación, los reactivos se obtuvieron principalmente de las marcas Sigma, Invitrogen, Bio-Rad y Fischer Scientific. Las polimerasas empleadas en las clonaciones fueron de alta fidelidad para evitar la introducción de mutaciones en la secuencia clonada (Invitrogen). Las ligasas provinieron de Invitrogen, y las enzimas de restricción de Promega o de New England Biolabs.

1.1. Agonistas de FXR y LXR

Para estudiar la activación y el efecto de LXR y FXR se cuenta con un gran número de agonistas: 6-ECDCA (Int-747) de la compañía farmacéutica Intercep de Italia, es un esteroide derivado del ligando natural del FXR, usado ya en ensayos clínicos. El ácido quenodesoxicólico (CDCA) y el ligando sintético GW4064 fueron adquiridos de Sigma.

En el caso del LXR, se cuenta también con agonistas esteroideos como el DMHCA proporcionado por la compañía farmacéutica *Wyeth* Research, y sintéticos comerciales como el TO901317 y GW3965, ambos de Sigma.

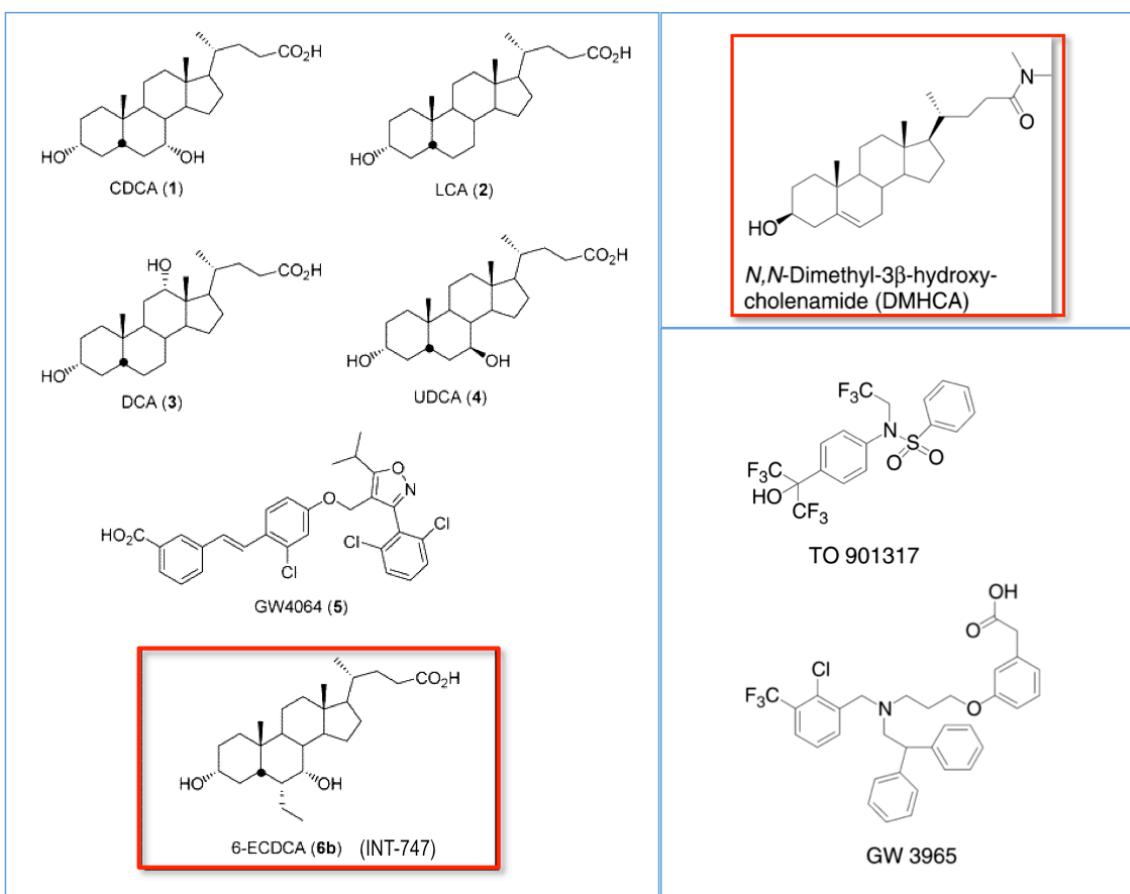


Figura 11. Estructura de los agonistas del FXR y LXR. Nótese la estructura esteroidal de DMHCA y 6-ECDCA.

2. INSTRUMENTACIÓN

- Las Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCRs) así como las Transcripción Reversa (RTs) se realizaron en un termociclador tipo *Mastercycler gradient de Eppendorf*. (Figura 12)



Figura 12. Termociclador.

- Las PCR cuantitativas o de tiempo real se realizaron en un termociclador de la marca Bio-Rad, modelo *MyiQ Single Color Real Time PCR Detection System*.



Figura 13. Sistema de detección para PCR tiempo real.

- La visualización de los geles de agarosa y la quimioluminiscencia de las membranas de nitrocelulosa se realizaron con un sistema de imagen *Biospectrum 500* y una cámara refrigerada de 6 megapixel *BioChemi 500*. (Figura 14)



Figura 14. Sistema de imagen y densitometría.

- También se utilizó un sistema de visualización digital de fluorescencia, el *Odyssey Infrared Imaging System* de la compañía *Li-COR* para membranas de nitrocelulosa incubadas con anticuerpos secundarios fluorescentes.



Figura 15. Sistema de imagen y densitometría Li-COR

- El trabajo con cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar de la marca Forma Scientific. Las incubaciones de las células se llevaron a cabo en un ambiente de CO₂ al 5% para células renales y 10% para células intestinales, y a 37 °C mantenidos en una estufa de CO₂ de la marca Forma Scientific.
- Para la microscopía de fluorescencia y microscopía confocal se usó un microscopio invertido de Zeiss, LSM 510 con un detector NLO-META.



Figura 16. Microscopio confocal Zeiss.

3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la primera parte, la determinación de los transportadores de fosfato intestinales se usaron ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*) albinas de raza

Wistar, obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME).

Las ratas utilizadas eran machos de 2-3 meses de edad, y un peso de 200-250 gramos. De ellas se purificaron membranas epiteliales del borde en cepillo de los diferentes segmentos del intestino y del riñón.

También se han utilizado ratones de laboratorio (*Mus musculus*) variedad *domesticus*, que fueron obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME). Los ratones utilizados eran machos de la estirpe C57BL/6, de unas 9-12 semanas de edad. Los animales empleados tuvieron acceso libre a las dietas durante los experimentos, con excepción de las adaptaciones agudas a dietas de alto o bajo fosfato, en los que los animales se mantuvieron en ayunas por 20 horas, con periodos alternos de alimentación de 4 horas.

Todas las dietas se obtuvieron de Harland Teklad. La dieta normal (2019 *chow diet*) contiene 0.9% de Ca y 0.7% Pi. Las dietas en alto fosfato contienen un 1.2% de Pi, y las de bajo fosfato un 0.1% de Pi. Los diferentes agonistas fueron suministrados en la dieta: se molieron los cristales del agonista en un mortero y se mezcló con la dieta normal. Los diferentes compuestos se usaron en las siguientes dosis:

Tipo de agonista	Nombre	Dosis diaria	Duración
FXR	6-ECDCA	35 mg/Kg	4 días
FXR	Int 767	35 mg/Kg	4 días
LXR	DMHCA	80 mg/Kg	4 y 15 días
LXR	TO901317	30 mg/Kg	15 días

Tabla 1. Dosis de los diferentes agonistas en dietas de ratón.

Este protocolo (39890912) establece específicamente el manejo correcto de estos ratones, y ha sido previamente aprobado por el comité de uso y cuidado animal de la Universidad de Colorado (ACUC, *Animal Care and Use Committee*) y de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

4. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE BORDE DE CEPILLO (BBM)

Las vesículas en borde en cepillo de rata o de ratón consisten en preparaciones microesféricas de la membrana apical de las células epiteliales polarizadas, bien del túbulo proximal de la nefrona o de los enterocitos.

4.1. Materiales, reactivos y aparatos

Una rata macho de aproximadamente 200 gramos de peso.

Solución fisiológica salina (NaCl 0.9%).

Tampón de aislamiento: Solución de DL-Manitol 300 mM y EGTA 5 mM. tamponada a pH 7.5 con HEPES-Tris 16 mM.

Inhibidores de proteasas: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM.

Tampón de resuspensión: Solución de Manitol 300 mM tamponada a pH 7.4 con HEPES-Tris 16 mM.

Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) 1 M.

Homogenizador ULTRA-TURRAX T25 previamente enfriado.

Supercentrífuga refrigerada a 4° C.

Todas las soluciones, material de vidrio, tubos de centrífuga, rotores, y equipamiento en general debe estar previamente enfriado entre 0° C y 4° C.

4.2. Procedimiento para las BBM de riñón.

El método seguido es una adaptación del indicado por Biber y cols. en 1981: Brevemente, la rata es narcotizada con inyección intraperitoneal de pentotal, y su muerte es confirmada por decapitación. Una vez extraídos los riñones, se descapsulan y se elimina la porción medular de los mismos. La corteza renal es troceada y triturada en el tampón de aislamiento con EGTA 5 mM. Mediante una precipitación con $MgCl_2$ 20 mM (dejando incubar 20 minutos en hielo) y centrifugación diferencial (una centrifugación primera a 2.800 g durante 15 minutos y una segunda del sobrenadante obtenido a 30.000 g durante 40 minutos) se purifican las vesículas en borde en cepillo. Todos los pasos de este proceso se realizan en hielo para evitar la acción de las proteasas y la degradación consecuente de las proteínas.

Al finalizar la purificación de las vesículas, la concentración de proteína en ellas es calculada mediante la técnica de BCA. Aunque la abundancia de los transportadores de fosfato en las vesículas es notable, se realizaron controles de purificación de las mismas, valorando el enriquecimiento de la actividad de la fosfatasa alcalina presente en ellas, en comparación al tejido u homogenado inicial.

4.3. Procedimiento para las BBM de Intestino.

Solución tampón: “A”

Hepes/NaOH 2 mM

Manitol 50 mM

Inhibidores de proteasas– 1 tableta/100 mL

Ajustar pH a 7.1

Solución tampón: “B”

Hepes/NaOH 20 mM

Manitol 300 mM

MgSO₄ 0.1 mM

Inhibidores de proteasas– 1 tableta/100 mL

Ajustar pH a 7.2

Solución de MgCl₂ 1M

1) En tubos con tapa: mezclar mucosa proveniente de la mitad escogida de intestino delgado de dos ratones en 15 mLs de solución reguladora A previamente refrigerada y sobre un baño de hielo. (aprox: 0.3-0.5 g de masa de tejido)

2) Transferir a un homogeneizador Potter-Elvehjem previamente refrigerado (*normal clearance*) y pulsar completamente 10 veces a una unidad alta de

rotación. La muestra homogenizada es filtrada si la mucosa es muy pesada (raro en ratón), y depositada en un tubo con tapa.

3) Adicionar 200 μ L de MgCl₂ 1M y agitar por vórtex inmediatamente. Tapar la muestra y mantenerla sobre baño de hielo. Agitar repetidamente por 20 min. Centrifugar la muestra a 3.000xg (4.700 rpm usando un rotor JA 17) por 20 min. El precipitado es non-BBM y la fuente de futura membrana BL.

4) Verter el sobrenadante en tubos limpios y centrifugar a máxima velocidad, o a 38.000xg, por 40 min usando un rotor JA 17. El precipitado es una preparación cruda o impura de BBM. Retirar el sobrenadante (podría ser fuente de ER)

5) Resuspender el precipitado crudo de BBM en 7.5 mL de solución reguladora B usando una aguja 20G. Centrifugar a 6.000xg por 20 min (6.600 rpm usando un rotor JA 17). El precipitado contiene contaminantes mezclados, por lo tanto, ser cuidadoso.

6) Transferir el sobrenadante a tubos limpios y centrifugar a 38.000xg durante 40 min. El precipitado final es BBM. El sobrenadante es eliminado.

5. INMUNOFLUORESCENCIA EN RIÑONES E INTESTINO DE RATA Y RATÓN

5.1. Perfusión completa de la rata *in vivo*.

Los túbulos contorneados del riñón son unas estructuras que se colapsan con facilidad en ausencia de flujo sanguíneo. Para conseguir fijarlos sin que se colapsen es necesario perfundir la solución fijadora en la rata viva.

Para la anestesia y manejo del animal se siguieron las recomendaciones sobre Anestesia de los animales de experimentación propuestas por el comité de uso y cuidado animal de la Universidad de

Colorado y de la Universidad de Zaragoza, y siempre procurando el bienestar del animal.

5.2. Materiales, reactivos y aparatos

Una rata macho de aproximadamente 200 gramos.

Tampón de fijación por 500 mL: ácido cacodílico 100 mM, sacarosa 100 mM, dextrano 120 mL, paraformaldehído 3% y ácido pícrico 0.05%. El tampón está ajustado con HCl a pH 7.4. La sacarosa fija la osmolaridad de la solución a 300 mOsm.

Tampón de fosfato (PBS, Phosphate Buffer Solution):

Solución de lavado: Ácido cacodílico 100 mM y Sacarosa 100 mM.

Bala de carbógeno.

5.3. Procedimiento

La rata es anestesiada con pentotal sódico (Abbott Laboratories) 50 mg/Kg de peso adulto, hasta conseguir la inconsciencia del animal sin eliminar los reflejos táctiles. Se abre la rata por la línea alba y la arteria aorta es canulada justo después de la bifurcación de las arterias renales. Se corta la vena porta para que el líquido de perfusión y lavado pueda recorrer todos los vasos sanguíneos. Una vez cortada se inocula el tampón de fijación de modo retrógrado (hacia el corazón) a una presión de 1.38 hp para vencer la resistencia del corazón, y hasta observar que la rata está completamente fijada. Una vez conseguido esto, se retira el paraformaldehído con la solución de lavado y se extraen los riñones y los intestinos para su congelación y posterior uso.

5.4. Tratamiento de las muestras

Las muestras son embebidas en un medio criosolidificable, OCT (LabTek, Store Pages, UK) y cortadas con un criostato a una temperatura de – 25° C. Las secciones para inmunofluorescencia son de un grosor de unas siete micras.

5.5. Inmunofluorescencia

Los portas con las secciones son descongelados y equilibrados a temperatura ambiente. Para la inmunofluorescencia de los diferentes transportadores de fosfato, las secciones son pretratadas con 3% de suero de cabra (NGS, normal goat serum) en el tampón de fosfato (PBS) que contiene cloruro de calcio (CaCl_2) 0.5 mM y cloruro de magnesio (MgCl_2) 0.88 mM (este PBS con cationes divalentes -calcio y magnesio- se le conoce como PBS^{2+}), y 0.01 % de saponina para incrementar la permeabilización. Despues de lavar con PBS^{2+} , las secciones son incubadas a 4 °C toda la noche con el anticuerpo primario a una dilución 1:100. Tras ello, las secciones se lavan tres veces con PBS^{2+} y son entonces cubiertas con un anticuerpo secundario frente a IgG de conejo, conjugado con Alexa 488 o Alexa 555 (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:300 en el tampón de bloqueo durante 1 hora, a temperatura ambiente, y en oscuridad. Tras la incubación, las secciones se vuelven a lavar tres veces con PBS^{2+} . Para evitar que la fluorescencia desaparezca rápidamente (*fadding*), las secciones se cubren con Vectashield (Vector Labs) como medio de montaje. Finalmente, las secciones se observan bajo el microscopio de fluorescencia.

6. INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS.

6.1. Líneas Celulares

Se utilizaron principalmente dos líneas celulares:

1. Las células OK, que se mantuvieron siguiendo condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% CO₂). Estas requieren un medio DMEM/F12 con 10% suero fetal bovino, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml estreptomicina.
2. Las células CaCo-2_{BBE}, que se crecieron en condiciones semejantes a las células OK, pero requieren un medio DMEM con alta glucosa (4500 mg/L) con 20% de suero fetal bovino, y penicilina/estreptomicina.

6.2. Materiales, aparatos y reactivos

Tampón de fosfato PBS (Sigma).

Tampón de fosfato PBS²⁺: Tampón PBS al que se le añade 0.5 mM CaCl₂ y 0.88 mM MgCl₂

Solución de fijación: PBS²⁺ con 3 % de paraformaldehído.

Solución de neutralización del paraformaldehído: PBS²⁺ con 20 mM de glicina.

Solución de permeabilización: PBS²⁺ con 0.1 % de saponina.

Solución de incubación: PBS²⁺ con 0.1 % de saponina y 3 % de BSA.

“Antifadding”: Vectashield (Vector Labs).

6.3. Procedimiento

El momento más adecuado para realizar la inmunofluorescencia de las células bien sea OK o CaCo-2_{BBE} es cuando alcanzan el 100 % de confluencia, momento que coincide con la diferenciación epitelial de las células, y con ella, la expresión de las proteínas de membrana como transportadores. En los casos en los que las células han de ser transfectadas, ésta se hace en células confluentes en un 80 %, y tras la transfección, se incuban hasta que alcanzan una confluencia del 90-100 % (en torno a 1-2 días tras la transfección) antes de realizar la inmunofluorescencia indirecta.

Las células se crecen en placas de 8 pocillos (0.64 cm² de superficie por pocillo) (Molecular Probes) a 37 °C y una presión parcial de CO₂ del 5 % hasta alcanzar la confluencia adecuada. En ese momento se colocan en hielo para detener su metabolismo, el medio de cultivo es entonces eliminado, y las células son lavadas dos veces con PBS²⁺. Posteriormente, las células son fijadas con la solución de paraformaldehído al 3% durante 20 minutos tras lo cual son lavadas de nuevo con PBS²⁺ frío, y el formaldehído residual, neutralizado con glicina 20 mM en PBS²⁺ frío durante 10 minutos.

Para permitir que los anticuerpos penetren en las células, éstas son permeabilizadas con 0.1 % de saponina en PBS²⁺ durante 30 minutos, tras lo cual, las células son incubadas durante toda la noche con el anticuerpo

primario correspondiente, diluido en la solución de incubación, y a 4 °C. El anticuerpo es eliminado mediante 4 lavados con PBS²⁺ y saponina al 0.1%, tras lo cual las células son incubadas durante 1 hora y en oscuridad con el anticuerpo secundario específico frente a la IgG de la especie animal en la que fue obtenido el primario, conjugado con la molécula fluorescente (ver apartado de la sección de resultados para más detalle sobre los anticuerpos utilizados). Tras la incubación, las células son lavadas 4 veces con PBS²⁺ y cubiertas con el medio antifading. Tras ellos, las células son finalmente analizadas bajo el microscopio de fluorescencia.

7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS- BCA (PROTOCOLO PIERCE)

Este método se basa en la reducción de Cu²⁺ a Cu⁺ por la proteína en un medio alcalino. El catión Cu⁺ generado produce la quelación de 2 moléculas de BCA (ácido bicinconílico). Esto provoca una reacción colorimétrica púrpura que muestra máxima absorbancia a 562nm y que, además, es lineal con las concentraciones crecientes de proteína. Para realizar la cuantificación es necesaria una proteína patrón como la albumina de suero bovino (BSA).

La medida de las absorbancias se hace en una placa de 96 pocillos. Ponemos duplicados por cada estándar y muestra, y medimos dos concentraciones por muestra, o una concentración por triplicado.

8. EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción del ARN se utilizó el protocolo Sigma (*Genelute TM mammalian total ARN kit*) que se describe a continuación.

Este método de extracción nos permite aislar el ARN de células y tejidos animales. Las células o tejidos son lisados y homogenados en un tampón que contiene isotiocianato de guanidina y 2-mercaptoetanol para asegurar la desnaturalización de macromoléculas y la inactivación de las ARNsas. Dispone de 2 columnas, la primera nos elimina los restos celulares y el ADN, y la segunda nos permite capturar el ARN en la columna de unión.

9. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Esta técnica nos permite obtener el ADNc (ADN monocatenario) complementario al ARNm que se desea analizar. Antes de iniciar este proceso, se realizó un proceso de digestión del ADN genómico residual con DNAsas (Invitrogen), para luego sintetizar el ADNc utilizando el kit de Bio-Rad iScriptTM como se explicara en el apartado 11.1.

10. WESTERN-BLOTS (SDS-PAGE)

Para confirmar los cambios de expresión de las proteínas en distintas condiciones, la técnica de *western-blot* o inmunoadsorción es la más utilizada en nuestro campo.

10.1. Procedimiento

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.- El SDS (dodecil sulfato sódico) es un detergente desnaturizante que permite que nuestras proteínas se desplacen mejor a lo largo del gel de poliacrilamida, y además confiere una densidad de carga negativa uniforme a las proteínas proporcional a su tamaño, de modo que éstas migran en función de su masa. En nuestro caso hemos empleado geles con una concentración de 10 % de poliacrilamida. Las muestras utilizadas se diluyeron previamente en un tampón de carga con bromofenol (50mM TrisCl pH 6,8, 30 % glicerol, 1 % SDS, 0,25 % bromofenol) añadiendo un agente reductor como el DTT (Ditiotreitol) al 1 %, que sirve para romper las uniones disulfuro entre las proteínas. Además, hervimos las muestras durante 3-5 minutos para provocar mayor desnaturización y destrucción de proteasas. Se utilizaron 20-50 µg de proteínas, en función del anticuerpo a utilizar.

Los geles separador y *stacker* se prepararon en el laboratorio añadiendo APS (persulfato de amonio) y TEMED (tetrametiletilenamida) para polimerizar la acrilamida.

Uno de los pocillos del gel se reserva para introducir un indicador de masa molecular. En nuestro caso se empleó Benchmark Pre-Stained Protein Ladder (INVITROGEN).

El tampón utilizado para que migren las muestras presenta la siguiente composición: 0,3 % Tris Base, 1,5 % Glicina, 0,1 % SDS). Este tampón permite crear un exceso de carga negativa para que las proteínas migren en función de su masa hacia el cátodo. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100V durante 2 horas.

Una vez obtenida la separación de proteínas, es necesario transferirlas a una membrana de nitrocelulosa. En este caso, la transferencia se realiza a amperaje constante de 200 mA durante 2 horas.

Las membranas se bloquearon con PBS, 0,1% Tween-20, 3% leche desnatada, durante 1 hora. Posteriormente se procedió a incubar con el anticuerpo primario al 0,01% de NaN₃ (evitar contaminación bacteriana) durante toda la noche en agitación. Al día siguiente se realizaron 2-3 lavados de 10 minutos en PBS-T para eliminar el anticuerpo primario y seguidamente procedimos a incubar con el anticuerpo secundario, bien sea el que contiene HRP (enzima peroxidasa) durante 1 hora, o el conjugado fluorescente de LiCor. Hicimos otros 3 lavados para eliminar el anticuerpo secundario. Por último se reveló la membrana añadiendo el reactivo de quimioluminiscencia (Inmobilon western de Millipore) incubándolo durante 5 minutos. Esta fase se produce la oxidación del luminol, emitiendo luz que es detectable con películas fotográficas, o por el sistema de imagen LiCor o Biospectrum 500, que no requieren revelado.

10.2. *Anticuerpos primarios utilizados*

Anti-SGLT-1 de conejo (CHEMICON) dilución 1/2000

Anti-β-actina de ratón 1/25000 (SIGMA)

Anti-NaPi2a de conejo 1/3000. Secuencia de péptido MMSYSERLGGPAV

Anti-NaPi2b de conejo 1/2000. Secuencia de Péptido. CKNLEEEEKEQDVPVKAS

Anti-NaPi2c de gallina 1/2000. Secuencia de Péptido. AHCYENPQVIASQL

Anti-Pit-1 de conejo 1/2000 Secuencia de Péptido. SLVAKGQEGIKWSELIK

Anti-Pit-2 de conejo 1/1000 Secuencia de Péptido. HCKVGSVVAVGWIRSKA

10.3. *Anticuerpos secundarios utilizados*

HRP- Anticonejo IgG

HRP- Antiratón IgG

HRP- Antigallina IgG

LiCor 600- Anticonejo IgG

LiCor 800- Antigallina IgG

11. SÍNTESIS DE ADNc Y PCR CUANTITATIVAS

11.1. *Síntesis de ADN complementario desde ARN total o transcripción reversa*

Para la síntesis de ADN complementario desde ARN total se utilizó el kit de Bio-Rad iScriptTM ADNc Synthesis kit, según las instrucciones del fabricante. La transcriptasa reversa utilizada en este kit -iScript Reverse Transcriptase- deriva del virus MMLV (*Moloney Murine Leucemia Virus*). Esta enzima posee actividad ARNasa H+, de modo que degrada específicamente el ARN ya utilizado en la transcripción reversa, y que está unido al ADN complementario tras la síntesis. En cambio, no degrada el ARN libre que aún no ha sido utilizado.

11.2. *Procedimiento*

En cada reacción se empleó 1 μ g de ARN total (obtenido como se especifica en el apartado 5 de la sección de Materiales y Métodos) diluido con agua libre de ARNasas hasta un volumen de 20 μ L, y se siguió el siguiente

protocolo de tiempos y temperaturas en un termociclador:

1. 5 minutos a 25° C
2. 30 minutos a 42° C
3. 5 minutos a 85° C
4. Mantenimiento a 4° C (opcional)

Tras la incubación, el ADN complementario obtenido se guarda a -20°C, o bien se procede a su amplificación inmediata mediante reacción en cadena de la polimerasa normal (PCR), o en tiempo real/cuantitativa (RT-PCR /QPCR).

11.3. *Amplificación del ADN complementario de interés con cebadores específicos mediante PCR*

La amplificación de los ADN complementarios de interés se realizó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) o mediante PCR en tiempo real. Estas técnicas permiten amplificar de forma exponencial el número de copias de ADN limitados por los extremos con una pareja de cebadores específicos durante una serie de ciclos de temperatura.

Los ciclos de temperatura (35 para PCR y 45 para tiempo real) permiten la desnaturación del ADN (a 95° C de temperatura), la hibridación de los cebadores (cada pareja tiene su temperatura específica) y la creación de nuevas copias mediante una ADN polimerasa. En esta Tesis se ha empleado la iProof de BioRad. Esta polimerasa es considerada de alta fidelidad, esto es, el índice de errores que comete – inserciones/delecciones/sustituciones de bases en la cadena amplificada - es significativamente bajo - 1 error por cada 2.2×10^6 bases, comparado con una polimerasa normal cuyo índice de error es 1 por cada 0.4×10^6 bases.

Finalmente, para verificar que las PCRs convencionales han funcionado, una alícuota del producto es analizado por electroforesis en un gel de agarosa, y se comprueba que su tamaño y masa son los esperados. Para

ello, se corre en paralelo un indicador de pesos moleculares (New England Biolabs) y un indicador de masa de ADN amplificado (Invitrogen).

12. TRANSPORTE DE VESÍCULAS

Las vesículas fueron preparadas mediante la doble precipitación en cloruro de magnesio. El enriquecimiento de las membranas fue determinado mediante western-blots de los cotransportadores NaPi2b para intestino y NaPi2a para riñón, comparando las vesículas finales con el homogenizado inicial. Las vesículas mostraron un enriquecimiento de al menos 10-12 veces respecto al homogenizado. El transporte de ^{32}P fue determinado mediante la técnicas de filtración rápida, con la incubación de 10 μL de vesículas en 40 μL de medio de transporte isotónico (0,05 mM H_3PO_4 , 100 mM NaCl, 10 mM Hepes-tris pH 7.4, 40 mM D-manitol, 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{32}P), durante 30 segundos a 37 °C en baño maría. A continuación se lavaron con 20 ml de solución stop (100mM manitol, 100mM NaCl, 10mM Tris), y se filtraron por filtros de acetato de celulosa, con un tamaño de poro de 0,45 μM . La fuerza iónica de la disolución stop provoca que las vesículas queden retenidas en el filtro. Posteriormente se midió la radiactividad de los filtros mediante un contador de centelleo. Los valores de transporte fueron expresados en pmol Pi/mg de proteína vesicular.

13. TRANSPORTE DE PI EN CÉLULAS.

El procedimiento general utilizado consistió en crecer células OKP o CaCo-2_{BBE} en placas de 24 pocillos (NUNC) hasta 48 horas post-confluencia para las células OKP, o dos semanas para las células CaCo-2_{BBE}. Las células se sometieron a diferentes condiciones antes de realizar el protocolo de transporte, que se describe a continuación.

Se elimina el medio de las células por aspiración, y se realizan dos lavados con 500 μl de solución de transporte con colina (cloruro de colina 137 mM, KCl 5.4 mM, CaCl_2 2.8 mM, MgSO_4 1.2 mM, HEPES 10 mM, ajustar pH a 7.4 con Tris base) a temperatura ambiente. Se añaden 200 μl de solución de transporte (NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, CaCl_2 2.8 mM, MgSO_4 1.2 mM, HEPES 10 mM, ajustar pH a 7.4 con Tris base) complementada con fosfato potásico

“frío” - 0.05 mM en la mayoría de los experimentos- y fosfato marcado ^{32}Pi , en un rango comprendido entre 0.5 y 4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Se incuban las células con el medio de transporte habitualmente durante 4 o 6 minutos para células OKP, o 20-30 min para células CaCo-2_{BBE}. Transcurrido este tiempo se elimina el medio y se detiene el transporte mediante 4 lavados con 2 ml de solución de parada (cloruro de colina 137 mM, Tris/HCl pH=7.4) enfriada en hielo. Todos estos pasos se repetían para cada pocillo individual a intervalos de 1 minuto, de forma que todos los puntos se incuban exactamente el mismo tiempo.

Por último se elimina la solución de parada y se añaden 200 μl de solución de lisis (Triton X-100 0.5% en agua). Parte del sobrenadante final obtenido se utiliza para cuantificar proteínas por el método de BCA, y el resto se emplea para la medida de fosfato incorporado con la ayuda de un contador de centelleo, realizando las lecturas sin líquido de centelleo, lo que se denomina cuentas Cherenkov. En todos los experimentos también se realizó la medida de las soluciones estándar (soluciones de transporte marcadas con ^{32}Pi utilizadas durante la incubación) como referencia en los cálculos, eliminando parte de la variabilidad entre diferentes experimentos.

14. RACE EN CÉLULAS OK

La secuenciación del genoma de la especie *Didelphis virginiana*, de la cual provienen las células OK, no se ha realizado, y por ende para estudiar los diferentes transportadores de fosfato nos hemos visto en la tarea de clonarlos directamente utilizando la metodología de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) o amplificación rápida de los extremos del ADNc. Con esta técnica somos capaces de obtener tanto la región codificante (CDS) como los extremos no traducidos (5' y 3' UTR) de la secuencia génica. Se trata de una técnica extensamente utilizada, surgiendo distintas variantes basadas en principios similares. Nosotros hemos utilizado el protocolo *GeneRacer Kit – Full length RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3'cDNA ends (RLM-RACE)*- de Invitrogen.

Esta técnica se realiza en varios pasos:

- Extracción de ARN total de células OK
- Obtención de secuencias parciales de células OK, utilizando como patrón las secuencias genómicas de una especie parecida, en este caso *Monodelphis domestica*, para diseñar los cebadores iniciales.
- Diseño de los cebadores específicos del gen (*Gene Specific Primers*, GSP)
- Amplificación de los extremos 5' de los transcriptos.
- Amplificación de los extremos 3' de los transcriptos
- Clonación en un vector de secuenciación.
- Secuenciación y ensamblaje de las secuencias

14.1. Extracción de ARN total de células OK

Una placa de 100 mm con células OK se cultivó hasta confluencia (aproximadamente 2×10^7 células) y se mantuvo 48 horas más en medio completo. Las células se lisaron y se procedió al aislamiento del ARN mediante *Total RNA Purification System* (Sigma). Este sencillo sistema es similar al método de extracción de ADN plasmídico conocido como miniprep, y al igual que éste, utiliza una columna con membrana de silicio donde se queda adherido el ARN que posteriormente es eluido con agua libre de ADNsas y ARNsas.

El ARN obtenido se cuantificó por medición de su absorbancia a 260 nm, y se analizó su calidad según el cociente de absorbancias a 260/280 nm, y por comprobación de las intensidades de las bandas de 28S y 18S en un gel desnaturalizante (formaldehído) de agarosa para ARN. Una parte del ARN se trata con *DNAse I Amplification grade* (INVITROGEN), para eliminar el ADN contaminante, como paso previo a la reacción de retrotranscripción o RT-PCR, y el resto se conserva a -80 °C para la obtención de los extremos 3' y 5'.

14.2. Obtención de secuencias parciales de células OK

A partir del ARN total de células OK tratado con ADNasa I, se preparó

ADNc siguiendo el protocolo del *SuperScript First-Strand synthesis system for RT-PCR* (INVITROGEN). De este ADNc se realizaron PCRs para amplificar segmentos de ADN (400-1000 pares de bases, pb) de los genes a clonar, usando para ello cebadores diseñados con base a homologías con el correspondiente ADNc de *Monodelphis domestica*. Ésta es una especie de marsupial evolutivamente cercana a *Didelphis virginiana*. Los cebadores se muestran en el anexo I (Tabla A1). Los productos de PCR que funcionaron se enviaron a secuenciar para obtener secuencias parciales de los transcritos de células OK. A partir de estos fragmentos se diseñaron los cebadores específicos del gen de interés, GSP1 y GSP2, que se utilizaron para obtener las secuencias completas mediante la técnica de RACE. Los cebadores GSP1 y GSP2 se diseñaron cumpliendo las características que indicaba el protocolo de RACE: una longitud entre 23-28 nucleótidos, un contenido de GC entre 50-70% y una temperatura de fusión (Tm) superior a 65°C (preferiblemente superior a 70°C). Estos cebadores se encuentran recogidos en el anexo I (Tabla A1).

14.3. Amplificación de los extremos 5' y 3' de los transcritos de OK

Por medio de la técnica de RACE se obtiene cada extremo de la secuencia en reacciones distintas. Previo a las amplificaciones específicas por PCR de cada gen, se sintetizaron dos ADNc distintos a partir del ARN modificado de OKP, al cual se le ha ligado el adaptador GeneRacer RNA Oligo en el extremo 5', y luego con cebadores específicos que reconocen el adaptador insertado, se sintetiza el ADNc (Figura 17). La obtención 3' ADNc o 3'RACE es más sencilla, haciendo uso del sistema convencional de retrotranscripción (RT-PCR) con un cebador poli-dT especial, con dos posiciones degeneradas (NN) previamente al poli-T que favorecen la homogeneidad del ADNc obtenido (Figura 17 y 18).

Las reacciones de PCR se realizaron con una polimerasa de alta fidelidad (*Platinum High Fidelity Taq* de Invitrogen) que consiste en una combinación de polimerasa Taq DNA recombinante y una pequeña cantidad de otra polimerasa con actividad correctora (*Pyrococcus species GB-D*). Las

reacciones se realizaron con un programa “touchdown PCR”, reduciendo la temperatura de anillamiento gradualmente cada varios ciclos.

14.4. Secuenciación y ensamblaje de las secuencias

Una vez amplificados los fragmentos de cada transcripto; los productos de PCR o bien se purificaron y se mandaron a secuenciar directamente, o se clonaron dentro del plásmido pPCR-Script, utilizando un sistema de clonación por extremos romos denominado *pPCR-Script Amp Cloning kit* (Stratagene) (ver esquema inferior).

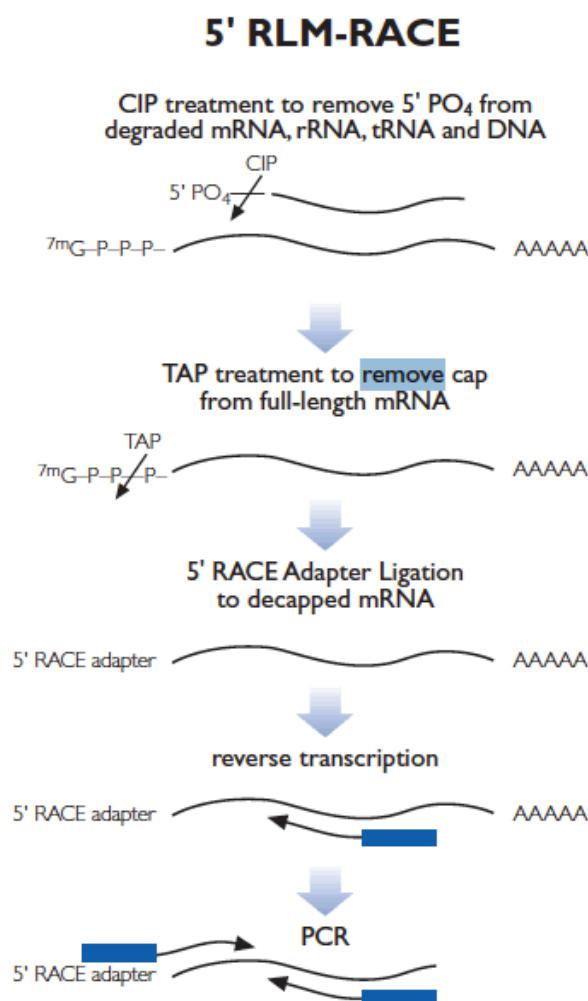


Figura 17. Esquemas de las amplificaciones 5' RACE realizadas con el kit de GeneRacer de invitrogen.

3' RACE

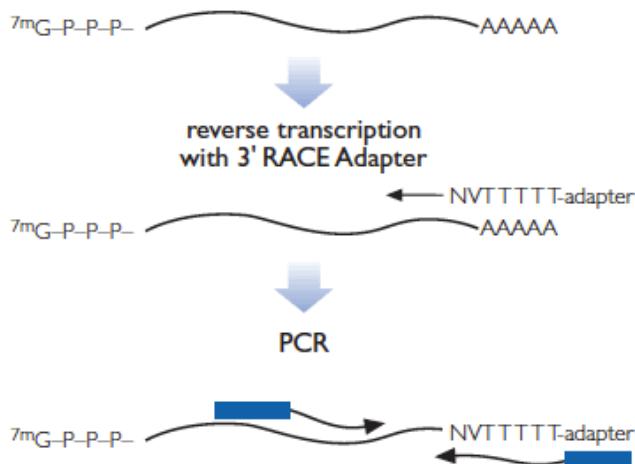


Figura 18. Esquemas de las amplificaciones 3' RACE realizadas con el kit de GeneRacer de invitrogen. En la reacción 3'RACE se utiliza un cebador poli-T con dos posiciones degeneradas (NV) en su extremo 3', para favorecer la formación de un ADNc más homogéneo en esta zona.

Los fragmentos obtenidos se analizaron por secuenciación de cadena simple (Sistemas Genómicos, Paterna, España). Cada una de estas secuenciaciones comprendía como máximo entre 600-1000 bp, con lo que fue necesario realizar varias para completar las secuencias. Los cebadores de secuenciación diseñados para ir ampliando la secuencia también se muestran en el anexo I (Tabla A1). Los fragmentos secuenciados se analizaron mediante BLAST, se ensamblaron con ayuda del programa *ContigExpress* (Vector NTI Suite, INVITROGEN), y se compararon con las secuencias de *Monodelphis domestica* y de otras especies con el programa *AlignX* (Vector NTI Suite), para confirmar que la secuencia obtenida era correcta.

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos muestran la media y el error estándar. Los gráficos y el análisis estadístico de los mismos se realizaron con el programa Prism 4 (de la

marca GraphPad Software). Los datos fueron analizados mediante test de normalidad. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, es decir, empleando tres muestras independientes para cada condición. Los valores $P<0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS

Como resultado de esta tesis doctoral se prepararon y publicaron varios manuscritos, los cuales son la base de los tres apartados siguientes. Para cada apartado se incluirá al final el *abstract* original en inglés de cada artículo asociado.

1. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES.

Manuscritos:

Regulation Of Rat Intestinal Na-Dependent Phosphate Transporters By Dietary Phosphate.

Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Nov; 297(5):F1466-75.

Intestinal Phosphate Transport.

Adv Chronic Kidney Dis. 2011 Mar; 18(2):85-90.

2. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO POR PARTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES FXR Y LXR.

Manuscritos:

Liver X Receptor-Activating Ligands Modulate Renal And Intestinal Sodium-Phosphate Transporters.

Kidney Int. 2011 Sep; 80(5):535-44. doi: 10.1038/ki.2011.159

Napi Transporters Are New Partners Of The Nuclear Receptor LXR.

Contrib Nephrol. 2013. En revisión.

3. MODELO CELULAR INTESTINAL PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO.

Manuscritos:

NHERF1 Modulates Intestinal NaPi Transporter NaPi2b Expression in Apical Microvilli.

J Biol Chem. 2012 Oct 12;287(42):35047-56

4. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES.

Aunque los mecanismos de regulación de los transportadores de fosfato renales han sido estudiados durante muchos años, mucha menos atención se ha prestado a los de los transportadores intestinales. La función del intestino se hace mas relevante en presencia de la enfermedad renal crónica, cuando el organismo ha perdido la capacidad de mantener la homeostasis del Pi. Hoy en día se considera que la manera mas satisfactoria de sobreponer la hiperfosfatemia asociada a la enfermedad crónica renal consiste en bloquear la absorción intestinal del Pi de la dieta.

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de la regulación de Pi a través de la dieta, es decir, utilizando piensos con concentraciones de Pi elevadas y bajas, y la rata de laboratorio como modelo experimental. Bajo estas condiciones se pudo determinar principalmente:

- a) En el intestino delgado de la rata, el transporte de fosfato intestinal es mediado principalmente por el duodeno y el yeyuno, lo que contrasta con el íleon por presentar éste un transporte mínimo de Pi, *in vitro*. En los dos primeros segmentos hay expresión de dos diferentes transportadores de fosfato, NaPi2b y Pit1. Como los experimentos han sido siempre utilizando vesículas membranosas, no se ha estudiado la ruta de absorción intestinal paracelular (absorción pasiva, sin transporte).
- b) Ratas adaptadas crónicamente a una dieta pobre en Pi, presentan mayor transporte de Pi en el yeyuno, y esto está asociado a un aumento de la expresión de NaPi2b.
- c) La adaptación aguda a dieta rica en fosfato induce un incremento en la absorción de Pi sólo en el duodeno de ratas, y esto está asociado a un aumento de la expresión de NaPi2b. Paralelamente se observa un incremento rápido y elevado de la concentración de Pi en sangre.

4.1. Regulación de los transportadores de fosfato intestinales por el Pi.

Para determinar los efectos de la concentración de Pi de la dieta en el transporte de Pi intestinal, la expresión de los transportadores NaPi en los diferentes segmentos y los cambios de expresión, se utilizó la rata como modelo de estudio. Los animales fueron alimentados durante 7 días (modo **crónico**), o bien durante 4 horas (modo **agudo**). Los valores obtenidos fueron comparados con los de ratas alimentadas con pienso control (concentración normal de Pi). Los experimentos *in vitro* para determinar la actividad y expresión de los transportadores NaPi, se llevaron a cabo con vesículas membranosas de borde en cepillo aisladas (BBM) de la mucosa de los diferentes segmentos del intestino delgado de las ratas. De igual forma se aislaron BBM de los riñones para usarse como control con el fin de comprobar la eficacia de las distintas dietas en las adaptaciones, ya que estos efectos se encuentran bien documentados.

Para determinar la purificación y enriquecimiento deseado de las BBM, se realizaron mediciones enzimáticas de varias proteínas que se expresan exclusivamente en estas membranas, así como de otras que lo hacen en la membrana basolateral, con el fin de determinar su contaminación o impureza. Las determinaciones se realizaron en el homogenado del tejido total y se compararon con las obtenidas con las preparaciones membranosas. Se midió la actividad de la Na-K ATPasa (indicador de la membrana basolateral), y también de leucina aminopeptidasa (LAP) y γ -glutamyltransferasa (γ -GT), que son enzimas indicadoras de la BBM. Estas mediciones se realizaron en BBM de duodeno y yeyuno, purificadas de ratas adaptadas crónicamente a las tres dietas diferenciadas en la concentración de Pi (0.1, 0.6, y 1.2 %).

El enriquecimiento relativo de cada preparación se determinó mediante la actividad específica (AS) de las diferentes enzimas (Tabla 2).

Duodenum Enzymes	Homogenates SA ± SD	BBM SA ± SD	Enrichment RSA ± SD	Jejunum Enzymes	Homogenates SA ± SD	BBM SA ± SD	Enrichment RSA ± SD
Na+/K+ ATPase							
0.1% Pi	24.4 ± 9.2	20.6 ± 10.1	0.97 ± 0.63	0.1% Pi	28.6 ± 6.0	38.2 ± 31.0	1.45 ± 1.19
0.6% Pi	21.2 ± 4.9	17.4 ± 13.7	1.02 ± 1.03	0.6% Pi	22.4 ± 3.5	57.6 ± 29.9	2.51 ± 1.16
1.2% Pi	20.6 ± 2.7	38.2 ± 28.2	1.81 ± 1.21	1.2% Pi	26.4 ± 7.8	46.5 ± 14.1	1.80 ± 0.39
LAP							
0.1% Pi	1.44 ± 0.23	27.9 ± 2.7	19.86 ± 4.27	0.1% Pi	3.26 ± 0.21	67.1 ± 8.9	20.65 ± 2.96
0.6% Pi	1.16 ± 0.16	18.6 ± 4.9	16.21 ± 3.99	0.6% Pi	3.17 ± 0.35	65.5 ± 8.7	20.93 ± 3.84
1.2% Pi	1.22 ± 0.11	16.1 ± 2.9	13.13 ± 2.15	1.2% Pi	2.97 ± 0.38	56.1 ± 9.1	18.91 ± 1.96
γ-GT							
0.1% Pi	0.66 ± 0.10	52.1 ± 4.3	81.13 ± 17.03	0.1% Pi	1.24 ± 0.26	104.0 ± 22.9	84.48 ± 12.81
0.6% Pi	0.63 ± 0.15	37.6 ± 4.7	62.26 ± 13.05	0.6% Pi	1.06 ± 0.17	66.9 ± 12.6	64.69 ± 16.24
1.2% Pi	0.67 ± 0.18	33.2 ± 9.1	51.02 ± 13.15	1.2% Pi	1.05 ± 0.17	65.2 ± 14.4	62.10 ± 8.46

Tabla 2. Determinación del enriquecimiento relativo de las BBM por medio de la actividad enzimática de Na-K ATPasa, LAP (Leucine Aminopeptidase) y γ-GT.

Se observó que en condiciones normales (dietas control con 0.6 % de Pi) las ratas alimentadas *ad libitum* presentaban en los tres segmentos del intestino delgado diferentes niveles de expresión de dos transportadores NaPi: NaPi2b y Pit1 (Figura 19). En yeyuno se observa una alta expresión tanto de NaPi2b como de Pit1, con una menor expresión de ambos en el duodeno, lo cual contrasta con el íleon, ya que no se encontró la expresión de ninguno de estos transportadores, salvo de ARNm de Pit1. Además, tampoco se observó la expresión de Pit2, tanto de proteína como de ARNm (Figura 19C). Por ende, se decidió enfocar la atención en los dos primeros segmentos.

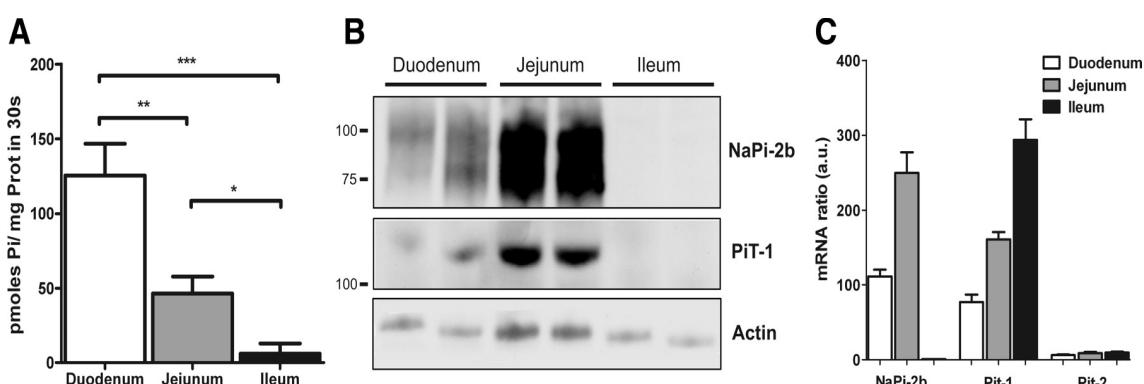


Figura 19. Medida del transporte de fosfato sodio dependiente (A), expresión de los transportadores de fosfato intestinales NaPi2b y Pit1 (B) y valores de ARNm en los tres diferentes segmentos del intestino delgado de rata, a condiciones normales. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

La especificidad de los anticuerpos utilizados se determinó por medio del bloqueo con el péptido antigénico en WB, usando BBM de yeyuno de rata alimentadas con condiciones normales (0.6% Pi en dieta), y una relación en

masa de anticuerpo:péptido de 1:10 (Figura 19). El anticuerpo anti-NaPi2b de rata, diseñado frente a un péptido del extremo carboxilo, nos proporcionó dos bandas, de 85 y 110 KDa en condiciones normales, y una tercera de 130KDa que se presenta condiciones de adaptación crónica de bajo fosfato. Se cree que esta banda superior podría estar asociada a diferentes grados de glicosilacion [97, 98] (Figura 20)

El anticuerpo anti-PiT1 de rata fue diseñado para reconocer un epítopo del bucle extracelular entre los dominios transmenbranosos cuarto y quinto. Este anticuerpo reconoce una banda de 120 KDa que es bloqueada por el péptido. (Figura 20)

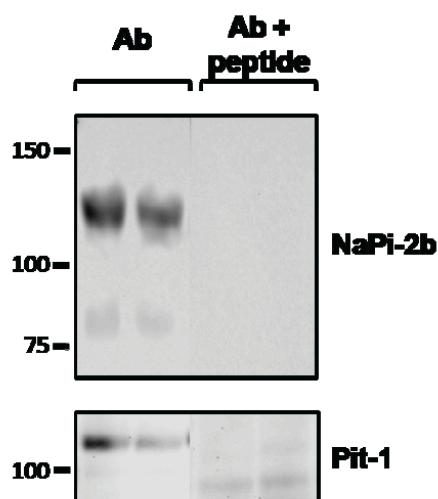


Figura 20. Determinación de la especificidad de los AB de NaPi2b y PiT1 por medio de WB.

Luego de establecer que la expresión de NaPi2b y PiT1 se encuentra principalmente en duodeno y yeyuno de rata, quisimos determinar si estos transportadores se localizaban en la BBM, para lo cual se realizó un estudio de inmunohistoquímica de los dos diferentes segmentos del intestino delgado.

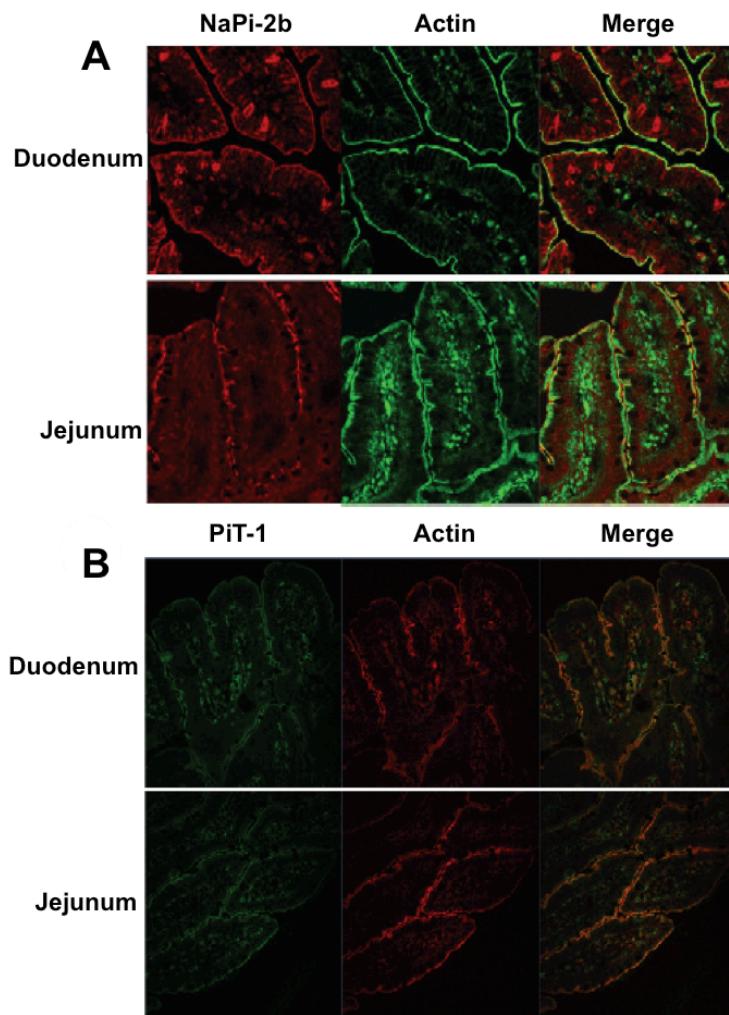


Figura 21. La expresión de los transportadores de fosfato NaPi2b y PiT1 se determinó en BBM de intestino delgado de rata por inmunofluorescencia.

Como se observa en la figura 21-A, NaPi2b (en rojo) co-localiza con la actina (verde), la cual es un marcador de BBM. Sin embargo, al igual que en el WB, no se observan diferencias significativas en la expresión de PiT1 (en verde, Figure 21-B) entre el duodeno y yeyuno. La expresión de PiT-1 se observa tanto en BBM (al colocalizar con la actina, en rojo) como en el interior de la vellosidad, lo cual podría deberse a la expresión de PiT1 en las células de la musculatura lisa de los capilares.

4.2. Adaptaciones crónicas a alto y bajo fosfato

Por medio del transporte *in vitro* de ^{32}P en BBM aisladas de duodeno y yeyuno, se determinó los cambios en el transporte intestinal de fosfato, como

consecuencia de la adaptación crónica a dietas ricas o pobres en fosfato, y en comparación al transporte en condiciones normales (dietas de 0.6 % Pi) (Figura 22). Se observó que el yeyuno adaptado a dieta baja en fosfato presentaba un mayor transporte de Pi por miligramo de proteína, y aunque hay una reducción aparente en duodeno, ésta no es estadísticamente significativa. Estos resultados se compararon con el transporte de Pi en BBM aisladas del riñón de las mismas ratas, lo cual confirmó la respuesta esperada por parte del riñón a estas condiciones experimentales, y por lo tanto, el correcto diseño experimental.

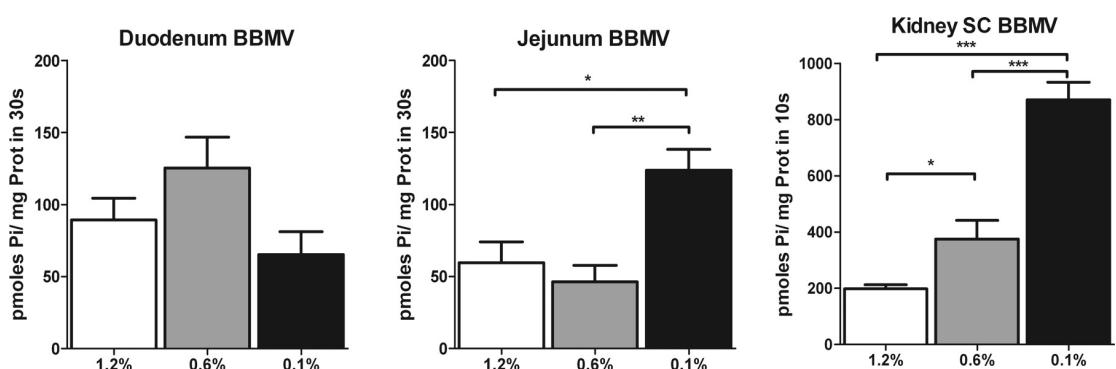


Figura 22. Efecto de las dietas de alto, normal y bajo fosfato, en el transporte de fosfato de duodeno y yeyuno de rata. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

La adaptación del transporte de Pi intestinal en duodeno y yeyuno se debió a un incremento en el transporte sodio dependiente a 100 μ M de Pi (Figura 23)

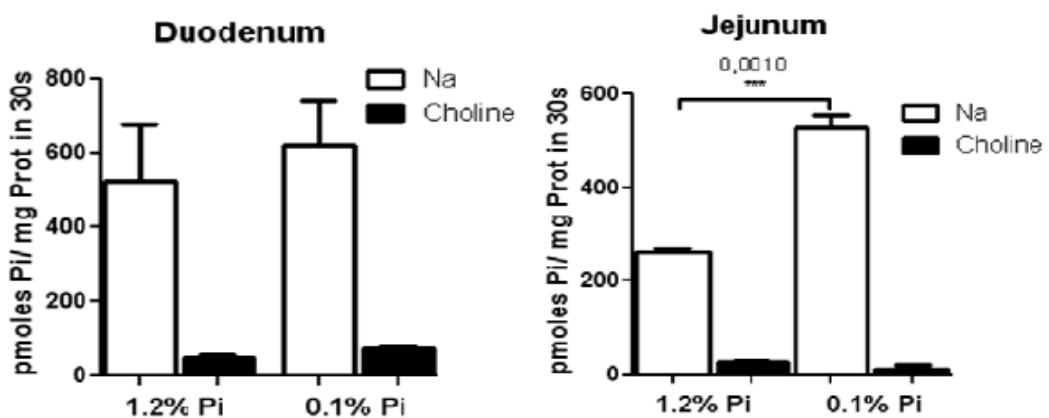


Figura 23. Comparación del transporte de fosfato sodio dependiente y sodio independiente, en los dos segmentos del intestino delgado de rata adaptada a dieta alta y baja en fosfato.

Para determinar si alguno de los transportadores de fosfato expresados se regulaba de un modo paralelo al transporte en BBM bajo estas adaptaciones crónicas, se analizó la expresión de los dos transportadores NaPi por medio de WB. Se determinó un incremento significativo en la expresión de NaPi2b en el yeyuno de rata (Figura 24A) en respuesta a la dieta baja en fosfato. Este incremento se observa levemente en el duodeno, aunque no es estadísticamente significativo (Figura 24B). No se observó ningún cambio significativo en la expresión de PiT1, tanto en duodeno como en yeyuno. En cambio en el riñón se observó un incremento de los tres transportadores de fosfato NaPi2a, NaPi2c y PiT2 en respuesta la dieta baja en Pi (Figura 24C).

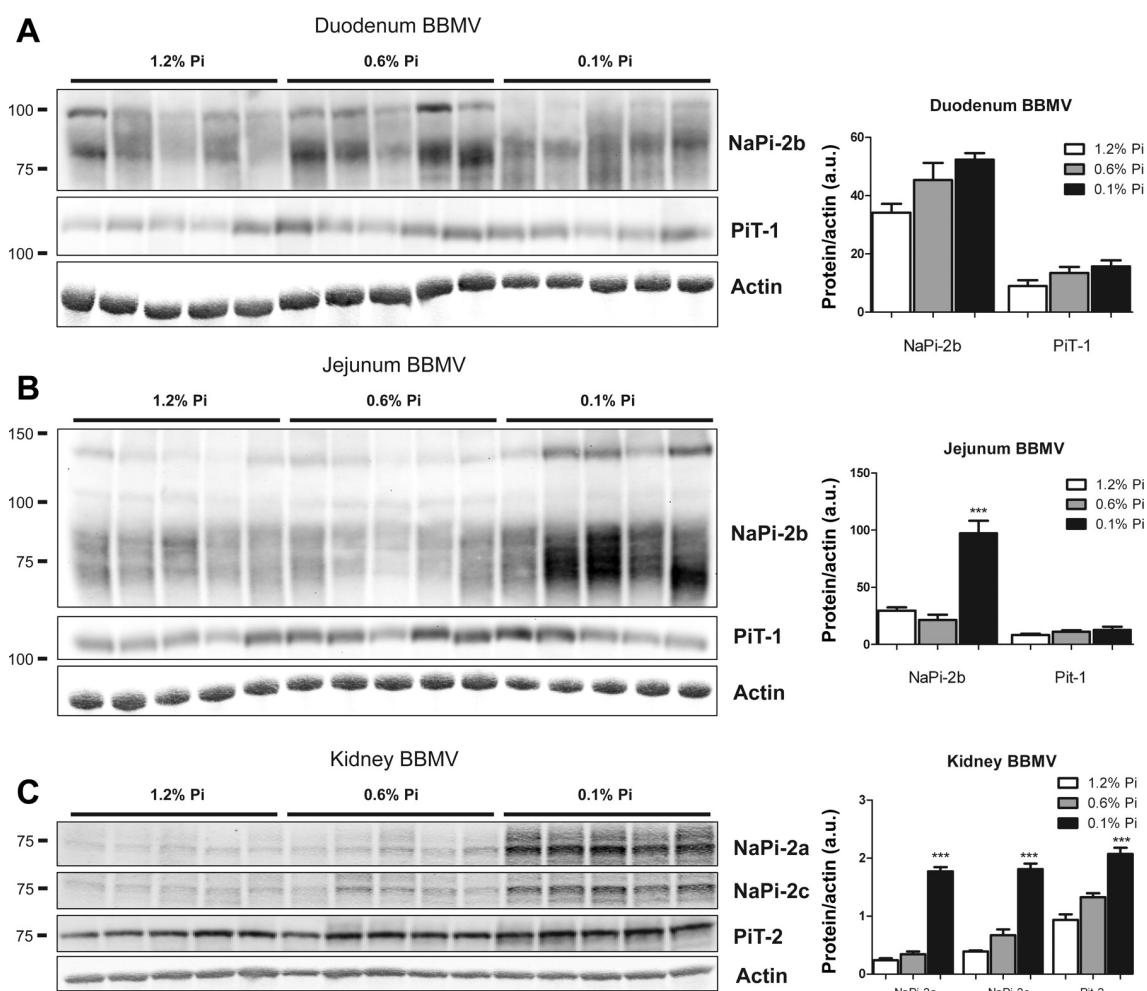


Figura 24. Medida del efecto en la expresión de los transportadores intestinales NaPi2b y PiT1 en BBM, por parte de las diferentes concentraciones de Pi en la dieta, en A) duodeno, B) yeyuno y C) riñón. *** P<0.001 frente a la dieta de 1.2% de Pi.

Para confirmar el efecto de la dieta deficiente en Pi sobre la expresión de NaPi2b, se midió la abundancia de ARNm en los dos segmentos. Se observó un incremento en la expresión de NaPi2b en el yeyuno, pero no así en el ARNm de PiT1, como se esperaba (Figura 25)

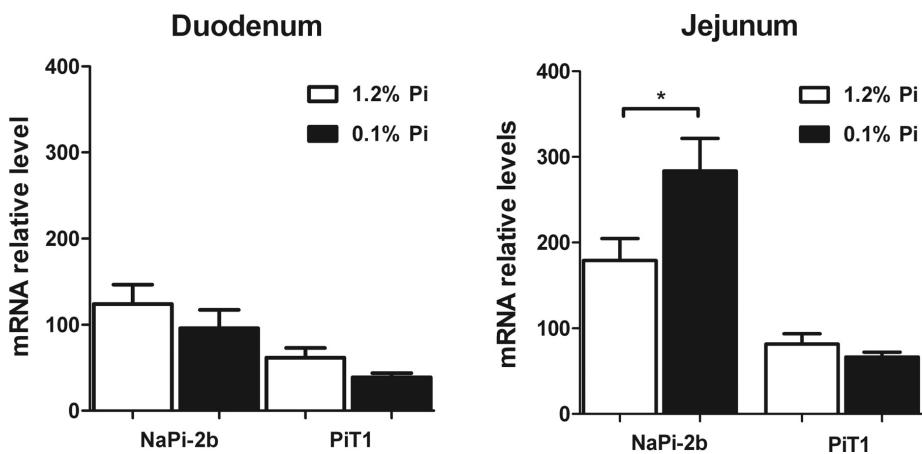


Figura 25. Medida de los cambios de expresión del ARNm de los transportadores de fosfato intestinales NaPi2b y PiT1 en duodeno y yeyuno, como respuesta a dietas de alto y bajo fosfato. * P<0.05, frente a la dieta de alto fosfato 1.2% Pi.

Luego de observar un incremento en la expresión de NaPi2b en ratas alimentadas con dietas de bajo fosfato, quisimos determinar la expresión de NaPi2b en BBM mediante inmunofluorescencia, bajo estas condiciones y en los diferentes segmentos del intestino delgado. Con ello se confirmó la mayor expresión en yeyuno, representado como el segmento de intestino comprendido entre 20 y 50 cm a partir del píloro (Figura 26), con una expresión leve en el duodeno, y no existente en el íleon.

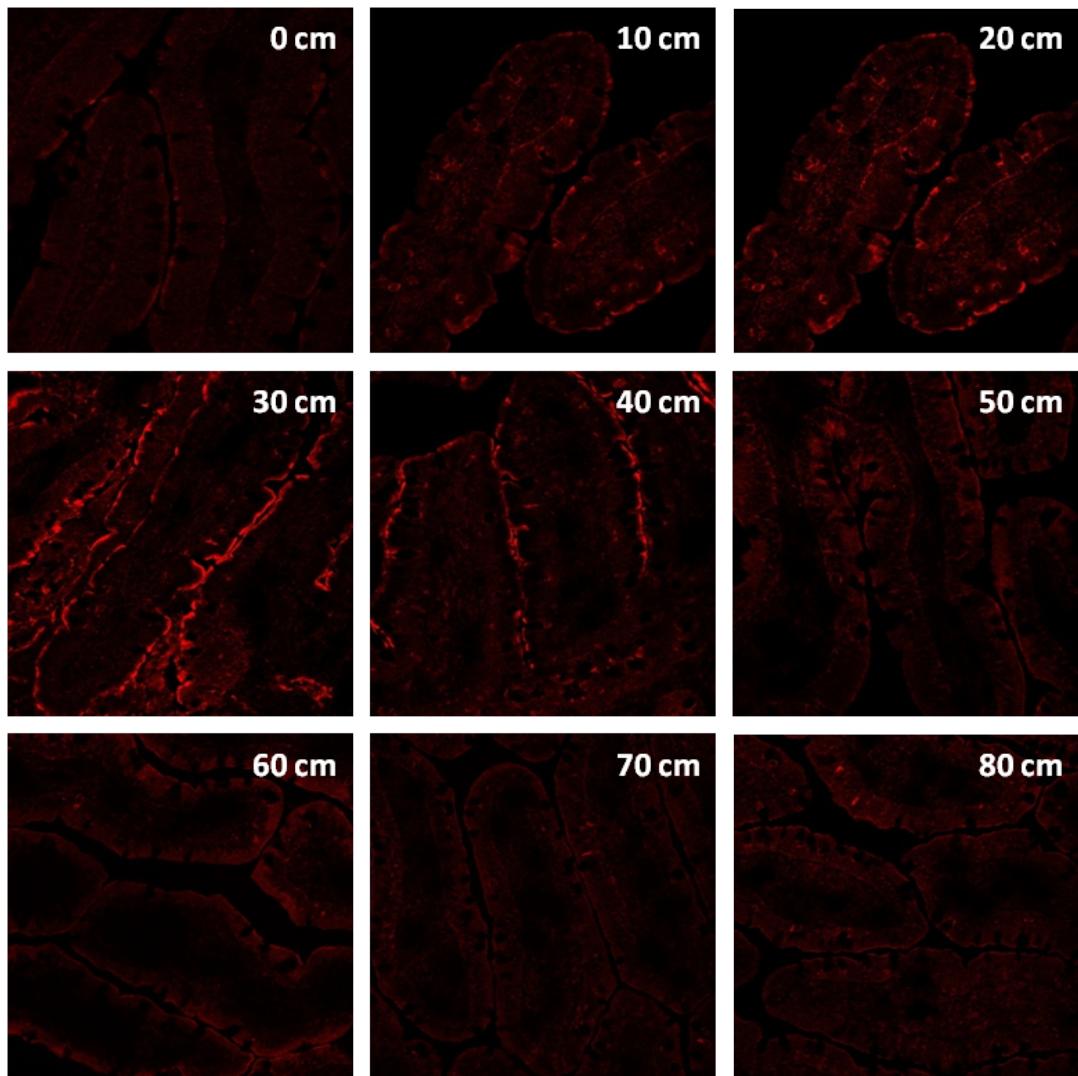


Figura 26. Expresión de NaPi2b a lo largo del intestino delgado de rata.

En aquellos segmentos en los que se observó una mayor expresión de NaPi2b, se comparó la abundancia de esta proteína en tejidos de ratas tratadas con dietas de alto y bajo fosfato (Figura 27). En los animales tratados con dietas deficientes en Pi se observó un incremento en la expresión de NaPi2b en la BBM, demostrando la importancia de este transportador en el transporte de fosfato intestinal.

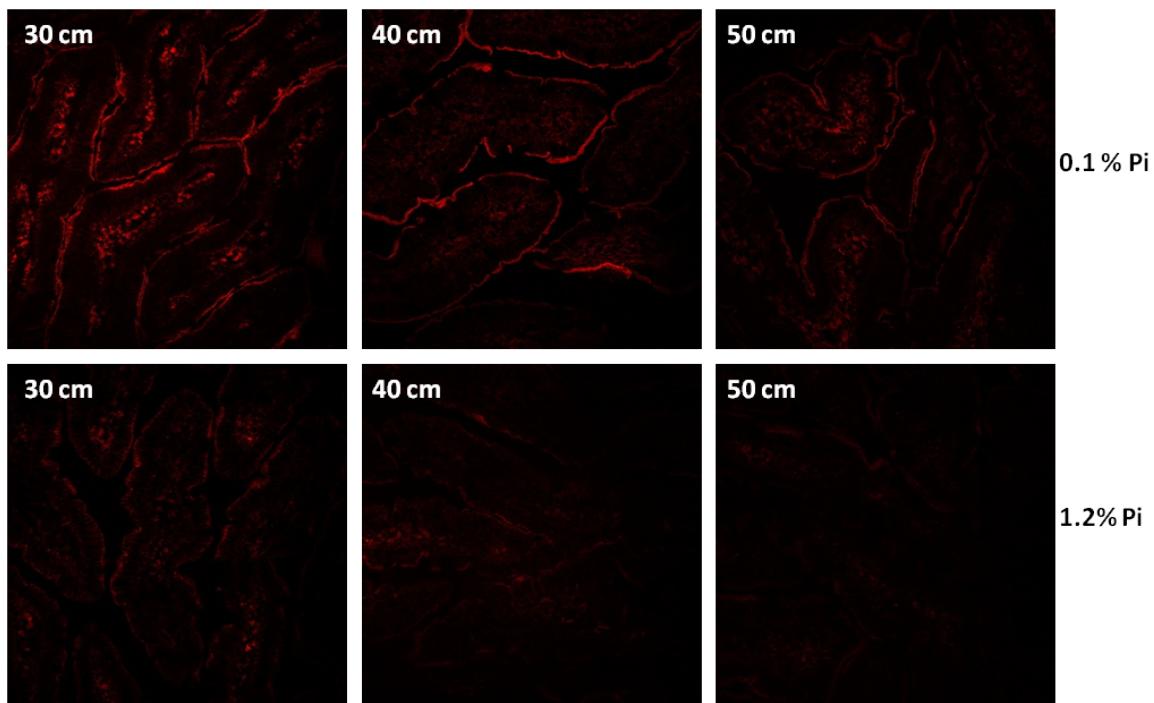


Figura 27. Cambios en la expresión de NaPi2b en diferentes segmentos del yeyuno rata, como resultado de las dietas de alto y bajo fosfato.

Los resultados de la expresión de los transportadores de fosfato tanto intestinales como renales son congruentes con la concentración de Pi en sangre que presentaron las ratas adaptadas crónicamente a dietas de bajo Pi (Figura 28). Se observa una disminución de la concentración de fosfato en sangre de un 46% ($P<0.001$) luego de que las ratas fueron alimentadas con una dieta baja en fosfato (0.1%).

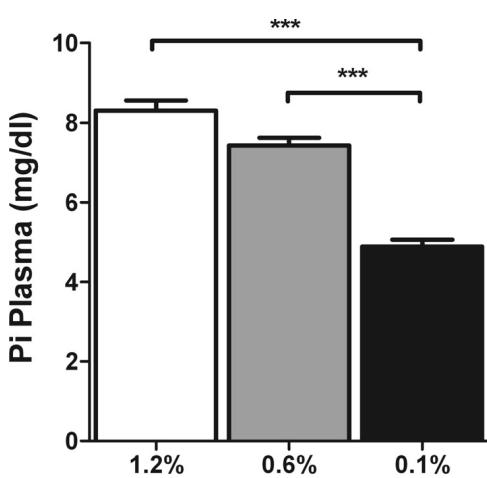


Figura 28. Concentración de fosfato en sangre de rata. *** $P<0.001$.

4.3. Adaptaciones agudas de bajo a alto fosfato.

Los experimentos de adaptaciones agudas se llevan a cabo alimentando los animales durante unas pocas horas, y ello implica que éstos deben estar hambrientos. Para conseguirlo, las ratas son alimentadas durante cuatro horas cada día a lo largo de una semana con la dieta deseada. El día del experimento, las ratas objeto de adaptación aguda son alimentadas con la dieta deseada durante ese mismo tiempo. En el presente experimento, las ratas fueron alimentadas durante una semana con una dieta baja en fosfato durante cuatro horas cada día en la mañana (7-11 am) y en el momento del experimento se les alimentó con la dieta de alto fosfato durante cuatro horas. El grupo control se mantuvo con la dieta baja en fosfato. Previo al sacrificio, se obtiene sangre para analizar su concentración de Pi (Figura 29). Estos valores fueron comparados con los obtenidos de las ratas alimentadas crónicamente con dietas bajas en fosfato.

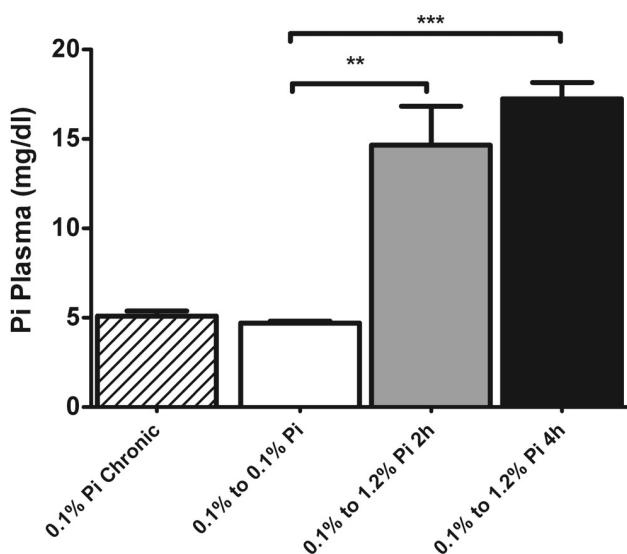


Figura 29. Concentración de Pi en sangre de ratas adaptadas agudamente a dietas de alto fosfato. ** P<0.01, *** P<0.001.

Estos resultados muestran un incremento de hasta tres veces en la concentración de Pi en sangre cuando se cambia las dietas de bajo a alto. Además, este incremento ya se observa a las dos horas de la ingesta. Este incremento del Pi en sangre puede ser explicado por una mayor absorción de

Pi en el duodeno y yeyuno, ya que al analizar el transporte de ^{32}P en BBM aisladas de estos tejidos se observa un incremento (Figura 30). Los resultados del transporte de Pi en BBM claramente muestra un incremento de casi cinco veces en duodeno, provocado por el cambio de la dieta de baja a alta concentración de fosfato. Como se esperaba, este efecto es inverso al observado en BBM aisladas de riñón, las cuales presentan una reducción en el transporte de Pi de casi un 50%. Sin embargo el incremento en la absorción de fosfato como respuesta a la adaptación aguda de bajo a alto contenido en Pi no se observa en yeyuno.

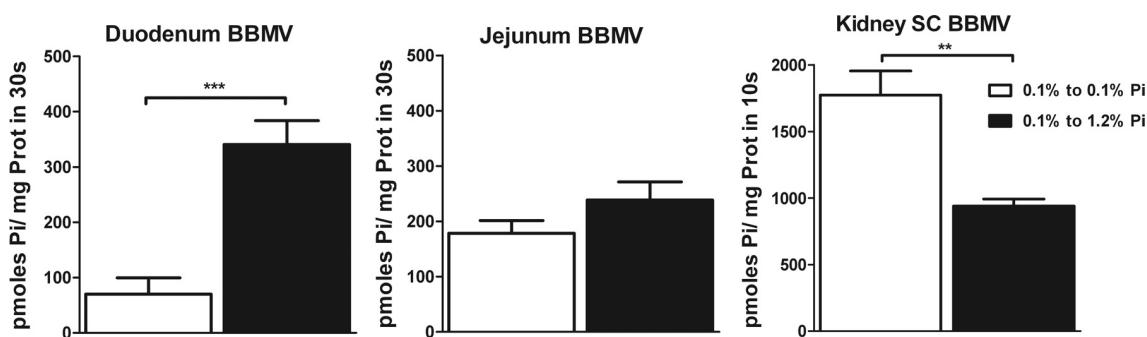


Figura 30. Transporte de Pi en BBM de duodeno, yeyuno y riñón de rata, luego de ser adaptadas agudamente a dietas de alto Pi. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Para determinar qué transportadores están involucrados con este incremento en transporte de Pi en el intestino, se analizó por WB la expresión de los dos transportadores de Pi NaPi2b y PiT1 en BBM aisladas de duodeno e íleon (Figura 31A & B). Esto se realizó igualmente en experimentos paralelos con las BBM de riñón de rata adaptadas agudamente a dieta alta en fosfato (Figura 31C). Se observó un claro incremento en la expresión de NaPi2b en duodeno de ratas adaptadas a dieta alta en Pi durante cuatro horas, con un cambio nimio en yeyuno, que no fue significativo, y sin cambios de expresión de PiT1 en ninguno de los segmentos. Llama la atención, y por ello queda sin plena justificación, que un incremento en la expresión de NaPi2b exclusivamente de, un 70%, sea el responsable del incremento en el transporte de Pi de, aproximadamente, 500%.

También se observó una reducción significativa en la expresión de NaPi2a tras el cambio de la dieta de baja a alta concentración de Pi en un

periodo de cuatro horas, en ausencia de cambios adicionales en los otros transportadores de fosfato renales. De igual forma se evidencian las diferentes respuestas a estímulos exógenos que presentan los transportadores de fosfato renales, tanto como los intestinales.

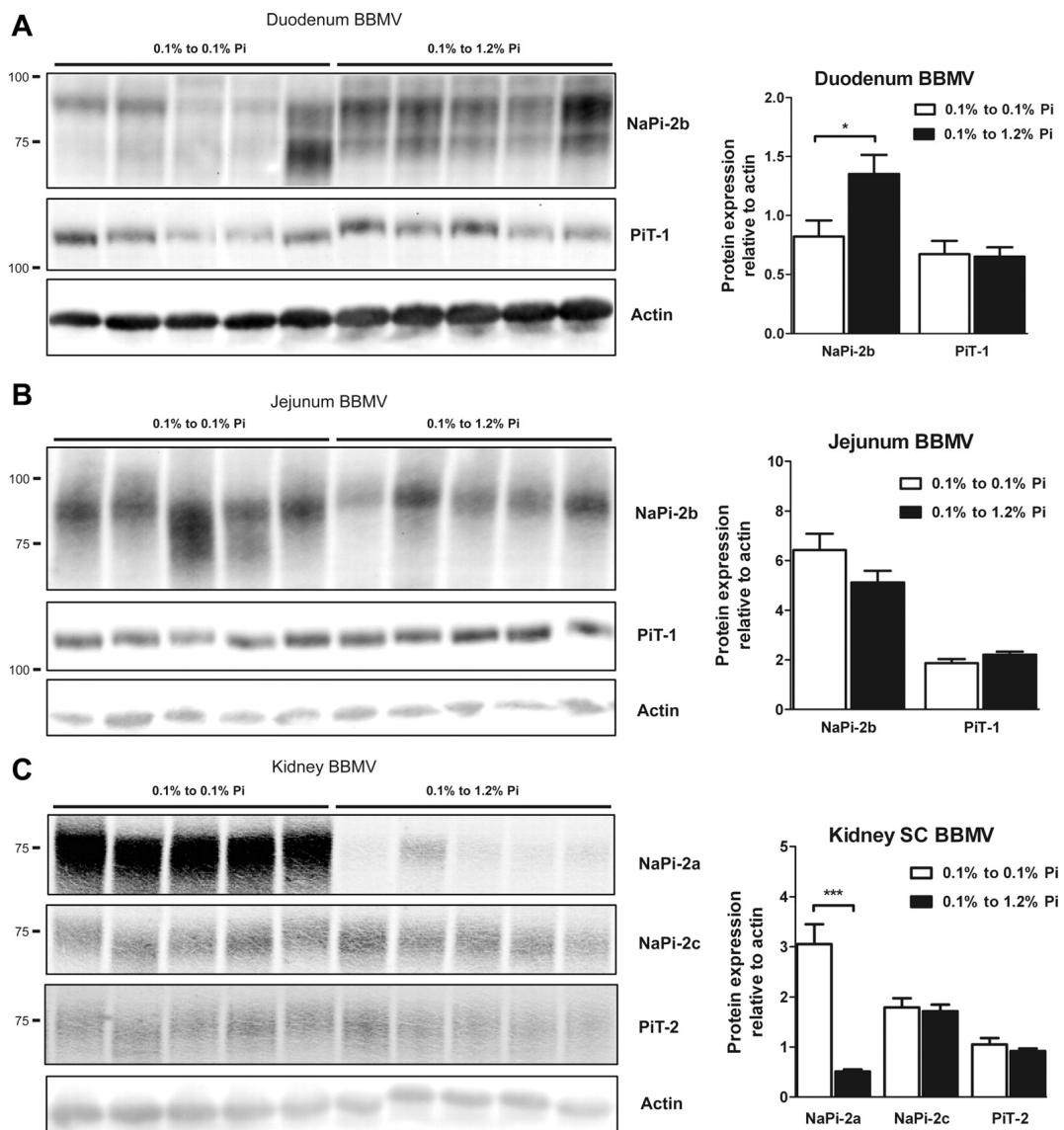


Figura 31. Análisis de la expresión de los transportadores de Pi en A) duodeno, B) yeyuno y C) riñón, como resultado de adaptaciones agudas a alto Pi. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Los cambios en la expresión de NaPi2b en BBM aisladas de duodeno como consecuencia de la adaptación de baja a alta concentración de Pi en la dieta, no se acompañaron de cambios similares en las abundancias de ARNm. Igualmente, tampoco se apreciaron cambios en los niveles de ARNm de PiT1 mediante qPCR (Figura 32).

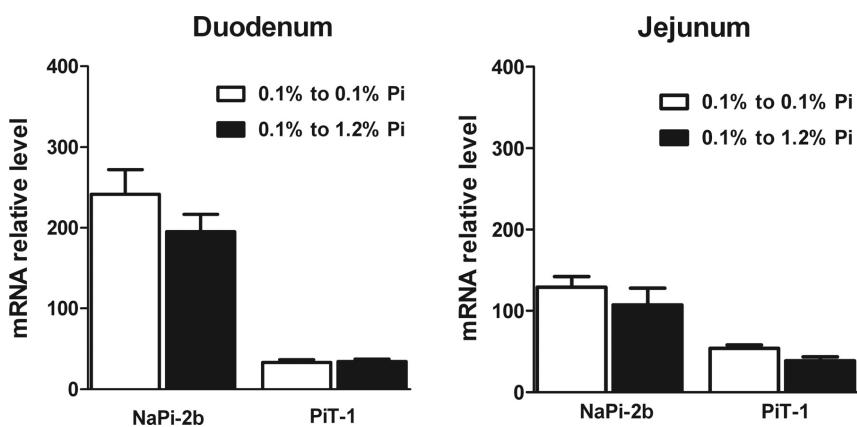


Figura 32. Medida de los niveles de ARNm de los transportadores de Pi en duodeno y yeyuno de rata por PCR tiempo real, luego de las adaptaciones agudas a alto Pi.

4.4. Publicaciones generadas de este apartado

Regulation of Rat Intestinal Na-Dependent Phosphate Transporters by Dietary Phosphate

Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Nov; 297(5):F1466-75.

Abstract:

Hyperphosphatemia associated with chronic kidney disease is one of the factors that can promote vascular calcification, and intestinal Pi absorption is one of the pharmacological targets that prevents it. The type II Na-Pi cotransporter NaPi-2b is the major transporter that mediates Pi reabsorption in the intestine. The potential role and regulation of other Na-Pi transporters remain unknown. We have identified expression of the type III Na-Pi cotransporter PiT-1 in the apical membrane of enterocytes. Na-Pi transport activity and NaPi-2b and PiT-1 proteins are mostly expressed in the duodenum and jejunum of rat small intestine; their expression is negligible in the ileum. In response to a chronic low-Pi diet, there is an adaptive response restricted to the jejunum, with increased brush border membrane (BBM) Na-Pi transport activity and NaPi-2b, but not PiT-1, protein and mRNA abundance. However, in rats acutely switched from a low- to a high-Pi diet, there is an increase in BBM Na-Pi transport activity in the duodenum that is associated with an increase in BBM NaPi-2b protein abundance. Acute adaptive upregulation is restricted to the duodenum and induces an increase in serum Pi that produces a transient postprandial hyperphosphatemia. Our study, therefore, indicates that Na-Pi transport activity and NaPi-2b protein expression are differentially regulated in the duodenum vs. the jejunum and that postprandial upregulation of NaPi-2b could be a potential target for treatment of hyperphosphatemia.

Intestinal Phosphate Transport

Adv Chronic Kidney Dis. 2011 Mar; 18(2):85-90.

Abstract

Phosphate is absorbed in the small intestine by a minimum of 2 distinct mechanisms: paracellular phosphate transport which is dependent on passive diffusion, and active transport which occurs through the sodium-dependent phosphate cotransporters. Despite evidence emerging for other ions, regulation of the phosphate-specific paracellular pathways remains largely unexplored. In contrast, there is a growing body of evidence that active transport through the sodium-dependent phosphate cotransporter, Npt2b, is highly regulated by a diverse set of hormones and dietary conditions. Furthermore, conditional knock-out of Npt2b suggests that it plays an important role in maintenance of phosphate homeostasis by coordinating intestinal phosphate absorption with renal phosphate reabsorption. The knockout mouse also suggests that Npt2b is responsible for the majority of sodium-dependent phosphate uptake. The type-III sodium-dependent phosphate transporters, Pit1 and Pit2, contribute to a minor role in total phosphate uptake. Despite coexpression along the apical membrane, differential responses of Pit1 and Npt2b regulation to chronic versus dietary changes illustrates another layer of phosphate transport control. Finally, a major problem in patients with CKD is management of hyperphosphatemia. The present evidence suggests that targeting key regulatory pathways of intestinal phosphate transport may provide novel therapeutic approaches for patients with CKD.

5. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO POR PARTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES FXR y LXR.

Como se muestra anteriormente, la regulación de los transportadores de fosfato intestinales se hace más relevante en el marco fisiopatológico de la enfermedad renal crónica cuando se ha instaurado el estado hiperfosfatémico. Ello ha provocado que el intestino sea ahora foco de atención, por ser el órgano en el que puede llevarse a cabo fácilmente una intervención farmacológica que busque la disminución de la absorción intestinal de fosfato. En este apartado mostraremos resultados de un estudio paralelo al de la regulación de los transportadores de fosfato intestinales, el cual genera un nuevo vínculo entre receptores nucleares y la regulación de los transportadores de fosfato. Estos estudios pueden llegar a tener una aplicación farmacológica en el tratamiento de la hiperfosfatemia asociada a la enfermedad crónica renal. Antes, es importante reiterar la hipótesis que nos ha llevado a estudiar la relación que pueden tener los receptores nucleares FXR y LXR con la regulación de los transportadores de fosfato renales, y su relación con la nefropatía diabética.

Una de las características importantes de la también denominada enfermedad diabética renal es la acumulación ectópica de lípidos, lo cual puede influenciar la inflamación de la nefrona y por ende, acelerar el proceso degenerativo de la enfermedad renal. Para esto, el grupo del Dr. Levi ha estudiado los efectos que puede tener la activación de los receptores nucleares en riñón con el fin de normalizar la acumulación ectópica de lípidos, y el proceso degenerativo asociado a ella. Además, se ha determinado qué cambios en la composición lipídica de la membrana de borde de cepillo puede afectar a la actividad, abundancia y/o tráfico de los transportadores de fosfato renales.

Con esto en mente, en este apartado mostraremos lo que se ha determinado como parte de esta tesis doctoral:

- a) Las células epiteliales del túbulo proximal de riñón de zanigüeya (células

OK), expresan los transportadores de fosfato NaPi2a, NaPi2c, PiT1 y PiT2, lo cual permite estudiar la regulación de estos transportadores de fosfato *in vitro*, en este modelo celular.

- b) Las células OK pueden ser usadas como modelo de estudio de los efectos de los receptores nucleares FXR y LXR en los transportadores de fosfato.
- c) Los receptores FXR y LXR modulan la expresión de NaPi4 (NaPi2a de células OK), y el transporte de Pi en células OK.
- d) Los tratamientos agudos con agonistas de FXR y LXR en ratón, reducen la expresión de los transportadores de fosfato intestinales, sin efectos significativos sobre los transportadores de fosfato renales.
- e) Los tratamientos crónicos con agonistas del LXR en ratones reducen la expresión de todos los transportadores de fosfato, y reducen la concentración de Pi en sangre.

5.1. Las células OK expresan NaPi2c, PiT1, PiT2 y PIST.

Las células OK son el modelo base para el estudio de la regulación de los transportadores de fosfato renales. Gracias a trabajos realizados por el Dr. Sorribas como miembro del grupo del Prof. H. Murer (U. Zúrich), se conoce la secuencia que expresa el transportador de fosfato renal más importante en estas células, NaPi2a, denominado originalmente NaPi-4 por ser el cuarto transportador de Pi que se identificó molecularmente [99]. Con la idea de estudiar en un futuro la regulación de estas proteínas *in vitro*, se ha tratado de complementar la clonación de los otros transportadores de fosfato de la especie *Monodelphis domestica*, al igual que las proteínas PDZ como es el caso de PIST, de la cual hemos determinado la importancia que puede tener en un posible mecanismo de reciclaje del NaPi-4 en células OK. Así, mediante técnicas de clonación por homología y kits comerciales de amplificación rápida

de extremos de ADNc (RACE, del inglés *Rapid Amplification of cDNA Ends*), se han obtenido las siguientes secuencias, que están pendientes de enviar a GenBank:

OK-PIST:

Secuencia de ADN completa.

GAAGGGAGTTC GACAAGGGCCT TCGTGGACGT GGATCTGCTC TTGGGCAGAA TCGACCCGGA CCAAGCGGAC ATCACTTACG AGGGGCGCCA GAAGATGACC AGCCTGAGCT CCTGCTTCGC GCAGCTCTGC CACAAAGCCC AGACCGTGTGTC CCAGATCAAC CACAAGCTCG AGGCACAGTT GGTGGATCTG AAATCTGAAT TGACAGAGAC CCAGGCTGAA AAAGTGTAT TAGAAAAAGA AGTTCATGAT CAACTTTAC AACTGCACTC CGTTCAGCTG CAGCTGCATG CCAAAACTGG CCAGAGTGTGTT GATTCTGGTA CCATTAAGGG AAAATTGGAG AGAGAACCTG AAGCAAATAA AAAAGAAAAAA ATGAAAAGAAG CTCAACTTGA AGCTGAGGTG AAGCTTAAAG GAAAGGAGAA TGAAGCCCTT CGTAGACACA TAGCAGTTCT CCAGGCAGAA GTTATGGGG CGAGACTGGC GGCCAACTAC TTGGATAAAG AATTGGCAGG AAGAGTCCAA CAGATCCAGT TACTAGGTG AGATATGAAG GGACCTGCTC ATGATAAACT TTGGAACCAA CTAGAACCTG AAATCCACCT GCATCGTCAC AAAACAGTTA TTAGACCTG CAGAGGACGC AATGACTGAA AACGATCAAT GCAAGCACCG CCAGGACATG ATCAAGATTC CTTAAAGAAA AGTCAGGTG TTGGTCCAAT CAGAAAGTT CTTCTCCTCA AAGAAGATCA TGAAGGACTT GGCAATTCAA TTACAGGTGG AAAGGAACAT GGTGTTCAA TTCTTATCTC TGAAATCCAT CCTGGACAAC CTGCTGATCG TTGTGGAGGA CTGCATGTTG GAGATGCCAT TCTTGCAGTC AATGGAGTTA ACCTGAGAGA TGCTAACAT AAAGAAGCTG TAACTATTCT TTCCCAGCG AGAGGAGAGA TTGAGTTGA AGTAGTTAT TTGCTCCTG AGGTAGATTG TGATGATGAA ATGTGGAGT ATGAGGATGA GAGTGGACAC CGTTATCGTT TGTATCTGA TGAATTAGAC GGAAGTGGAA ATCCTGTTGC TCACCGAAA GGTGCAAGTG GGGACATAAA ACTATTACAA GGCTTTAATA AGAAACCACT AATTGATGGA CATGAAAATG GAGACCTGGG AACCTCAAGT GAAACTCCCC TTGATGACAG TGCATCCAAG TTAGCTGAGT CAGCAGAAC TTTGTCATCAA ATGGTTTATT AAATTAACCT TTCTGCAGGC AATATTGTTA CTCAAGACTGT TATGGATTTT ATATTCTAGG GGAGATTGTG AAAAGAACCTG TCTAAAGGAA AAAGGGAGGC TGTTGTTTAT TGCGAATAA AAAGGAGTT ACCTCAAGGC TTCAATTGTGA GCAATTCAA ATGTTAAAAA CTCTCGTTT TCTGTGATAA ACCATAATTA GCAATTGCAT GTAAACCAAT TTTTATTTC TAAATTTGT AAACACCAAA GCATGTGTTT CCCCAGGGAA TATTACTAAT CTTTTAAGGT ACAAAATGAA GCATAATTGT TTCAATTGTG TCCCTTTCTT CACTTAACAG AAGGACAGTG TTAACAGGAA TCTAATAGGA AATAGCCTT AATTACAAA GAGTAAACTA AATTGTTTA AGTGTATCCC AGAAAGCTAT ATTGTGGTGT TTTAAATTGG AAATTTTAT TTGTTAAA GCAGAAAAGT GGGCTTAAC TCAAAACAAA AAAGTCCAC ATTTGAATAA TTCAAAATTG AGGGAAATGAT TTAGTTTCT ATTATTACA GATTTGATT CCTGAATCAT TTCTTAGTGA TCATTTAGGT GTAATGAGTA TGCCCTTCAG CTTGTTAA TGCAAGTTAA AACTAGTTTA AGTAATCCTT TGTCAATCAA TGCTGCACCA GAAATAATT CTGAAGAGT CTTGCACATT ATACTTTTT AAAAATTCA AATAAGTGTAA AAATATCTGT TCACAATTAT GTTGATGCAT GTGCATGGCA TTGTCATTC CCAAGCTCC TCCCTGATTTC CCTATGAAAT TAGTTTATA CATTGAGT TGTCATACAT GTTGTCACTG CCATGATAGT CCTGGTACTT AAAAGTCAA TATTGTTATT GTTAACAAGA AAAACGATTG CCTTGAGAGA TTAGTTAA AGTAACATGAT AATTGATTTC TCAGGGCTCA GGGCACACAT GAAGTATTAG GAAACTTGAT AACTGATTG TTTGTTAGT TTTCCCTTTC TTCCCTTAA GTATTCTTAT GCAAATTAA CAAATGTGTT AGCTTCTCTC ATCTCAAAGC AAAACCTGTA AACTCTGTT TGCTATGTAT AAACCACTAT ACCCTAGTGG AGCAACATCA AAGCATTGTA TTTAATTAAC AAGATGAGTT TTGCAACAT TGTTGTTTA AAGACCTATG TAGATGGAGA AAAACCTAAA CGCCTATAG GAAGATATCA GTTTATTCAA TGCTTAATGT TAAATGTTA CATATTGCAG GACAAGGTTG CTAGCCTCAA CTTAGGTGCA TTATATATTT GTTTATAGAG AAATCTTAA AAATGTATAT ACTTTATTCA TTGATTTCG TATTTAAAAA TCTTTGTTT ATAAC

Secuencia de aminoácidos de PIST.

MFRWLEVLEKEFDKAFVDVDXLLEIDPDQADITYEGRQKMTSLSSCFAQLCHKAQTVSQINHKLEAQLVDLKSELTELQAEKVLEKEVHDQLQLHSVQLQLHAKTGQSVDSTIKAKLERELEANKEKMKEAQLEAEVKLLRKENEALRRHIAVLQAEVYGARLAALKYLDKELAGRVQQIQLLGRDMKGPAHDKLWNQLEAEIHLHRHKTVIRACRGRNDLKRSMQAPPGHDQDSLKKSQGVGPIRKVLLLKEDHEGLGISITGGKEHGVPILEIHPGQPADRCGGLHVGDAILAVNGVNLRDAKHKEAVTILSQQRGEIEFEVYYVAPEVDSDDENVEYEDESGHRYRLYLDLEGSGNPVAHRKGASGDIKLLQGFNKKPVIDGHENGDLGTSSETPLDDASKLAESAESLS
stop

OK-PiT2:

Secuencia de ADN completa.

GCTACCCNNC GCGATTGCC CTTGGAAC TG ACATGGACTG AAGGAGTAGA AAAGATCGGA CCACGTGCGC AGTGGGCTCC CTGGCGTTAG GCTGGAAAGG TTGACAGCTG CCGCGGCCCT GGCCCTTCC TCGAGGGTCA TGCTATATCC AGGCTCTGGA AGTCTTGCT ATGATGATTA AAAAGATACA CAGCTTTAC CCGAAGAGGA ATGATTCAAG AGTAATTCCC TGCGCCAAAAA GAAGCTCAT ATCAAGCAGG TCCAAGT TT GGATGTTTA ACAGCCTCAT AAGACAGACA CCTGCAAGAG GGGATATCAC AGCGTTCCA GTCTCAGAGA AAAATATGGA ATGTGTTTA CTGCTGACTG AACACAACCA AACAAACTGT ACAGACAATA GTTGAGAAC CAGCAGTAG CAGTTGCTC AGGCTCTTAC ACTCTCCAGA ACCTTCAGA GCAAATCTC TGTTACAAG AACTCTACCT TACAAGGTTT TTACAAAACC TCAAGCGTGG TTTATTAAG TATTCTACAA AGGGAAAAC TCCTGCAGTC CACTTGCAA A **ATG**GTATG GATGATTACT TGTTGGATGGT CATTCTGGC TTTATCATAG CCTTTATCTT GGCATTTCT GTTGGTGC AA ATGATGTGGC CAATTCTT GGCACAGCTG TGGGCTCTGG CGTGGTGCAC CTGAGGCAAG CCTGCATTT GGCATCCATA TTTGAAACCA CCGGCTCAGT ATTGTTAGGA GCGAAAGTGG GAGAGACTAT TCGAAAAGGT ATCATTGACG TGAACCTATA CAAGGAGACA GTGGAGACGC TGATGGCCGG GGAAGTTAGC GCCATGGTTG GTTCTGCTGT TTGGCAGCTG ATAGCATCAT TCTTGAGACT TCCTATCTCA GGAACCTATT GCATTGTGGG TTCTACATAA GGATTTCAC TTGTTGCAAT TGGTACAAA GGTGTCAGT GGATGGAGCT TGTCAGAAGATT GTGCTCTT GGTTTATATC TCCACTGTTG TCTGGTTCA TGCTGGCGT GCTGTTGTG CTGATCAGAA TTTTCATCCT AAAAGAGGAG GACCCAGTCC CCAATGGTCT CCAGTGCAC TT CCACTGTTCT ATGCTGCTAC CATAGCAATT ATGTTTTT CCATCATGTA CACAGGGCA CCAGTATTAG GTTTGACTCT TCCAATGTGG GCTATAGCTC TCATTCATT TGGCCTGCT ATTGTATTG CTGTTTTGT GTGTTGGTC GTCTGTCCAT GGATGAAGAG GAAAATAGCA GGCAAAATTAA AGAAAGAGGG TGCCCTATCA AGAATATCTA ATGAAAGTCT CCATAAAATC CAAGAACCG AGTCCCCCGT ATTTAAGGAG CTCCCGGCG CCAAGGTGAA TGATGACACC ACCGTTCCCC TCACCAGCTC AGCCCCCGAA GCCCCGGAG TGTCAGAGAG CACAGTGAAT GGAAGCCACT CACGTGTCCT CTTGGCAGG GCCCTCTCCA TGACGCCAGC CTCCGGGAGG TCGCCCGTGT CCAACGGCAC GTTGGCTT GACGGCCAGC TGCCAGCGA CGGCCACAGT TACACACGG TGCAACAAGGA CTGGGCCCTC TACAAGGACC TGTCACAA AATCCATG GACCGGGGGC CGGACGAGAA GCCCTCGCAG GAGCCCAAGCT ACAAGCTGCT CGCCCGCAAC AACAGCTACA CGTGTACAC GGCGGCCATC TGCGGCATGC CCGTGCACTC GGCCTCAAG CGGGCCGACG TGCTCTGGC GCCCAGGAGC AGCGAGAAGC TGGTCAGCGA CACCGTGTCC TACTCCAAGA AGAGGCTCCG CTACGACAGC TACTCCAGCT ACTGCAACGC CGTGGCCAG GCGGAGATCG AGGCCGAGGA AGGCAGCGTG GAGATGAGGC TGGCCTCGGA GCTCACCGAC TCCGCCAGC CCATGGACGA CCCGGGGAG GAGGAGAAGG AGGAGAAGGA CACGGCCAG TGCACTCGC TCTTCCACTT CCTGCAAGTC CTCACCCCT GCTTCGGCTC CTTTGCACAT GGCAGCAACG ATGTCAGTAA TGCCATTGGC CCTTTGGTAG CTTTGTGGCT TATTACAA CACAAAGGAG TGATGCAGGA AGCAGCTACT CCTGTCCTGGC TGCTTTTA TGGAGGAGTC GGTATTGTG CGGGTCTCTG GGTTTGGGG AGAAGAGTGA TCCAGACGAT GGGGAAAGAC CTCACACCTA TCAACGGC CAGTGGATTC ACTATTGAAT TGGCTTCGGC GTTCACAGTT GTGATAGCTT CCAATGTTGG ACTTCCTGTC AGTACTACAC CCTGCAAGGT TGGCTCAGTG GTAGCAGTGG GCTGGATCCG CTCCCGAAAG GCAGTCGACT GGCATTTTT CCGGAACATT TTCTGGCCT GGTCGTGAC CGTCCCGTG GCCGGCTTGT TCAGCGCCGC TGTGATGGCC GTCTGATGT ACGGCATCCT GCGTACGTG TGATGTTGCT CCAGAGATCA ATAGATTAT CAATAAAGGG AGAGTTGAT GGTCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

Secuencia de amino ácidos.

MAMDDYLWMVILGFIIFILAFSVGANDVANSFGTAVGSGVVTLRQACILASIF ETTGSVLLGAKVGETIRKGIDVNLYKETVETLMAGEVSAMVGSAVWQLIASFL RLPISGTHCIVGSTIGFSLVAIGTKGVQWMELVKIVASWFISPLLSGFMSGVLF VLIRIFILKKEDPVNPNGLRLALPLFYAATIAINVFSIMYTGAPVLGLTPMWAIALIS FGVAIVFAVFVWLVVCPCMWRKRIAGKLKKEGALSRSISNESLHKIQTETESPVFKE LPGAKVNDDTTVPLTSSAPEAPGVSESTVNGSHSRVPYGRALSMTHGSGRS PVSNGTFGFDGQLRSDGHVYHTVHKDGLYKDLLHKIHLDRGPDEKPSQEPS YKLLRRNNNSYTCYAAICGMPVHSAFKAADVSSAPEDSEKLVSDTVSYSKKRL RYDSYSSYCNAVAEAEIEAEEGGVEMRLASELTDSGQPMDDPGEEEKEEKD TAEVHLLFHFLQVLTACFGSFAHGGNDVSNAIGPLVALWLIYQHKGVMQEAAAT PVWLLFYGGVGICAGLWWGRRVIQTMGKDLTPITPSSGFTIELASAFTVVIAS NVGLPVSTTPCKVGSVVAVGWIRSRKAVDWHFFRNIFVAWFVTVPVAGLFSA AVMAVLMYGYILPYVstop****

OK-Pi1:

Secuencia de ADN truncada en 5'.

CTTCTCGTGG GGGCCACGAC GTGGCCAATC CTTCCGGCAC GGCGTGGGC TCCGGGGTCG TGACCCCTGCG CCAAGCCTGC ATCCTGGCCA GCATCTCGA GACGGTGGGC TCCGTGCTGC TGGGGGCCAA GGTGAGCGAG ACCATCCGCG AGGGCCTCAT CGACGTGACC AGGTACAACG CCACCGAGCT CATGGCCGGC TCGGTAGTG CCATGTTGG CTCCGCGTG TGGCAGCTGG CCGCCTCCCT CCTGAAGCTT CCCATTCCG GGACCCACTG CATTGTCGGG GCGACCATCG GCTTCTCCCT GGTGGCCACC GGGCAGGAAG GGGTCAAATG GTCCGAGCTG CTGAAGATTG TGTTATCGTG GTTCATCTCC CCGCTTCTGT CTGGCATTAT GTCTGCCATC CTCTTCTCT TAGTTCGCTC CTTCATCCCT CGCAAGAGTG ATCCAGTTCC CAATGGTTTG CGAGCCCTGC CGGTTTCTA TGCCTGCACA ATTGGAATTAA ACCTCTTCTC CATCATGTAC ACTGGAGCAC CCATGCTGG CTTTGACAAA CTTCTCTGT GGGGTACCAT CCTCATCTCG GTGGGATGTG CTGTTTCTC TGCCCTTATC GTCTGGTTCC TTGTCGTCC CAGGATGAAG AGAAAATG AACGAGAAAT CAAATCCAGT CCTTCTGAGA GTCCCTGAT GGAGAAAAAG AGTAGCTTGA AAGAAGACCA CGAGGAAGCC AAGCTCTCCC TTGGTGATGG GGAGAACAGG CACTGTGCT CTGAAGTGGG GGCCGCTTCT GTGCCCTGT GAGCGGCAGT CGAAGAGAGA ACCGTTTCTA TCAAGCTGGG AGACTGGAG GAAGCCCCGG AGCAGGGAGAG GCTCTCTAGT GTAGACATGA AAGAACAAA TATTGACCAT GCGATGAACG GCGCCGTGCA GTTGCCTAAT GGGAACTTGC TCCAGTTCAA TCAAACAGTC AGCAACAGCA TGAATTCCAG CGGCCACTAT CAGTACACCA CCGTGCACAA GGACTCTGG TTGTACAAGG AGTTACTTCA TAAGCTGCAC CTCGCCAAGG TGGGGACTG CATGGGGAC TCCAGCGACA AACCCCTGAG CGGGAAACAC AGCTACACGT CCTATACCAT GCCATCTGC GGATGCCCT TGGATTCTT TCGTGCCTAA GAAGGGAGGC CGAAAGGCCA GGAGATGGAG AAGCTGACCG GGCCCGCCTT GGACTCCAAG AAGAGGGTCC GAATGGACAG CTACACCAAGT TACTGCAACG CGTGTCCGA CATCCACTCG GTGTCTGACG TGGACGTGAG CGTCCAGGT GAGCGAGGCC TCAGGGAGCG CAAGGGCAGC GGGGACTCCC TGGAGAGATG GCAGGACCAAG GACAAGCCCC AGATCTCCCT GCTCTTCCAG TTCTGCAGA TCCTCACGGC CTGCTCGGC TCCTCGCCC ACGGTGGGAA CGACGTCAGC AATGCCATCG GACCTCTGGT CGCTCTGTAT TTGGTCTATC AAATAAAGA TGTTGCTCC AAAGCAACAA CCCCAATCTG GCTTCTGTG TACGGTGGCG TTGGTATCTG TATTGGTCTC TGGGTCTGGG GAAGGAGAGT TATTCAAACC ATGGGGAGG ATCTCACGCC GATCACGCC TCTAGCGGT TCAGTATTGA ACTGGCATCA GCTCTCACCG TAGTCATTGC ATCAAACGTT GGCCTTCCCA TCAGCACCAC TCACTGTAAG GTGGGCTCAG TTGTGCTCTGT TGGCTGGCTT CGCTCTAAGA AAGCTGTGGA CTGGAGGCTC TCCGAAACAT CTTCATGGCC TGG

OK-NaPi2c:

Secuencia de ADN truncada en 5'.

ACGANTCGCC CTTGGANCTG ACATGGACTG AAGGAGTAGA AATCCTATTG ACTGCTCAGA GGGTGCCTTG GGGCCAAGAG GCTGCTCAGC CAGCCTGGGA CCTGGCCCTG CACTGACCCC TGACCCATGC CTCACCTCCA ACCTGGCCCC AGGGCCCCCTA CCACAGTCAA TATCACTCTT GAAGGTCAA GAACTGAAGA TGCAAGTATG GAAGAATTCA GGACTCAGGT CCCCAGCTGG TCTCCGACCC AGGAGGAAGA GGGGAAGCA GATCCTTGGG CCCTCCACCA GCTGAAACAA TCTGGCCAAT CATGGAAAGA GTTAAAGCCGG GGCAGGTGGG ATACGCCACG TGGCATTGG TGTCTAAAG GGCTTGCCT TTCTTGCCT TCTCTACCTC TTCATTGTT CCCTGGACAT TCTCAGTTCT GCCTTCCAGC TGCTGAGCAG TAAAGTGAAT GGGGACATCT TTAAGGACAA TGTCGTCTG TCCAACCCCG TGCTGGGCT GGTATTGGT GTCTGGTCA CTGTAATGTT ACAGAGTTCT AGTACCTCAT CCTCCATTGT GGTCAAGCATG GTCTCTCAA AGTTGTTGAC TGTCAGAGCC TCAGTACCCA TCATCATGGG AGTCAACGTG GGCACATCTA TCACCAAGCAC CTTAGTCTCC ATGGCCAGT CAGGTGCCAG AGATGAATTC CGGAGAGCCT TTGGTGGCTC TGCTGTCAT GGCATTTTTA ACTGGCTGAC AGTACTGGTG ATGCTGCCCT TGGAGATTGC AGCCAGAGCT CTGGAAAAC TCAGTGGTGT GGTGGTGGGA GCCTTACTC TCAACCTGG GGAACGAGC CCTGACATCC TGAAAGTACT CACACAGCCC CTCACCCATC TCATTGTC GCTAGACTCA AAAGCTATCT CAGAAAGCAGC CACAGGCAAC ATGACCAAAA GCATCATTAA CGAGTGGTGT GTCACCCGGG AAGAGATGAC TGTGAAACG GTGCCCTGTA AGAACGTCA TGAATGCACT ATTCAAAACT GCTACCCCTG CGGGACCATG TTTTGCCAAAG AGAAAGATGT CACAAACACA GTCAATGTGG AACTTTGTCA CCACATTTT GTGAATTCCA CCCTACTGA CCTGGCCATC GGCTTCATCC TCCTGGCTGG CTCTCTGCT GCCCTCTGCT CTGGCCTGGT CCTCATCGTC CGCCTACTCA ACTCCGCTCT TCATGGCCAG ATTGCCAGG TCGTGGGAA GGTCAACAC GCTGAATTCC CCTTCCCTT TGGATGGCTC AGTGGCTATT TGGCATTGT GGTTGGTCT ATTATGACCT TCGTGGTCCA GAGCAGCAGC GTATTCACTG CGGCATTGT TCCCTGTATA GGCTAGAACT CCCTATCTTG TCCAGACTAG AAGTACACTG GCCACTTCTG GATCTGGTTC TCAAACTGCA TCAGCATAGA AGCTTAAACT TGTTCTTTT TTCCATTAA ACCTCCTTCC CAGAGGGAGA CAATTGGAT TGCATAACTT CGGAAACATT ATGTGAAAT TTGTTATCAC ATGTAATTGA TAAAAAATAAA ATCCATTAC CAAAAAAA AAAAAAAA AAAAACACTG TCACTGCCGT ACGTAGCGAA GGGCAATTC GTTAAACCT GCAGGACTAG TCCCTTAGT GAGGGTTAAT TCTGAGCTTG GCGTAATCAT GGCCATAGCT GTTCCCTGTG TGAAATTGNT ATCCGCTCAC AATTCTCAC AACATATAAT CGGAAACAT AAAGT

5.2. La células OK pueden ser usadas como modelo de estudio de la regulación de los transportadores renales NaPi, por medio de los receptores nucleares FXR y LXR.

Para determinar los efectos de la activación de estos receptores nucleares en la regulación de los transportadores de fosfato renales, inicialmente se determinó las concentraciones ideales de los diferentes agonistas. Para ello, se realizó un estudio toxicológico para determinar el rango de concentraciones adecuadas de los diferentes agonistas. Para esto, se utilizó el método de cuantificación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) intracelular liberada al medio de cultivo, estableciendo parámetros clásicos como concentraciones letales medias LC₅₀ (Figura 33 y 34). Igualmente se correlacionaron estos datos, con conteo celular y morfología por microscopia.

2.2.1 Resultados de concentración letal por LDH intracelular:

Para los diferentes agonistas del FXR se obtuvieron las siguientes constantes de toxicidad:

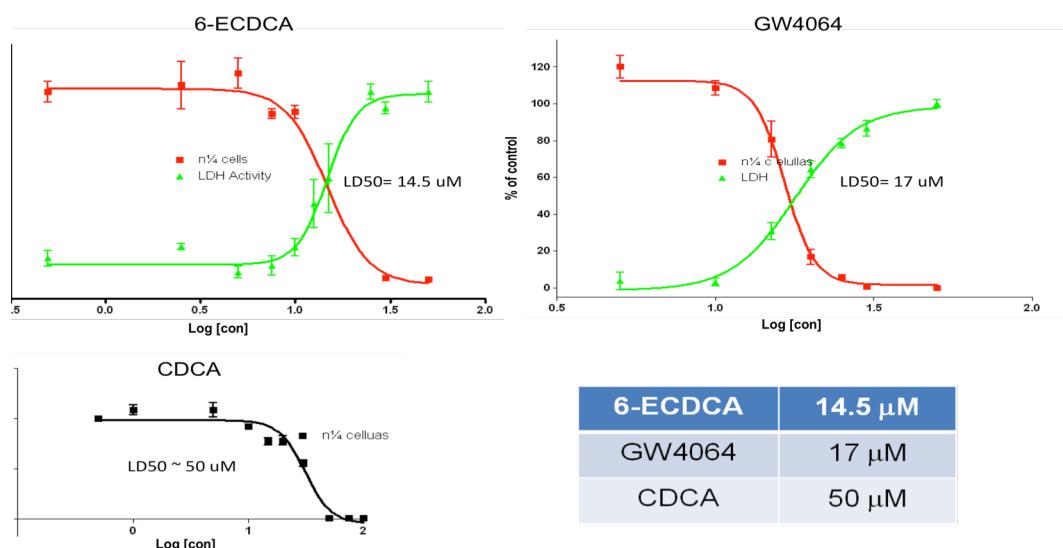


Figura 33. Cálculo de la concentración letal 50 para los agonistas de FXR

En el caso de los agonistas del LXR las dosis letales para las células OK son:

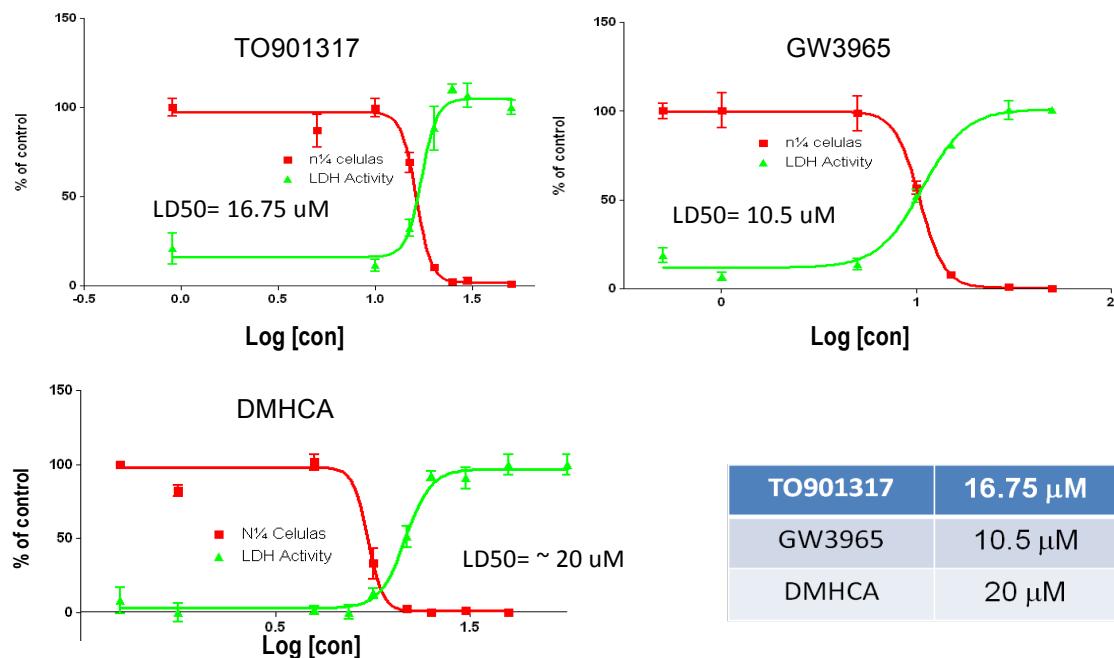


Figura 34. Cálculo de la concentración letal media para los agonistas de LXR

A partir de los resultados de dosis letales, se concluyó que las concentraciones para estudios en condiciones agudas se realizarían a 5 μ M, con excepción del CDCA, que se utilizaría a 30 μ M.

2.2.2 Determinación de la activación de los receptores nucleares.

La activación de los receptores nucleares se determinó por microscopía inmunofluorescente (IF). Tras una incubación de 24 h con cada agonista, las células fueron fijadas con paraformaldehído, para luego teñir los filamentos de actina en verde mediante faloidina conjugada con Alexa 488, el núcleo en azul con DAPI, y los receptores nucleares en ambos casos, teñidos en rojo con los anticuerpos correspondientes conjugados con Alexa 568. Como muestran las figuras, existe un claro incremento de la señal roja correspondiente a los receptores nucleares dentro del núcleo, en las células que han sido tratadas con los agonistas, lo cual indica activación y traslocación de FXR y LXR (Figuras 35 y 36). Para observar cambios de intensidad, la exposición de las células con receptores activados fue fijada a la exposición obtenida automáticamente de las células control.

Inmunofluorescencia (IF); determinando por microscopia confocal la traslocación de los receptores al núcleo.

Activación de LXR:

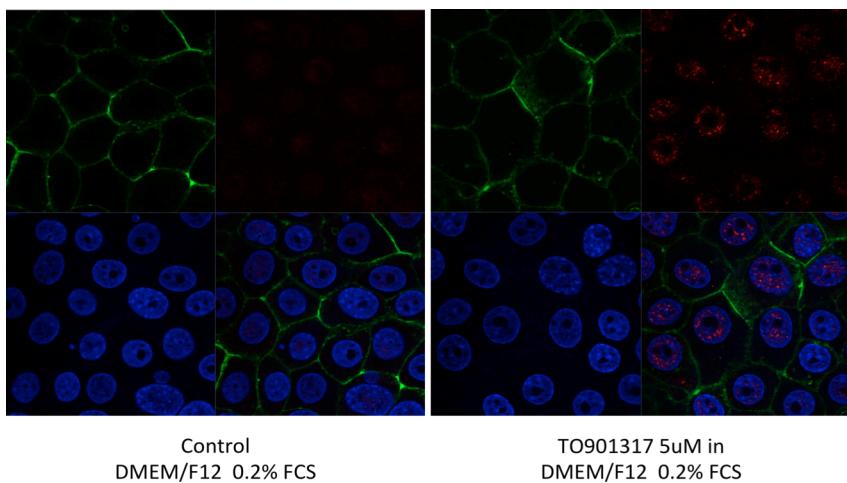


Figura 35. Activación y translocación de LXR (rojo) al núcleo (azul). Membrana (verde). Note los altos niveles de expresión de LXR luego de la activación con TO901317.

Activación de FXR:

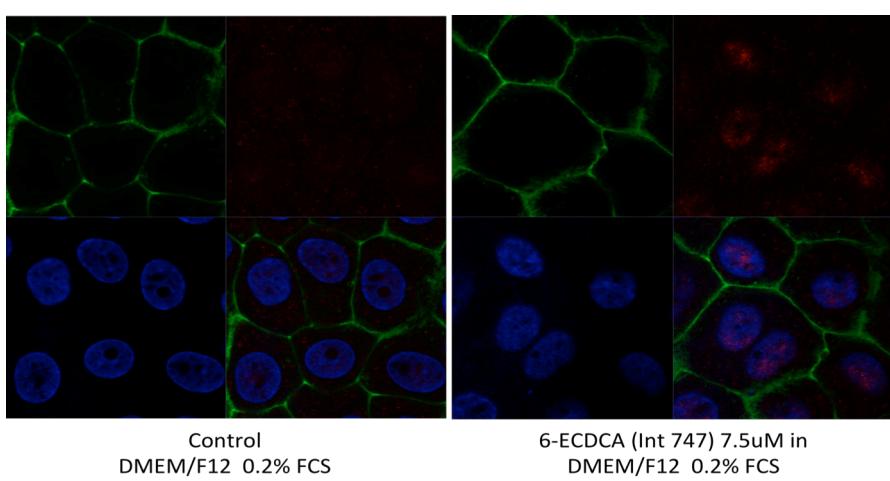


Figura 36. Activación y translocación de LXR (rojo) al núcleo (azul). Membrana (verde)

2.2.3 El uso de agonistas de FXR y LXR induce cambios en el contenido lipídico en células OK.

Dada la gran importancia de estos receptores nucleares en el metabolismo de lípidos, quisimos determinar la presencia de cambios en la

concentración total de lípidos mediante el colorante fluorescente Rojo Nilo, como se muestra en la siguiente figura.

Cambios en el contenido lipídico inducido por agonistas de LXR

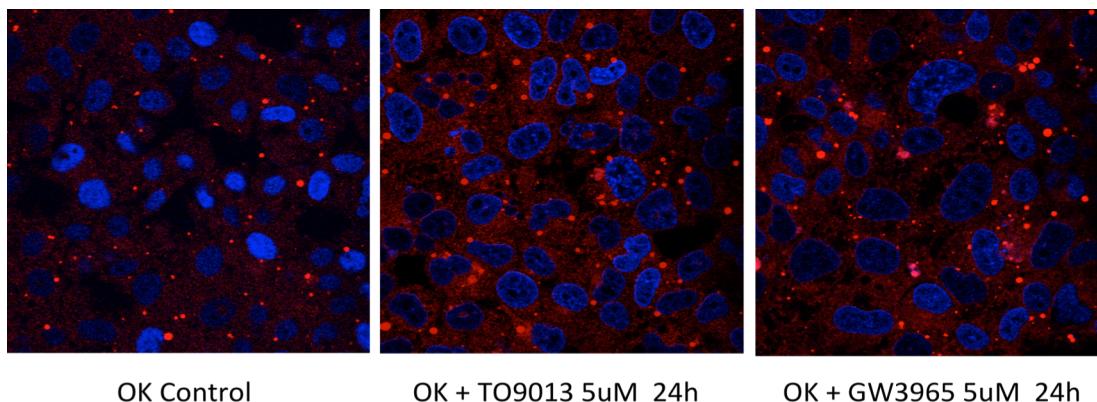


Figura 37. Efectos de LXR en el contenido lipídico analizado por rojo de Nilo.

Las células fueron incubadas durante 24 horas con dos agonistas diferentes de LXR. Los cambios en el contenido lipídico se pueden determinar por el cambio en el número y forma de las gotas de lípidos en el citoplasma. Se observa claramente un incremento en el número de gotas lipídicas en las células tratadas con los agonistas, lo cual tiene sentido ya que se induciría la síntesis de ácidos grasos a través de la activación de SREBP1c.

Cambios en el contenido lipídico inducido por agonistas del FXR

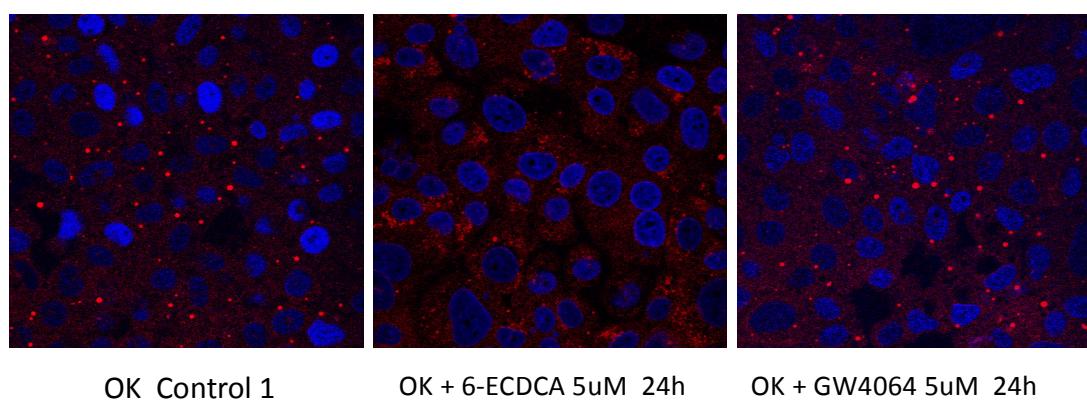


Figura 38. Efectos de FXR en el contenido lipídico analizado por rojo

En el caso del FXR, el cambio en el contenido lipídico es menos evidente en las células tratadas con el agonista GW4064. En el caso del

esteroide 6-ECDCA, vale la pena resaltar el cambio en la morfología de las gotas de lípidos intracelulares, lo cual podría estar relacionado con cambios en la naturaleza de los lípidos.

Los cambios observados fueron corroborados por análisis de triglicéridos y colesterol (Figura 39 y 40) por medio de kits bioquímicos comerciales (Wako) para análisis de triglicéridos, y el método publicado por Allain et al. para análisis de colesterol [100]. En esos métodos, tanto triglicéridos como colesterol son hidrolizados a ácidos grasos (con diferentes enzimas para cada caso), para ser después oxidados. En este proceso se libera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es convertido en quinoneimina. Dicho compuesto presenta un color rojo y su concentración puede ser medida por espectrofotometría.

Para nuestro propósito específico, tras la incubación de las células con los agonistas respectivos a cada grupo, se extrajeron las membranas totales de las células, y los cambios lipídicos se compararon con células no tratadas y con una recta patrón.

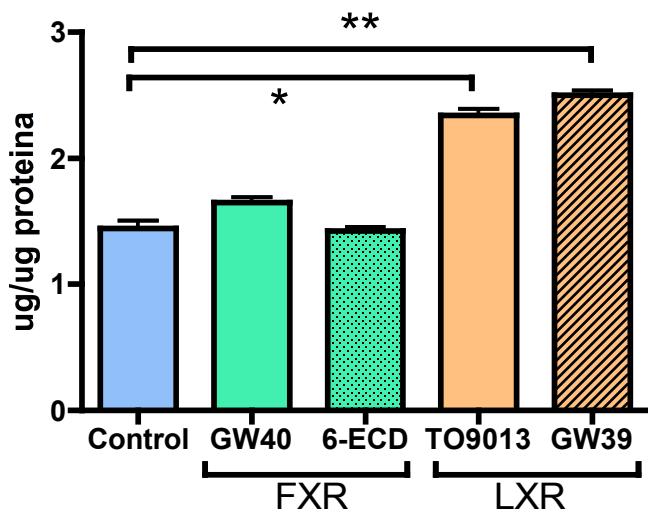


Figura 39. Concentración de triglicéridos en el extracto crudo de membrana tras la activación de FXR o LXR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ con respecto al control

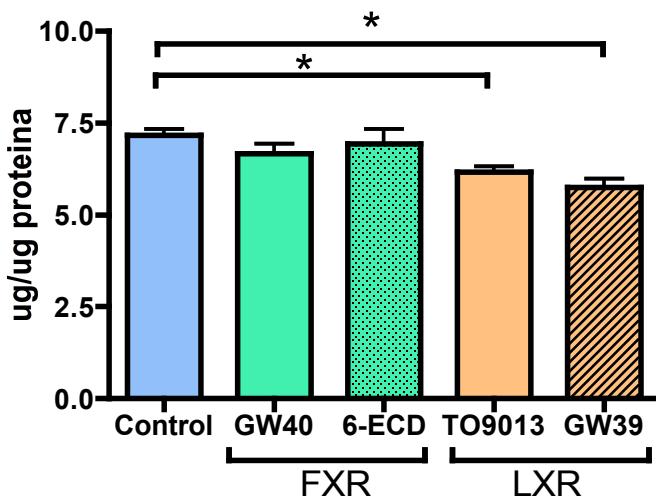


Figura 40. Concentración de colesterol en el extracto crudo de membrana luego de la activación de FXR o LXR. * P<0.05 con respecto al control.

Semejante a lo observado con la tinción de lípidos con Rojo de Nilo, el efecto de los agonistas de LXR está de acuerdo con la literatura, ya que cumple la función de inducir la síntesis de triglicéridos al activar SREBP, y reducir el contenido de colesterol. Esto lo consigue gracias a la regulación, por parte de este receptor nuclear de los transportadores de colesterol de tipo ABC, que son requeridos para cumplir las funciones de LXR en el tejido periférico distinto al hepático. Los cambios en el contenido lipídico de las membranas de las células tratadas con los agonistas de FXR no presentan grandes cambios con respecto a los controles.

2.2.4 FXR y LXR modulan el transporte de Pi en células OK y la expresión de NaPi4.

Para determinar los efectos de la activación de los receptores nucleares FXR y LXR, las células OK fueron tratadas con los diferentes agonistas de ambos receptores, y el transporte de fosfato fue determinado mediante $K_2H^{32}PO_4$, en presencia de sodio. Las células OK fueron incubadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de agonistas de FXR y LXR, para determinar su efecto en el transporte de fosfato. En este experimento se observó que varios agonistas producen una disminución del transporte de Pi sodio dependiente, siendo DMHCA a 7.5 μ M y CDCA a 30 μ M los que tienen

un mayor efecto inhibidor, comparado con el transporte obtenido en las células no tratadas. También se observa que el disolvente DMSO, en el cual están disueltos los agonistas, no presenta ningún efecto en el transporte de Pi a la dilución utilizada de 1:1000.

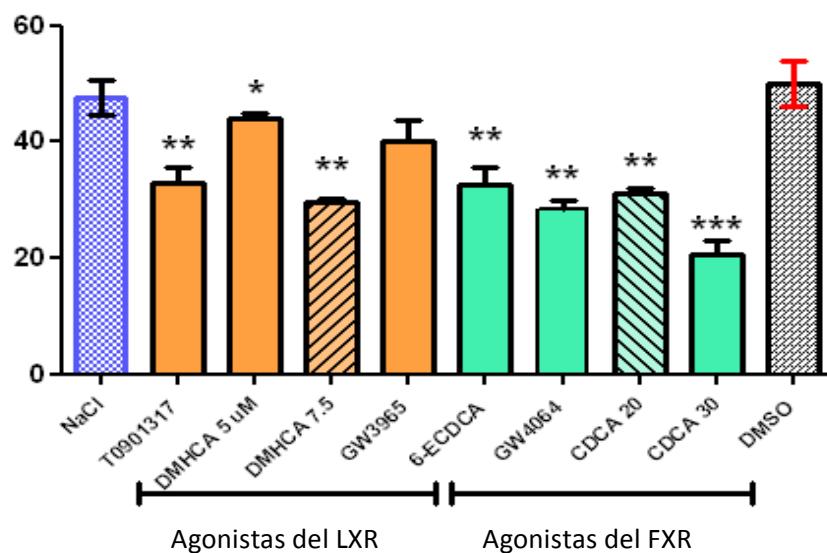


Figura 41. Transporte de Pi en células OK, tras los tratamientos con los diferentes agonistas del LXR y el FXR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, con respecto al control (NaCl en azul)

También se determinó el efecto que tienen estos agonistas en la expresión de NaPi4, que es el principal transportador de fosfato en las células OK. Para ello inicialmente se aislaron BBM de células OK tratadas con los diferentes agonistas, y se determinaron los cambios en la expresión de NaPi4 por medio de WB, como se muestra en la siguiente figura:

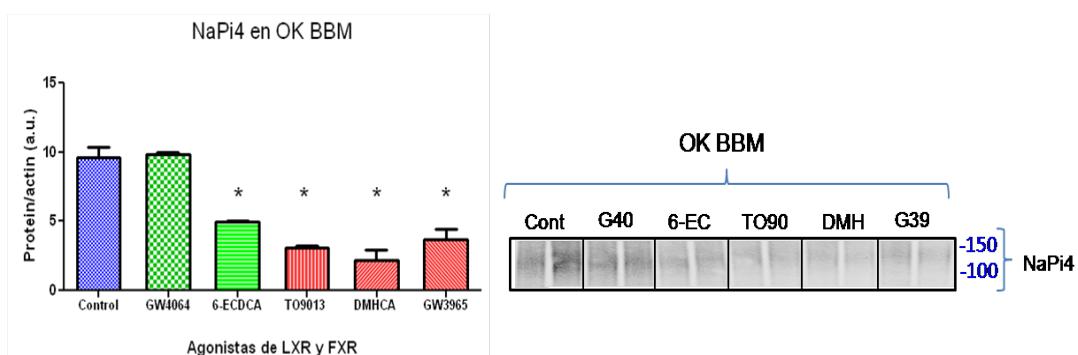


Figura 42. Efecto de los agonistas de FXR y LXR en la expresión del transportador de Pi NaPi4 de las células OK. * $P<0.05$ con respecto al control.

Se observó una reducción en la expresión de NaPi4 en la BBM principalmente con los agonistas del LXR, y un efecto similar sólo observado con el agonista de FXR 6-ECDCA. La reducción en la expresión de NaPi4 por parte de los agonistas de LXR, fue confirmada con técnicas de microscopía inmunofluorescente que se mostraran en el apartado.

5.3. Efectos de los tratamientos agudos con agonistas de FXR y LXR en los transportadores de fosfato de ratón.

Una vez estudiados los efectos de los agonistas de FXR y LXR en el transporte de Pi en las células OK, quisimos determinar si de igual forma la activación de estos receptores nucleares por parte de sus agonistas inducían un cambio en la abundancia o actividad de los transportadores de Pi en tejido de ratón. Dado que estos agonistas son usados habitualmente en diferentes proyectos del laboratorio del Dr. Levi para el estudio de fisiopatologías asociadas a la diabetes, dislipidemia y síndrome metabólico, decidimos usar las mismas dietas, condiciones y dosis ya establecidas en nuestro laboratorio.

Los animales fueron tratados durante cuatro días en el alimento, como se indica en la sección de Materiales y Métodos, con los agonistas DMHCA y 6-ECDCA (denominado también Int-747, por su fabricante *Intercept Pharmaceuticals*). Las BBM fueron entonces aisladas del riñón e intestino de los ratones, y la expresión de los transportadores de Pi fue determinada mediante WB. En el riñón se observó una reducción mínima, aunque significativa, en la expresión de NaPi2a en respuesta al agonista de LXR (Figura 43A). Aún más relevante, vimos un cambio muy significativo en la expresión de los transportadores intestinales de fosfato en las BBM aisladas del íleon de ratón. Los efectos en la reducción del transportador de fosfato intestinal más importante, NaPi2b, fue más pronunciado tras del tratamiento con el agonista de LXR (DMHCA), alcanzando un valor de 83 % ($P<0.01$) comparado con el agonista del FXR (Int-747), que redujo la expresión de NaPi2b en un 61 % ($P<0.05$). Este agonista igualmente redujo la expresión del transportador de fosfato tipo III PiT1 en un 30 % ($P<0.01$) (Figura 43B).

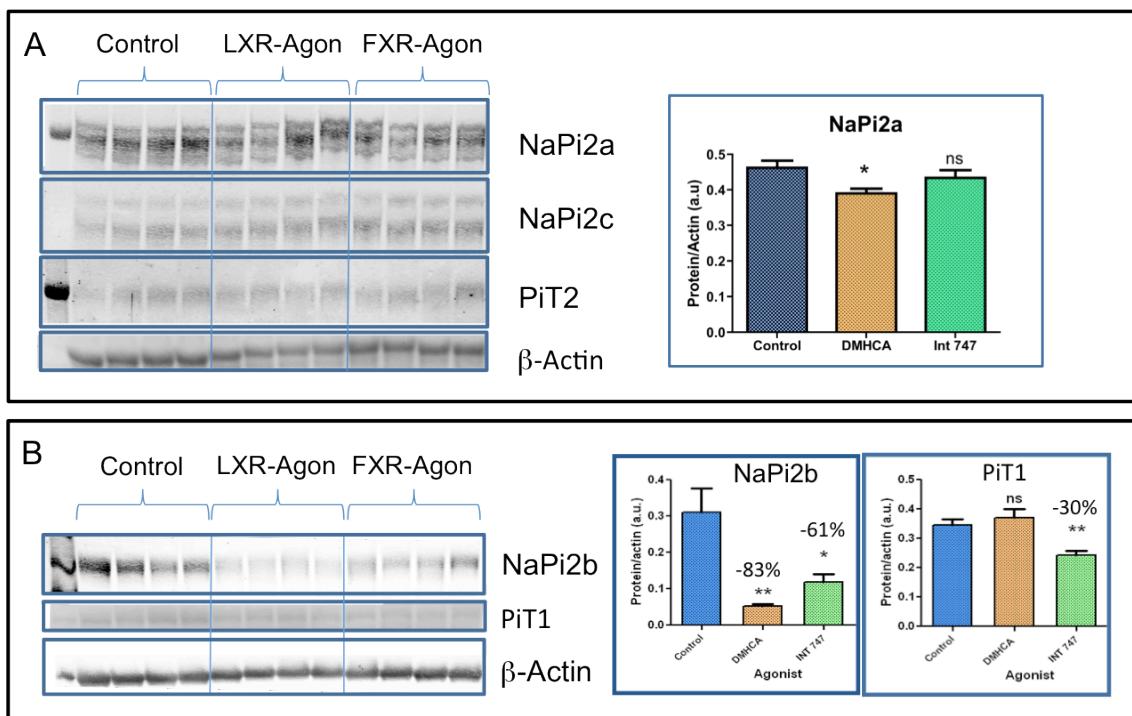


Figura 43. Medida de los cambios de la proteína de los transportadores de Pi expresada en BBM de riñón e íleon de ratón, como respuesta a los tratamiento agudos de los agonistas de LXR y FXR. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, con respecto al control (en azul).

La concentración de Pi en sangre fue determinada en estos tres grupos de ratones, y se observó que bajo condiciones agudas, el agonista de FXR incrementaba en un 34 % (p<0.05) la concentración de Pi en plasma, mientras que no se observaron cambios en la concentración de Pi tras el tratamiento con DMHCA, agonista de LXR (Figura 44).

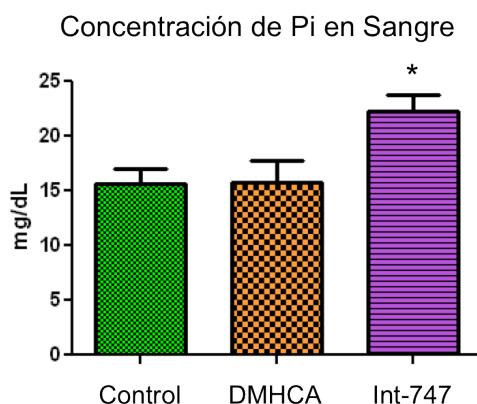


Figura 44. Medida de la concentración de Pi en sangre de ratón, como respuesta a los tratamiento agudos de los agonistas de LXR y FXR. * P<0.05, con respecto al control.

Varios factores nos llevaron a enfocar nuestra investigación exclusivamente en los efectos de los agonistas del LXR en los transportadores de Pi renales e intestinales: 1) Los resultados anteriores que indican una menor expresión de los transportadores de Pi intestinales como resultado del tratamiento con el agonista del FXR. 2) Un incremento de la concentración de Pi en sangre a partir del tratamiento con el agonista del FXR. Además, 3) nuestro laboratorio ha mostrado los efectos positivos de los agonistas de LXR en la disminución de la progresión de la ateroesclerosis en modelos de KO de ratón de ApoE, y LDLR, dada la capacidad del LXR de regular el metabolismo de los lípidos, y de inducir el transporte reverso del colesterol [101]. Estos factores dan una mayor relevancia a la disminución de la expresión de NaPi2b en el intestino por parte de la activación de LXR, ya que esto podría tener un impacto considerable en la disminución del desarrollo de la calcificación vascular y la ateroesclerosis en general.

5.4. Efecto del tratamiento crónico de los agonistas del LXR en los transportadores de fosfato.

A continuación se determinó el efecto del DMHCA en la expresión de los transportadores renales NaPi, y se comparó con el efecto de un segundo agonista más potente de LXR, TO901317 (Figura 45).

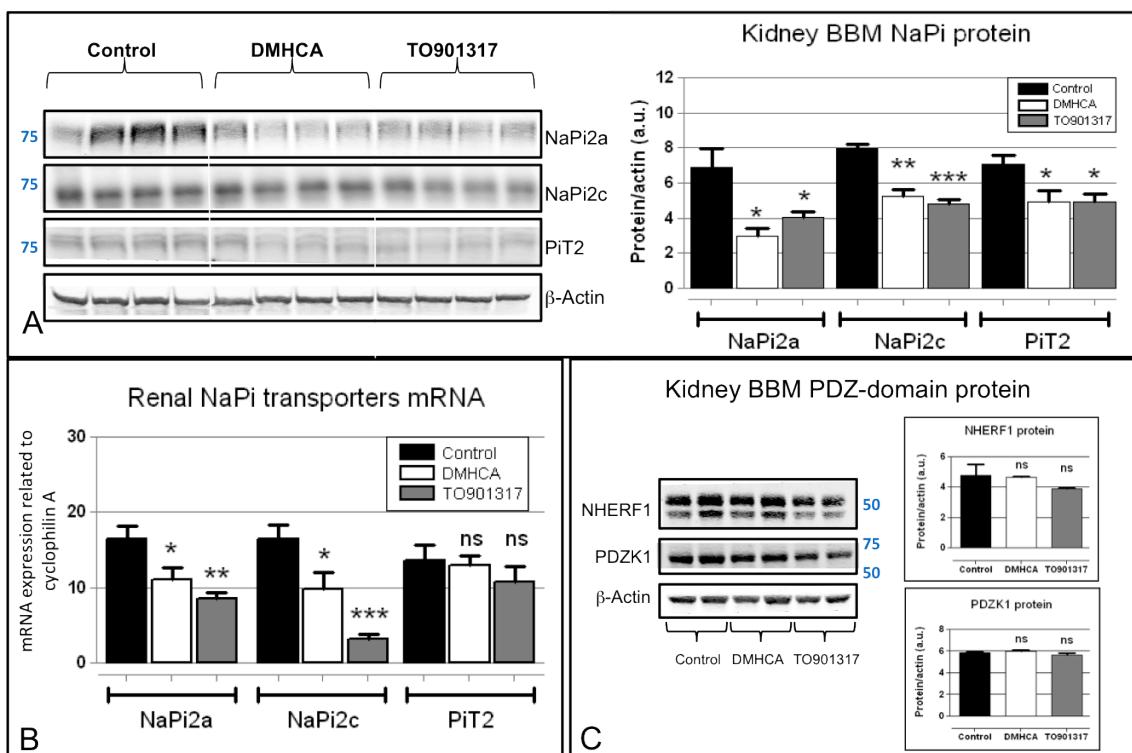


Figura 45. Medida de los cambios de A) la proteína de los transportadores de Pi expresados en BBM de riñón de ratón, B) el ARNm, y C) la proteína de NHERF1 y PDZK1, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, con respecto al control .

En estos experimentos se observó que la expresión de todos los transportadores renales se encontraba disminuida en BBM de riñón de ratón tratados con estos agonistas, y que además estos efectos también se observaban con respecto al ARNm, evidenciando un efecto sobre la transcripción por parte del LXR (Figura 45B).

Dada la relevancia que tienen las proteínas con dominios PDZ (NHERF1 y PDZK1) en la expresión y estabilización de los transportadores renales de Pi de tipo II, también quisimos determinar si se observaba algún cambio en la expresión de estas proteínas. Los resultados fueron negativos, evidenciando una ausencia de efecto (Figura 45C).

Se determinó también la expresión de los transportadores de Pi intestinales en BBM de íleon de ratones tratados con estos agonistas. Los resultados muestran un efecto similar al observado en los transportadores

renales, es decir, una reducción en la expresión de la proteína y RNA de NaPi2b.

Aunque la importancia de las proteínas PDZ en la regulación de NaPi2b no está determinada, se mostró que la abundancia de NHERF1 y PDZK1 no presentaba ningún cambio (Figura 46).

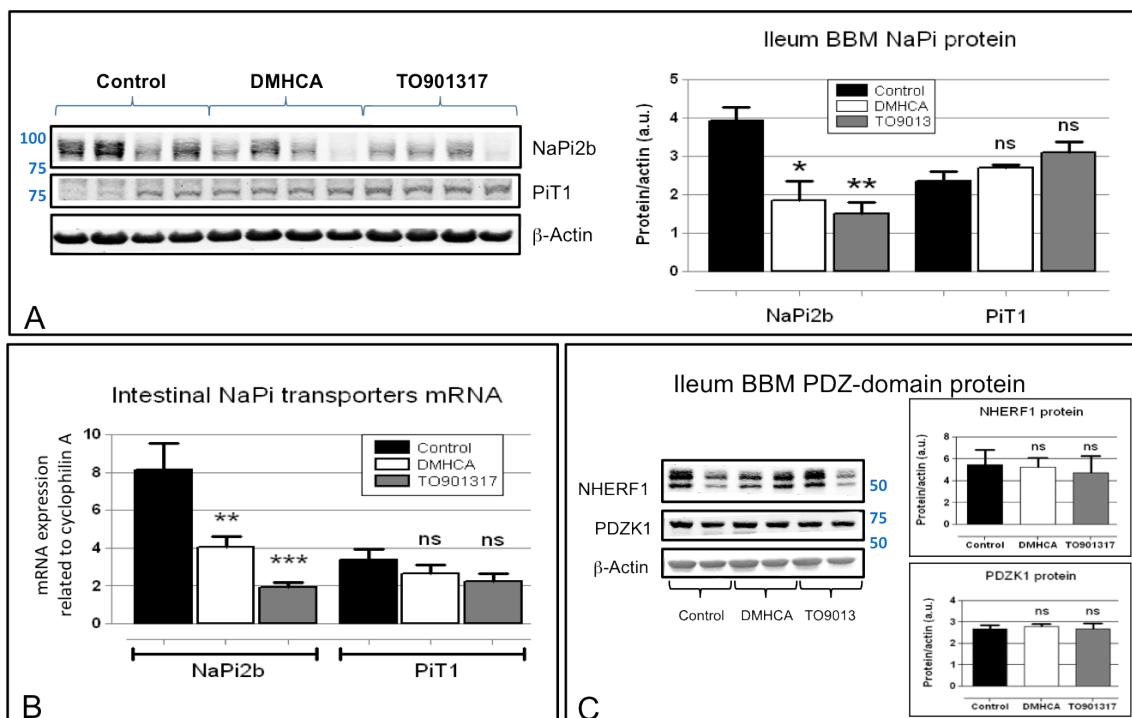


Figura 46. Medida de los cambios de A) la proteína de los transportadores de Pi expresados en BBM de íleon de ratón, B) el ARNm, y C) la proteína de NHERF1 y PDZK1, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, con respecto al control.

Con respecto al transporte de fosfato *in vitro* en vesículas aisladas de BBM de riñón e íleon de animales tratados con DMHCA y TO901317, pudimos determinar una reducción en el transporte de Pi en los dos tejidos, por parte de ambos agonistas (Figura 47). Cabe notar que el efecto inhibidor se ve más pronunciado en el intestino, con una reducción de alrededor del 50% (p<0.05).

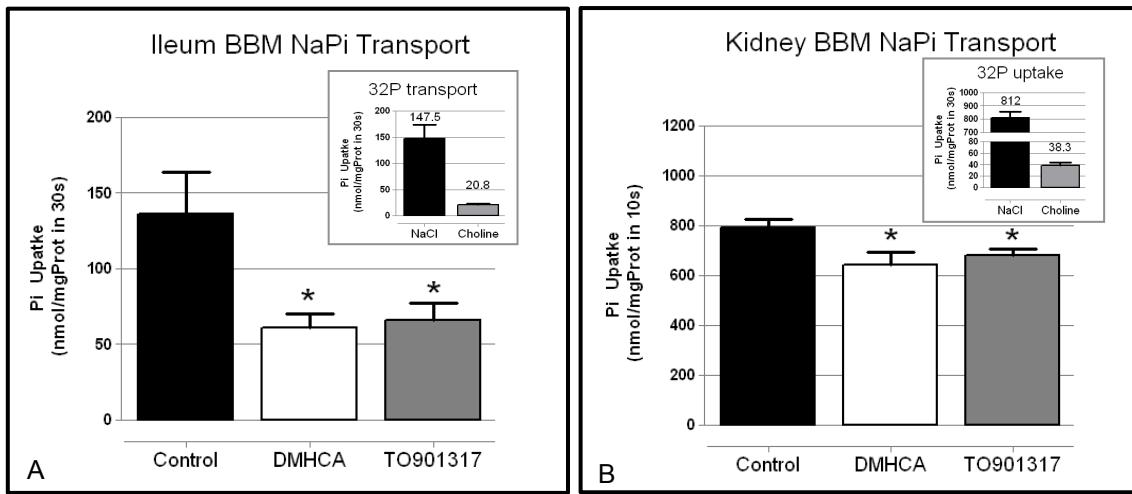


Figura 47. Medida de los cambios de transporte de Pi en A) BBM de íleon de ratón, B) BBM de riñón de ratón, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. * $P<0.05$, con respecto al control.

Dados los resultados sorprendentes en la disminución de la expresión de los transportadores de Pi tanto renales como intestinales, y en el transporte de Pi en estos tejidos, se quiso determinar cuál sería el efecto en la concentración de Pi en sangre y en orina. Estos resultados se muestran en la siguiente figura.

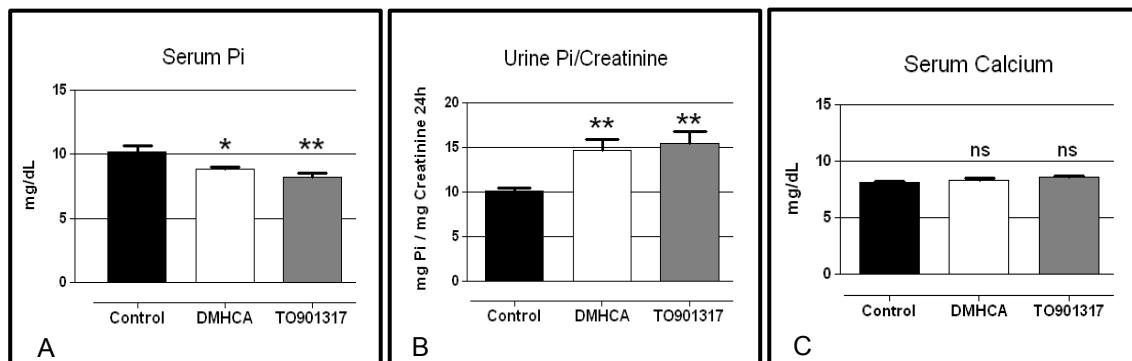


Figura 48. Medida de los cambios de A) Pi en sangre, B) Pi en orina, y C) Ca en sangre, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, con respecto al control.

Como se observa en la figura 48, hay una reducción en la concentración de Pi en sangre provocada por el tratamiento con ambos agonistas, y esto va asociado a un incremento de la excreción de Pi por la orina, lo cual es coherente con la reducción en la expresión de los transportadores de Pi renales. Además, como se mencionaba anteriormente, en la homeostasis de Pi

participan varios factores hormonales que son importantes en la regulación de los transportadores de Pi. Por ende se determinó la concentración de FGF23 y PTH en sangre, dada la importante función que tienen en mantener esta homeostasis (Figura 49).

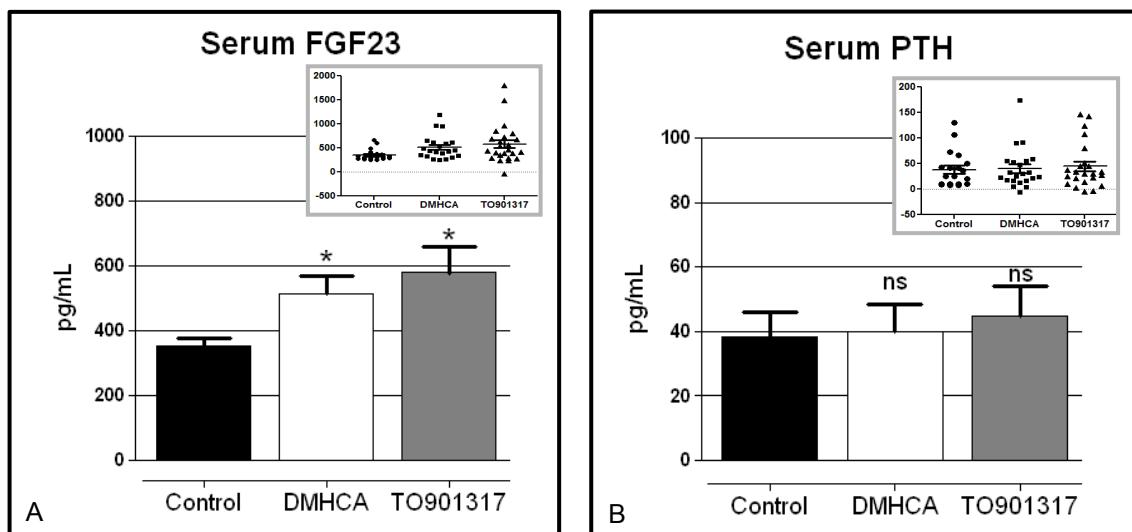


Figura 49. Medida de los cambios de A) FGF23 en sangre, y B) PTH en sangre, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * P<0.05, con respecto al control .

Al observar el incremento de FGF23 en sangre inducido por los agonistas de LXR, y teniendo en cuenta que esta hormona es expresada en el hueso (osteocitos), quisimos determinar si los efectos observados en riñón e intestino eran debidos a la activación de este receptor nuclear en estos tejidos, o simplemente un efecto indirecto como consecuencia del incremento en la síntesis de FGF23. Para ello, se analizaron en primer lugar, los cambios en la expresión de ARNm de varios de los genes diana conocidos de este receptor nuclear (Figura 50), tanto en riñón como en intestino.

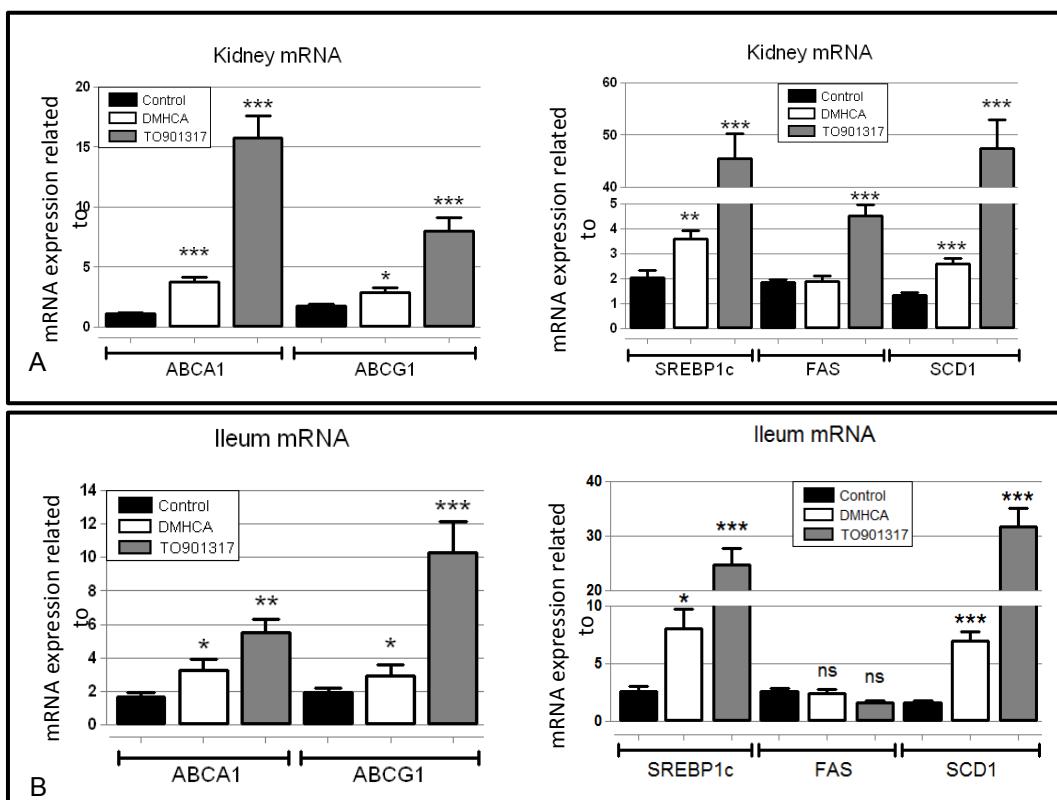


Figura 50. Medida de los cambios de ARNm de A) los genes diana de LXR en riñón de ratón, y B) los genes diana de LXR en íleon de ratón, como respuesta a los tratamientos crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001 con respecto al control.

De acuerdo a lo descrito en la literatura, se observó un incremento en la expresión de los transportadores de colesterol ABCA1 and ABCG1 tanto en riñón como en el intestino delgado. Éstos, en parte, son los responsables de los efectos positivos en la activación farmacológica del LXR, ya que modulan el proceso de excreción del exceso de colesterol por parte de la célula y son así parte fundamental del transporte reverso del colesterol. Sin embargo, la activación experimental del LXR también está asociada a la activación del factor de transcripción más importante en la regulación del metabolismo lipídico, el SREBP1c, que es el denominado regulador fundamental de la síntesis de lípidos. La activación de SREBP1c es inducida por el compuesto TO901317, lo cual coincide con la literatura. Ello provocó la síntesis farmacológica de nuevos compuestos como el DMHCA, que presentan una mayor homología estructural con los ligandos naturales del LXR, los oxiesteroles. Como se observa en la figura anterior, los efectos en la activación

de SREBP1c, y por ende en las proteínas que éste a su vez regula (FAS y SCD1), son mucho menores con el compuesto DMHCA que con el compuesto TO901317. Por ello, últimamente el activador DMHCA se viene utilizando mucho más frecuentemente en el estudio de LXR, al tener la capacidad de inducir el transporte reverso del colesterol sin incrementar lipogénesis. Estos resultados fueron observados tanto para el ARNm como de la proteína, por medio de WB y microscopía fluorescente, en tejido de riñón e intestino delgado (Figura 51).

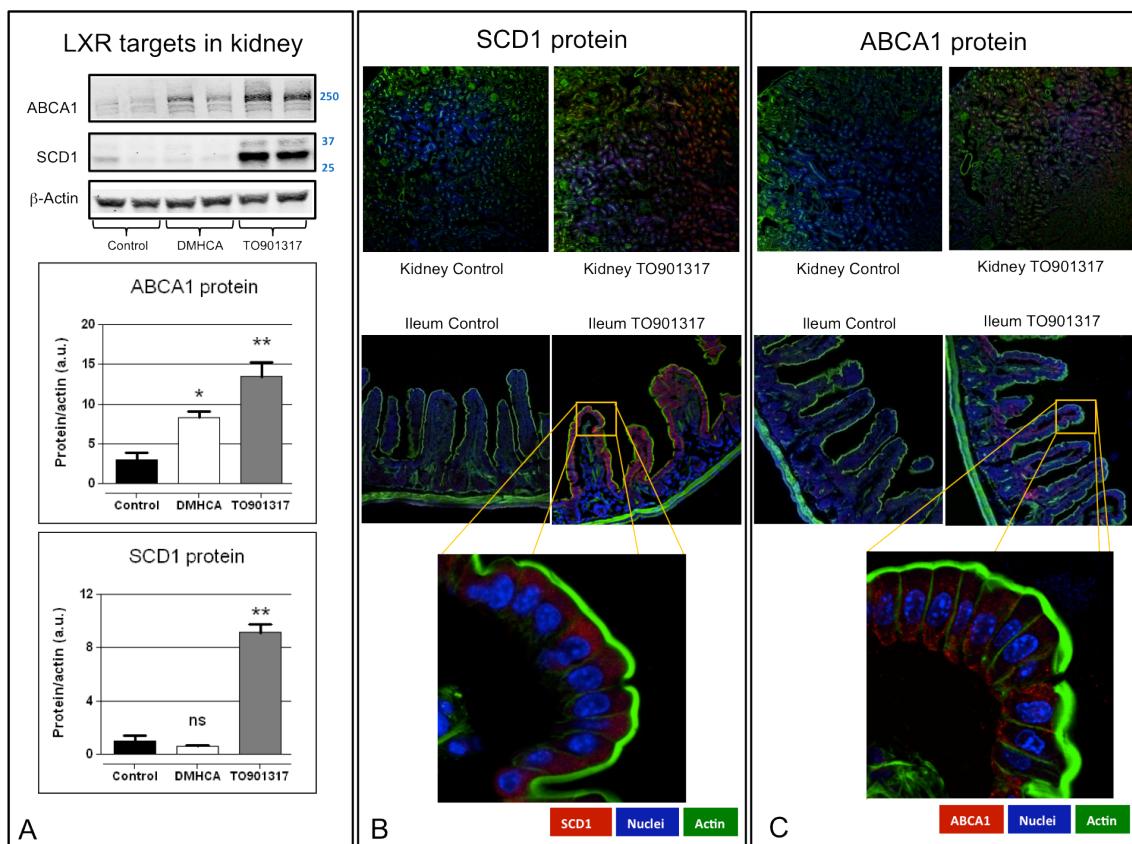


Figura 51. Medida de los cambios de A) proteína de ABCA1 y SCD1 en riñón de ratón por medio de WB, B) expresión de SCD1 en riñón e íleon de ratón por IF, y C) expresión de ABCA1 en riñón e íleon de ratón por IF, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * P<0.05, ** P<0.01, con respecto al control.

Los resultados obtenidos en ratón fueron corroborados a continuación en el modelo celular de OK. Se observó la activación de LXR e inhibición del transporte de Pi, con una disminución paralela en la expresión del transportador de Pi, NaPi4. Se llevó a cabo también un estudio de relación

dosis-respuesta (Figura 52), observando un efecto claro de ambos agonistas en estas células sobre el transporte de Pi.

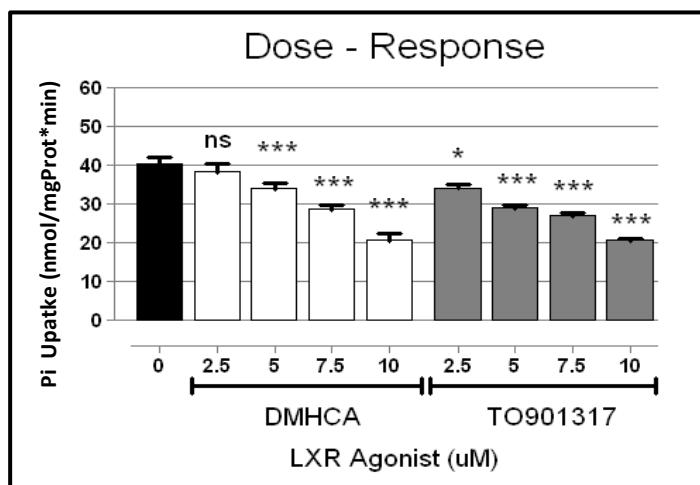


Figura 52. Relación dosis-respuesta entre los agonistas del LXR y el efecto en el transporte de Pi en células OK. ns= no significativo, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, con respecto al control.

Como la disminución del transporte de Pi parece estar mediada, en gran parte, por la disminución en la expresión del transportador NaPi4, el efecto sobre este transportador fue estudiado mediante WB y microscopía fluorescente con BBM aisladas de células OK tratadas con ambos agonistas por 24 horas (Figura 53).

Para determinar la especificidad de los efectos de los agonistas sobre el transporte de Pi, en ambos tejidos estudiados medimos también la expresión de los transportadores de Na/Glucosa SGLT1 en BBM de íleon, y SGLT2 en BBM de riñón. De esos experimentos concluimos que el compuesto TO901317 es también capaz de modificar la expresión de SGLT2 en riñón (Figura 54), pero no se observa ningún cambio en la expresión del SGLT1 intestinal.

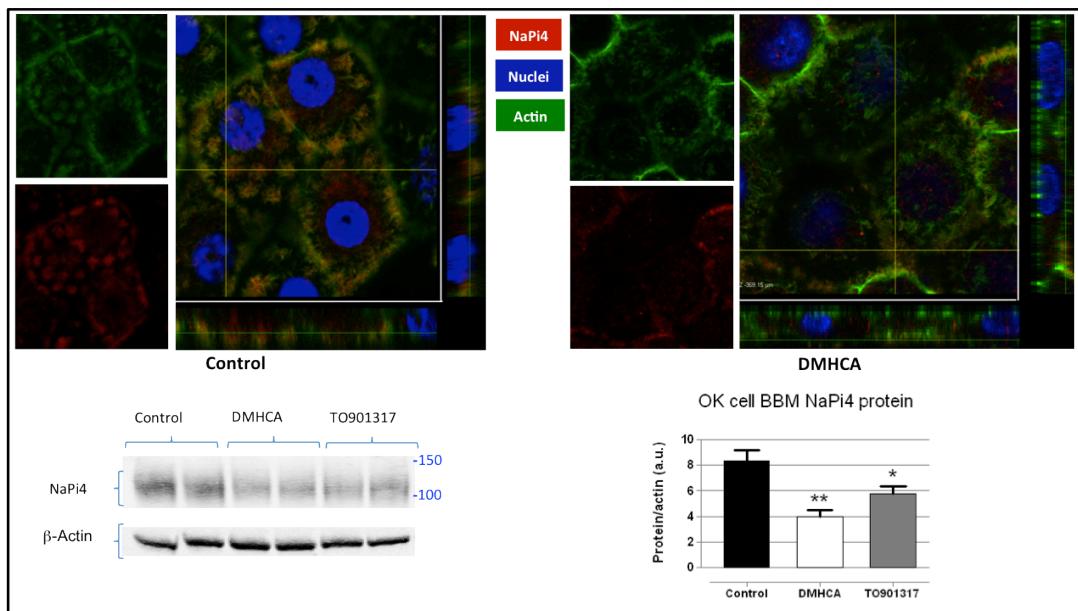


Figura 53. Cambios en la expresión de NaPi4 en células OK, medidos por WB en BBM de células OK y confirmado por IF, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, con respecto al control.

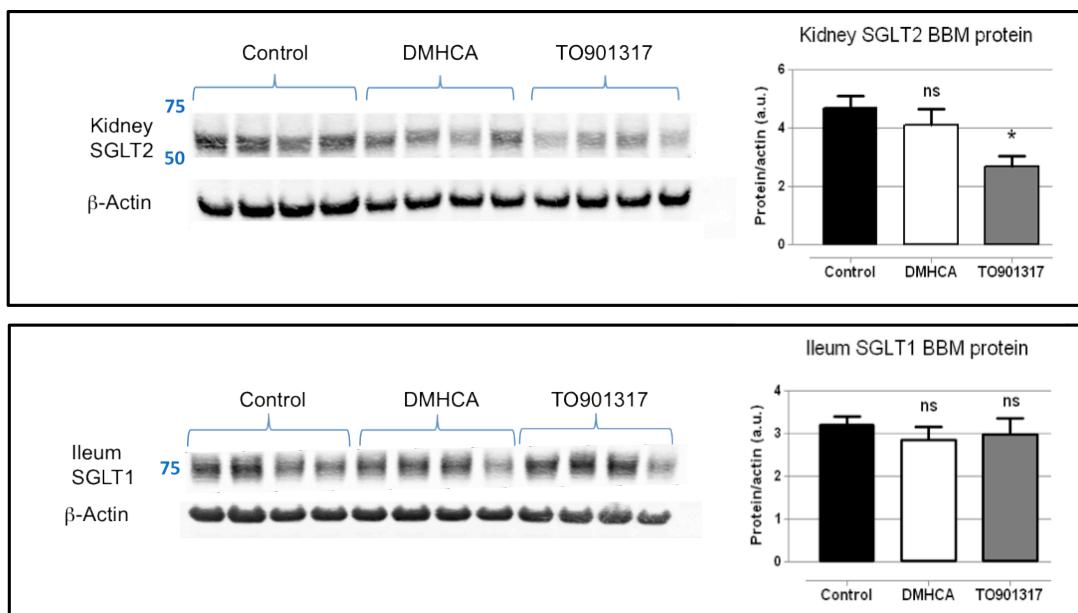


Figura 54. Medida de los cambios de A) la proteína del transportador de glucosa SGLT2 expresado en BBM de riñón de ratón, y B) la proteína del transportador de glucosa SGLT1 expresado en BBM de íleon de ratón, como respuesta a los tratamiento crónicos de los agonistas de LXR. ns= no significativo, * $P<0.05$, con respecto al control.

5.5. Publicaciones generadas de este apartado

Liver X Receptor-Activating Ligands Modulate Renal and Intestinal Sodium Phosphate Transporters
Kidney Int. 2011 Sep;80(5):535-44.

Abstract:

Cholesterol is pumped out of the cells in different tissues, including the vasculature, intestine, liver, and kidney, by the ATP-binding cassette transporters. Ligands that activate the liver X receptor (LXR) modulate this efflux. Here we determined the effects of LXR agonists on the regulation of phosphate transporters. Phosphate homeostasis is regulated by the coordinated action of the intestinal and renal sodium-phosphate (NaPi) transporters, and the loss of this regulation causes hyperphosphatemia. Mice treated with DMHCA or TO901317, two LXR agonists that prevent atherosclerosis in ApoE or LDLR knockout mice, significantly decreased the activity of intestinal and kidney proximal tubular brush border membrane sodium gradient-dependent phosphate uptake, decreased serum phosphate, and increased urine phosphate excretion. The effects of DMHCA were due to a significant decrease in the abundance of the intestinal and renal NaPi transport proteins. The same effect was also found in opossum kidney cells in culture after treatment with either agonist. There was increased nuclear expression of the endogenous LXR receptor, a reduction in NaPi4 protein abundance (the main type II NaPi transporter in the opossum cells), and a reduction in NaPi co-transport activity. Thus, LXR agonists modulate intestinal and renal NaPi transporters and, in turn, serum phosphate levels.

6. MODELO CELULAR PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES.

A diferencia del riñón, para el que contamos con la línea celular OK como modelo renal de transporte de Pi, el estudio de la regulación de los transportadores intestinales de Pi se ha visto muy limitado por la falta de un modelo celular que presente características de transporte similares al del intestino:

- Membrana epitelial con presencia de BBM.
- Expresión de los transportadores de fosfato.
- Transporte de Pi *in vitro*.
- Regulación similar.

En esta tesis doctoral se ha intentado identificar y caracterizar un modelo celular que presente dichas propiedades, y que además permita estudiar la biología de los transportadores intestinales NaPi, y cómo éstos son regulados por diferentes mecanismos, entre ellos los receptores nucleares. Para lograr esto se probaron diferentes modelos celulares; entre ellos los de intestino de rata IEC-6 (*Intestinal Epethelial Cells clone 6*) proveniente de duodeno/yejuno de rata, y IEC-18 proveniente de íleon de rata [102]. También las células CaCo-2 (adenocarcinoma epitelial colorectal) que fueron inicialmente caracterizadas para el transporte de fosfato intestinal por el grupo del profesor Murer [103], y por último la línea CaCo-2_{BBE}. Estas últimas consisten en un subclón de las CaCo-2, obtenidas por el laboratorio del profesor Mooseker en 1992 [104]. Ellos determinaron que estas células forman una monocapa densa, en la cual las células se diferencian completamente y presentan una abundante BBM (Figura 55). Además, se ha demostrado que estas células presentan diversas características de enterocitos [105].

Dadas estas características, y la importancia de poder estudiar las interacciones de los transportadores de fosfato *in vivo*, se comprobó que, tras la transfección con un plásmido que codificaba el transportador de fosfato

NaPi2b-eGFP, las células CaCo-2_{BBE} expresan dicho transportador en la BBM (Figura 56).

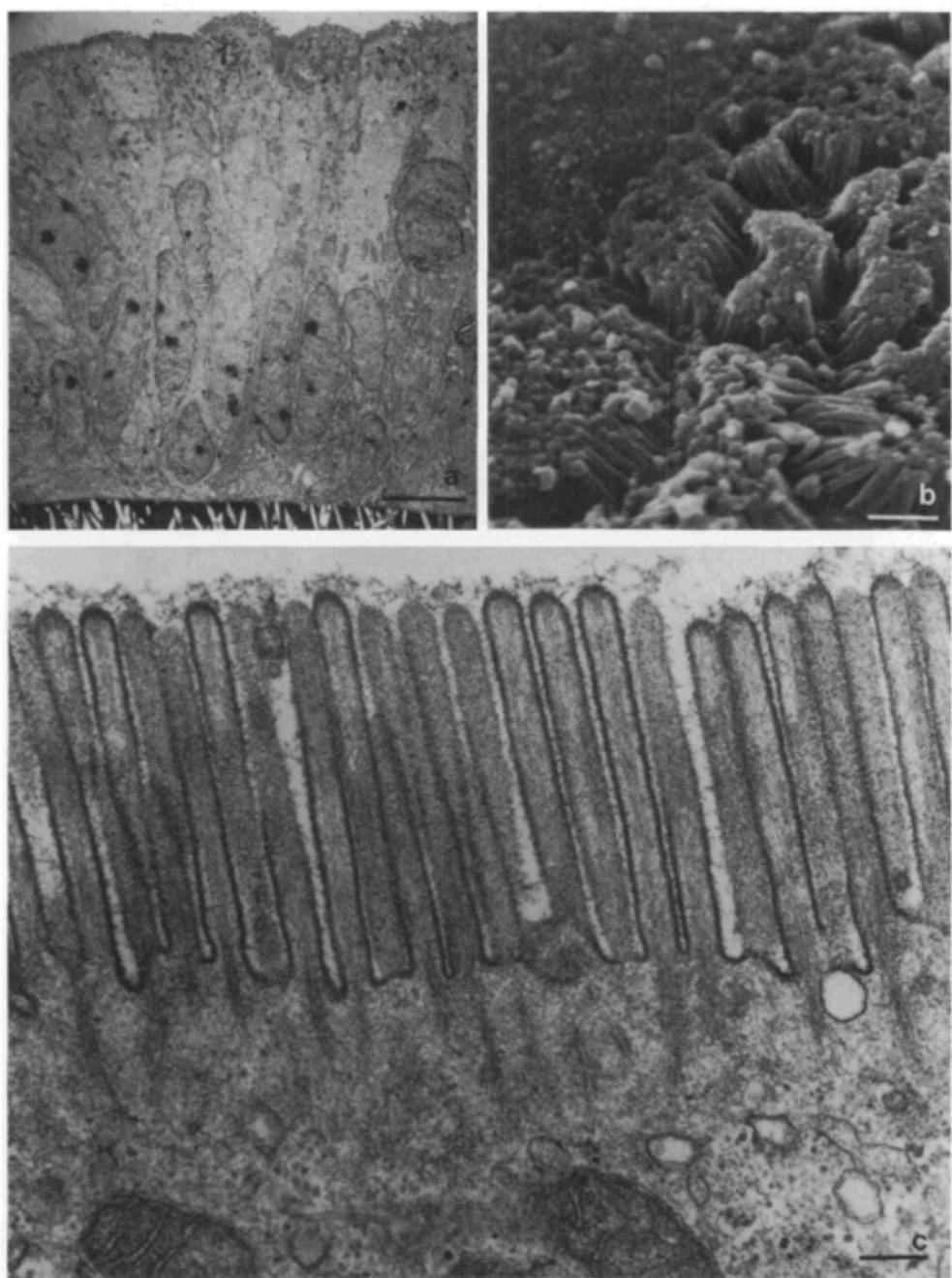


Figura 55. Micrografía electrónica de barrido, en las que se muestra una densa BBM en las células CaCo-2_{BBE}. [104]

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se observó que, efectivamente, las células presentan unas densas microvellosidades, aunque la expresión de NaPi2b endógeno principalmente se observa en localización

subapical (Figura 57). De igual forma, la expresión del NaPi2b endógeno en estas células se determinó mediante *western-blot* (Figura 58).

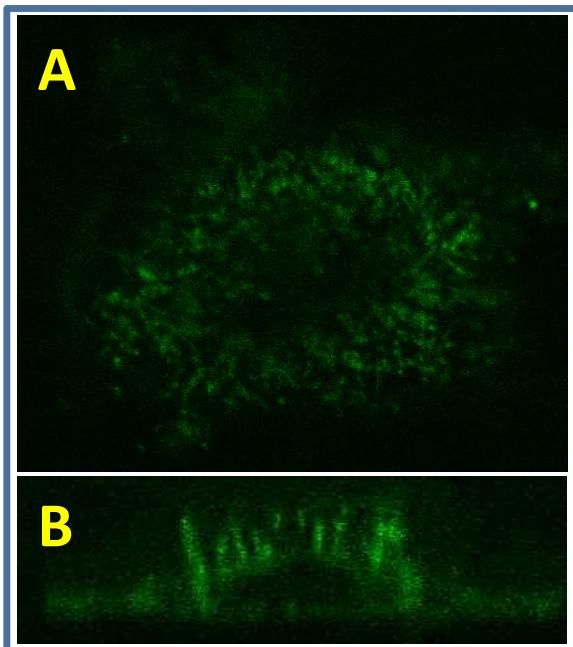


Figura 56. A) Imagen confocal de las células CaCo-2_{BBE} en las que se muestra la expresión de NaPi2b-eGFP en la BBM. B) Perfil de los ejes ZX en la que claramente se observan las microvellosidades.

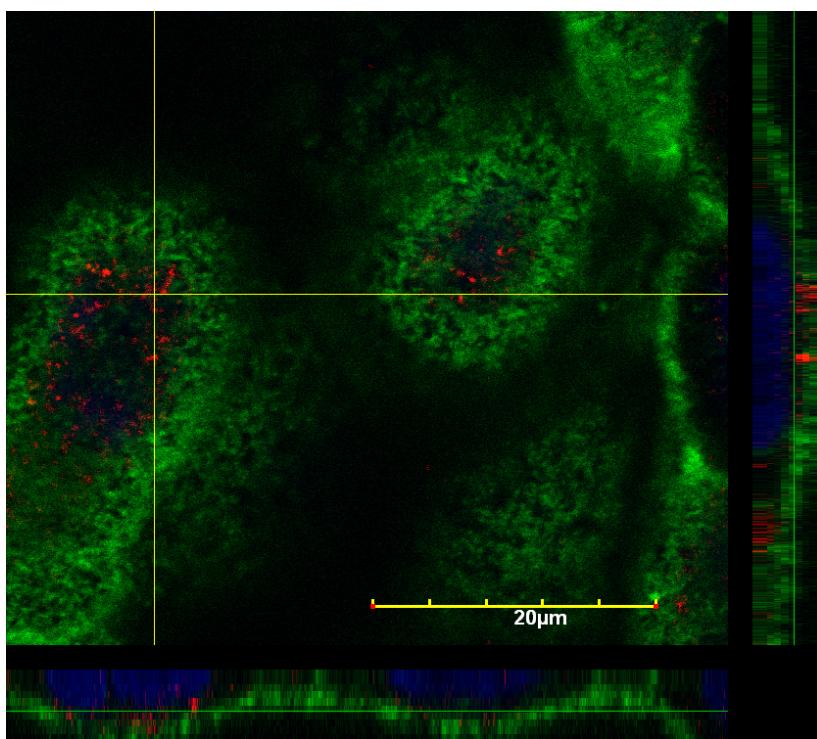


Figura 57. Imagen confocal de las células CaCo-2_{BBE} en las que se muestra por inmunofluorescencia la expresión de NaPi2b endógeno (rojo). En verde, actina, y núcleo azul.

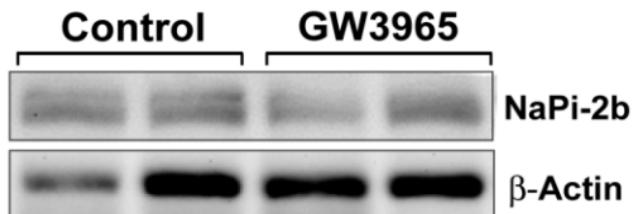


Figura 58. *Western-blot* de NaPi2b endógeno en células CaCo-2_{BBE}

Mediante experimentos de transporte de fosfato radioactivo (³²P), se pudo determinar que al igual que en las células OK, estas células intestinales presentan un transporte de fosfato sodio-dependiente, y una acumulación de Pi sodio-independiente en condiciones normales (medio de incubación con 1 mM de Pi) (Figura 59). El transporte Na-dependiente no es constante, sino que es de aparición progresiva comenzando a partir de los 20 minutos, lo cual hace sospechar de que se trate de un artefacto experimental. Los experimentos se realizaron en células post-confluentes (14 días) totalmente diferenciadas, constituyendo una monocapa con una alta densidad de domos. Para alcanzar este grado de diferenciación fue requerido el uso de medio DMEM rico en suero fetal bovino (20 %), el cual se cambió cada dos días.

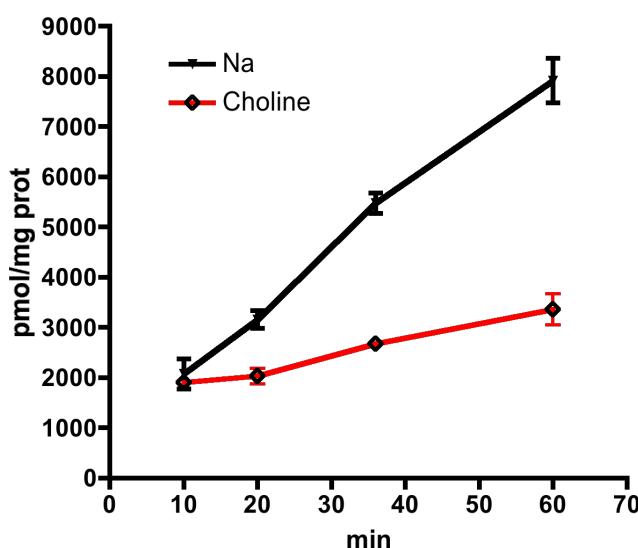


Figura 59. Transporte de Pi a 50 μ M y en función del tiempo, en células CaCo-2_{BBE} post-confluentes en las que se muestra un incremento progresivo de la acumulación de Pi en presencia de sodio (negro) y en ausencia de sodio (rojo).

Aunque se determinó que estas células pueden presentar un componente sodio dependiente en el transporte de Pi, como ya hemos

mentionado, este componente se hace más notable a partir de los 30 minutos de incubación, tiempo que consideramos que es de excesiva duración, ya que el medio sin sodio no es un medio fisiológico, de modo que la monocapa se ve comprometida, e incluso se desprende con facilidad. Para evitar este inconveniente experimental limitamos los tiempos de transporte a 20 minutos, durante el cual el transporte sodio dependiente es prácticamente mínimo (Figura 60).

Ya que en resultados preliminares no se observó adaptación en estas células a concentraciones bajas de Pi, en esta tesis sólo se estudió la adaptación a alto fosfato; así, inicialmente las células se incubaron durante 24 horas a diferentes concentraciones de fosfato: 1 mM (control), 2 mM y 4 mM (Figura 60). Bajo estas condiciones se midió el transporte con ^{32}P en presencia de Na^+ (representado en rojo) o ausencia de Na^+ (verde), usando NaCl o cloruro de colina a una concentración de 137 mM. Para determinar el componente mediado por transportadores de Pi de tipo II, la incubación se realizó también en presencia ácido fosfonofórmico a 5 μM (PFA, indicado en color azul; Figura 60), pero también en ausencia de Na. Llama la atención que, además de la lógica inhibición del componente Na-dependiente, el PFA también inhibió la toma Na-independiente de Pi.

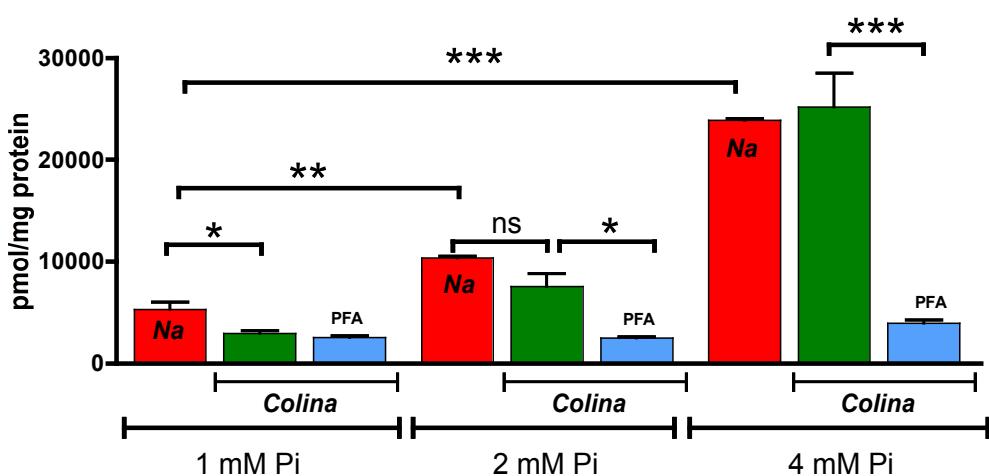


Figura 60. Experimento de adaptación de las células CaCo-2_{BBE} a diferentes concentraciones de Pi en medio de cultivo durante 24 horas. El transporte se midió durante 20 minutos en presencia y ausencia de Na, más PFA en ausencia de Na. Los valores obtenidos por inhibición de PFA en presencia de Na no se representan en la figura, al ser similares a los representados en azul.

Con gran sorpresa se pudo observar que las células presentan una adaptación considerable a altas concentraciones de Pi en forma de incremento del transporte, pero llama la atención que a medida que se incrementa la concentración de Pi, el poco transporte sodio dependiente observado se pierde, y aún más, en células adaptadas a Pi 4 mM se presenta un transporte de Pi muy alto, pero independiente del contenido de sodio. Este incremento de transporte es, además, inhibido completamente por PFA en ambos casos, en presencia y ausencia de sodio (colina). Además, la adaptación a Pi 4 mM se incrementa con el tiempo, de modo que es mayor a las 48 h, 72 h y hasta 4 días de tratamiento (Figura 61), presentando un valor aún más elevado en el transporte sodio independiente. Ello hace pensar en la existencia de un nuevo transportador aún por identificar. Este transportador presentaría características muy particulares como son: sodio independencia, inhibición por PFA, y transporte a altas concentración de fosfato en el rango medio-alto milimolar, lo cual es más próximo a las concentraciones de Pi fisiológicas encontradas en el lumen del intestino [106]

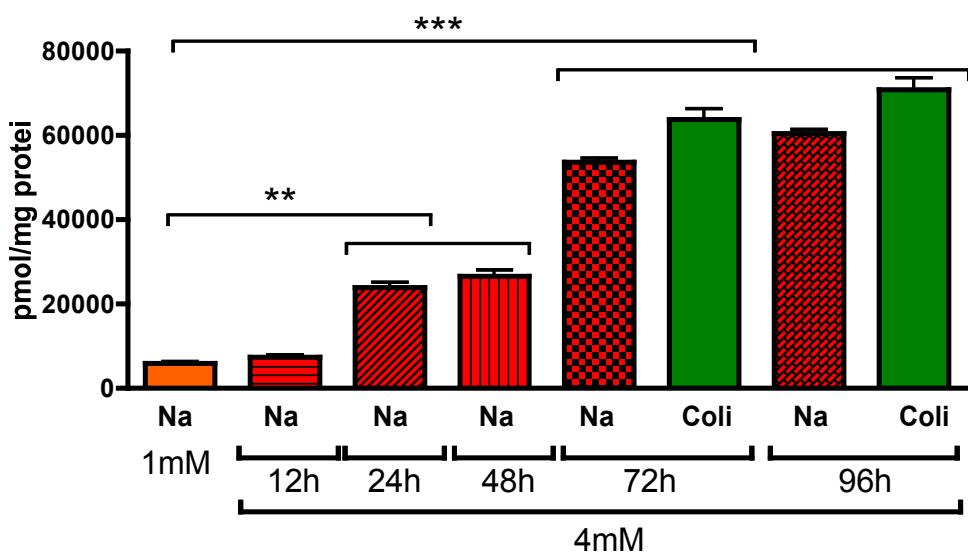


Figura 61. Transporte de Pi en las células CaCo-2_{BBE} tras ser adaptadas con Pi 4 mM durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Los valores son comparados con células control mantenidas a Pi 1 mM.

Con la idea de tratar de identificar la naturaleza de este transportador, las características cinéticas del transporte expresado fueron también determinadas en experimentos de saturación de sustrato (Pi). En células control, es decir, no adaptadas (figura 62), el transporte en presencia de sodio

proporcionó una K_m de $89,0 \pm 28,3 \mu\text{M}$ y V_{max} de $0.28 \pm 0.04 \text{ nmoles por miligramo de proteína y por minuto}$, mientras que el sodio-independiente mostró una K_m de $51,6 \pm 9,4 \mu\text{M}$ y una V_{max} de 0.19 ± 0.02 . El componente Na-dependiente, es decir, la diferencia entre Na y colina, no pudo ser caracterizado en ningún experimento, ya que ningún ajuste proporcionó constantes cinéticas con sentido fisiológico. Esto apoya la idea de que se trata de un artefacto experimental debido a la ausencia de Na durante transportes por encima de 30 minutos, a pesar de que en ambos casos el movimiento de Pi es neto hacia el interior celular (velocidad inicial, Fig. 59).

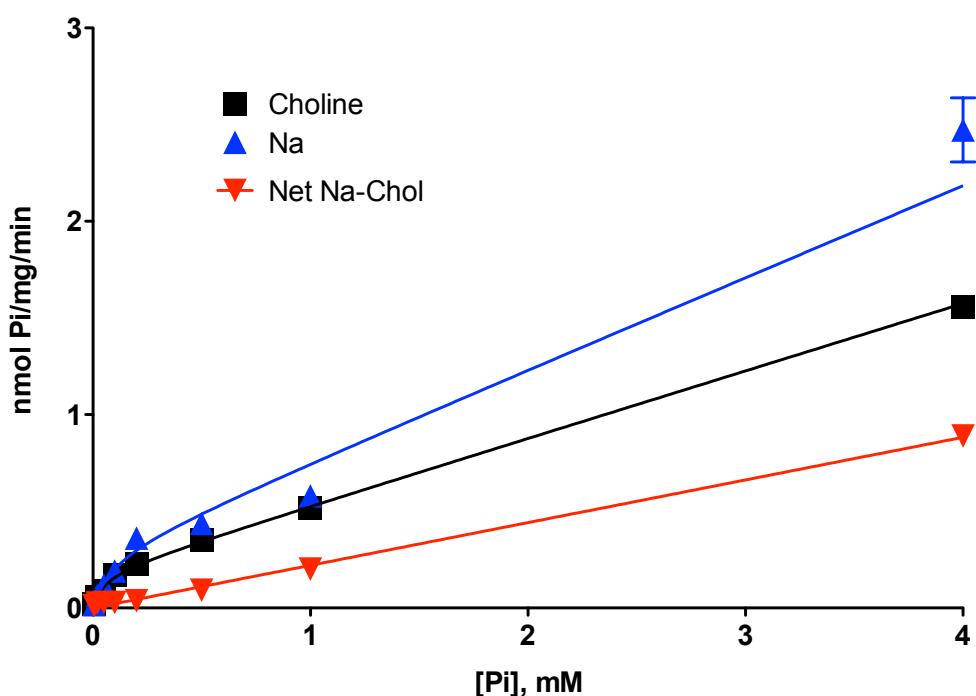


Figura 62. Cinéticas de saturación de Pi en las células CaCo-2_{BBE} bajo condiciones normales (Pi 1 mM). En color azul se representa el transporte en presencia de Na, y en color negro el transporte sodio independiente. En color rojo, el valor neto teórico, Na-dependiente.

En células incubadas en medio de cultivo con Pi a 4 mM durante 48 horas, las curvas obtenidas de saturación de sustrato se muestran en la figura 63. En este caso, las constantes obtenidas mostraron un considerable incremento de más de 10 veces en la V_{max} , mientras que la afinidad mostró una disminución aproximada de tres veces debido al incremento de las K_m . Así, en presencia de Na la K_m fue de $254.5 \pm 33.4 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $3,12 \pm$

0.35 nmol Pi/ mg/min, mientras que en ausencia de Na la Km fue de 206,5 +/- 32,7 μ M, y una Vmax= 2.61 +/- 0.34 nmol Pi/ mg/min.

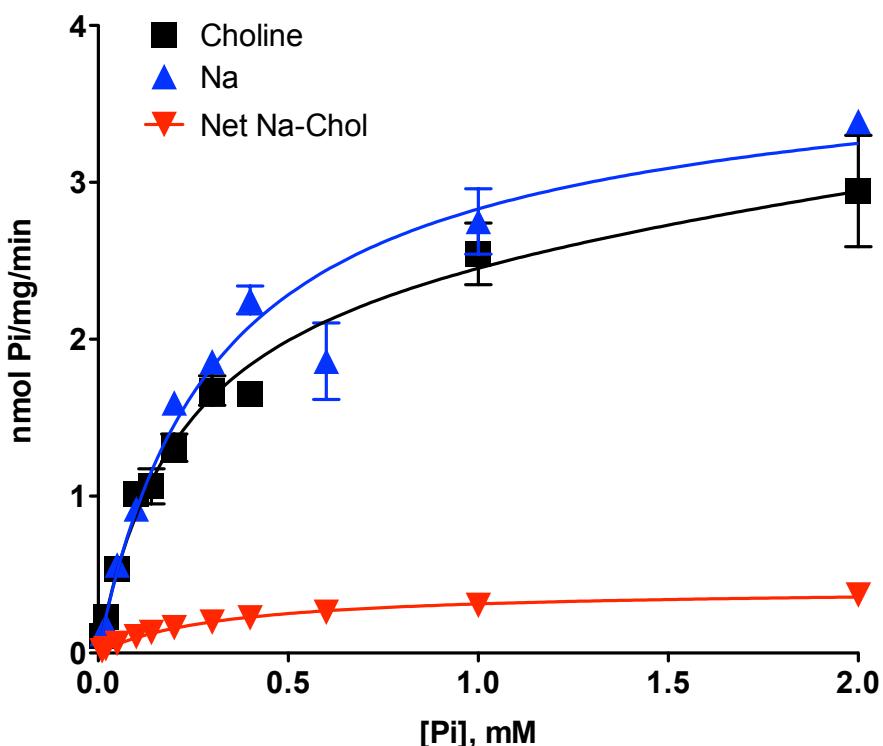


Figura 63. Cinéticas de saturación de Pi en las células CaCo-2_{BBE} adaptadas a Pi 4 durante 48 horas. En color azul se representa el transporte en presencia de Na, en color negro el transporte sodio independiente (en presencia de colina) y en color rojo el transporte neto teórico, Na-dependiente.

La diferencia de afinidades en el transporte de Pi observado en células incubadas con Pi a 1 y 4 mM sugiere que se trata de sistemas de transporte diferentes, aunque es principalmente llamativo la capacidad de transporte en células adaptadas a 4 mM. Así preliminarmente se intentó medir el efecto inhibitorio de varios sustratos con el fin de determinar un patrón de inhibición en estas células luego de ser adaptadas a 4 mM de Pi (Figura 64), y estos resultados contrastan con los obtenidos en células control (Figura 65).

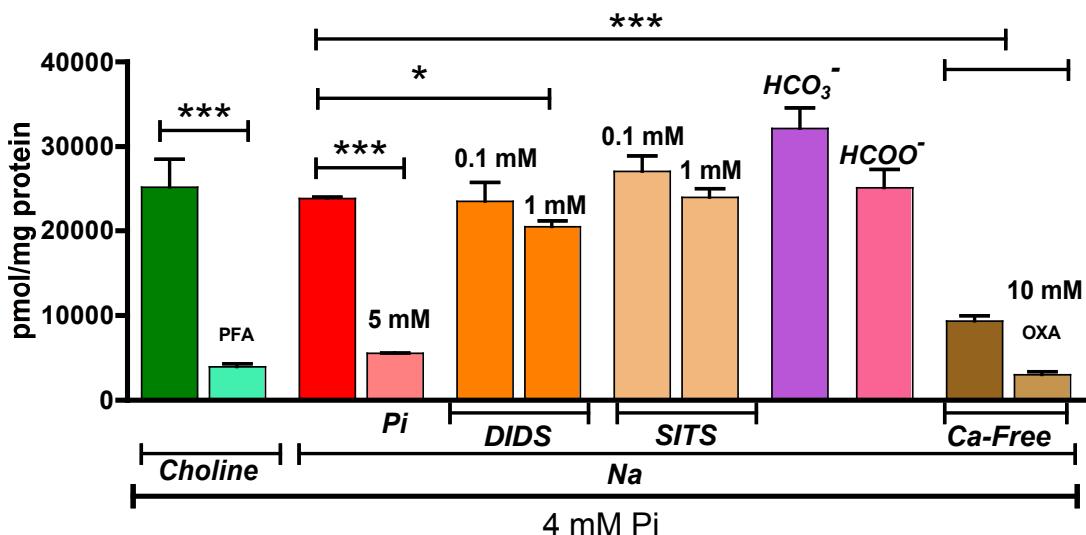


Figura 64. Experimentos de inhibición en células CaCo-2_{BBE} adaptadas a 4 mM de Pi durante 48 horas. En color verde se representa el transporte en ausencia de Na y la inhibición con PFA. El resto de las inhibiciones se realizaron en presencia de Na. Las dos barras en color café se realizaron en ausencia de Ca, al substituirse en la solución de transporte por cantidades equimolares de Mg para mantener la osmolaridad.

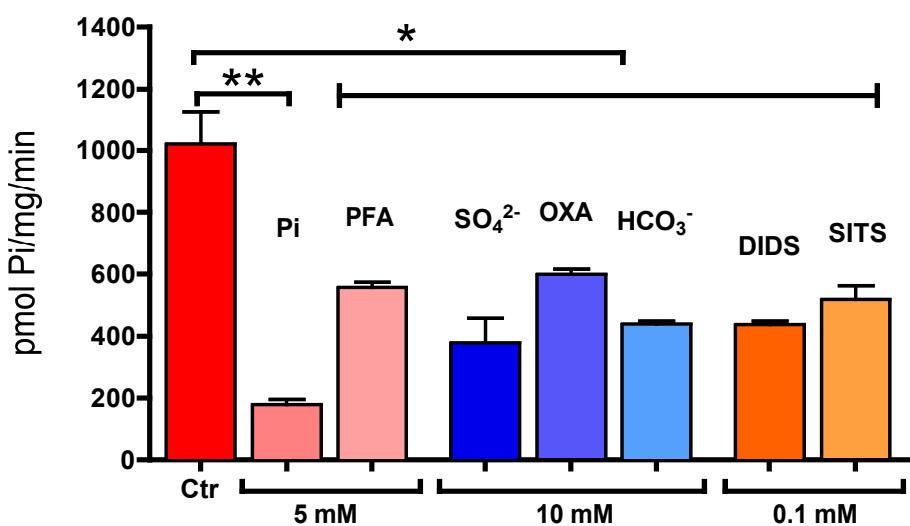


Figura 65. Experimentos de inhibición en células CaCo-2_{BBE} control. Todos los experimentos se realizaron en presencia de Na. En color rojo se representan los resultados de las células control.

Este trabajo se ha continuado con la identificación molecular de los sistemas de transporte de Pi Na-independientes observados en células CaCo-2_{BBE}, pero queda fuera de la presente tesis doctoral, y se está llevando a cabo en la actualidad en el laboratorio del Dr. Sorribas por personal diferente.

6.1. Publicaciones generadas asociadas a este apartado

NHE3 regulatory factor 1 (NHERF1) modulates intestinal sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-2b) expression in apical microvilli

J Biol Chem. 2012 Oct 12;287(42):35047-56

Abstract:

P(i) uptake in the small intestine occurs predominantly through the NaPi-2b (SLC34a2) co-transporter. NaPi-2b is regulated by changes in dietary P(i) but the mechanisms underlying this regulation are largely undetermined. Sequence analyses show NaPi-2b has a PDZ binding motif at its C terminus. Immunofluorescence imaging shows NaPi-2b and two PDZ domain containing proteins, NHERF1 and PDZK1, are expressed in the apical microvillar domain of rat small intestine enterocytes. Co-immunoprecipitation studies in rat enterocytes show that NHERF1 associates with NaPi-2b but not PDZK1. In HEK co-expression studies, GFP-NaPi-2b co-precipitates with FLAG-NHERF1. This interaction is markedly diminished when the C-terminal four amino acids are truncated from NaPi-2b. FLIM-FRET analyses using tagged proteins in CACO-2_{BBE} cells show a distinct phasor shift between NaPi-2b and NHERF1 but not between NaPi-2b and the PDZK1 pair. This shift demonstrates that NaPi-2b and NHERF1 reside within 10 nm of each other. NHERF1(-/-) mice, but not PDZK1(-/-) mice, had a diminished adaptation of NaPi-2b expression in response to a low P(i) diet. Together these studies demonstrate that NHERF1 associates with NaPi-2b in enterocytes and regulates NaPi-2b adaptation.

VI. DISCUSIÓN

1. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES

El estudio de los transportadores de fosfato está siendo objeto de una intensa actividad investigadora, dada la importancia del fosfato en muchos procesos biológicos y patológicos. La pérdida de los mecanismos de regulación y control de la homeostasis del fosfato da lugar a una gran variedad de enfermedades de las cuales la enfermedad cardiovascular (ECV) presenta la mayor relevancia. Se considera que la hiperfosfatemia es un factor importante asociado a la causa y al progreso de la ECV, ya que un gran número de estudios muestran una relación directa entre la calcificación vascular y las altas concentraciones de fosfato en sangre, siendo esta hiperfosfatemia, a la vez, una característica de la enfermedad renal crónica. Todos estos factores se encuentran ligados directa o indirectamente con la diabetes, y es allí donde el estudio de los receptores nucleares FXR y LXR ha tomado una gran relevancia, en especial en la nefropatía diabética y la dislipidemia asociada a la diabetes. La activación de estos receptores por medio de ligandos sintéticos ha mostrado resultados positivos en el intento de recuperar la regulación mediada por lípidos, en modelos animales de diabetes. Igualmente, algunos de estos ligandos inducen una reducción de la inflamación y la acumulación ectópica de lípidos en el riñón, y por ello se especula sobre el papel de los lípidos como un factor determinante en el progreso de la nefropatía diabética. Además, la activación de LXR en modelos de arteriosclerosis disminuye la formación de la placa de ateroma, lo cual se explica por la capacidad de estos tratamientos de reducir la concentración de colesterol en sangre, e inhibir la expresión de marcadores pro-inflamatorios. Estos factores asociados a la calcificación vascular son determinantes en la formación y el progreso de la ECV.

Todos esto ha llevado a que el objetivo principal de esta tesis doctoral sea el estudio de los efectos de los agonistas de los receptores nucleares FXR y LXR en los transportadores de fosfato, en especial los efectos de éstos en la regulación del transporte de fosfato intestinal, por la relevancia y el interés

clínico y farmacológico que esto presenta, dada la posibilidad de tratar la hiperfosfatemia asociada a la enfermedad crónica renal.

Por todo ello, se quiso profundizar en el estudio de los mecanismos que regulan el transporte de fosfato intestinal, y a partir de esos resultados, tratar de entender cuál es la función de cada transportador de fosfato, NaPi2b, PiT1 and PiT2, en el intestino delgado, además de los efectos en la actividad y expresión de estos transportadores bajo condiciones de adaptación a alto y bajo fosfato en un modelo animal. Con esto en mente se aislaron las BBM de los tres diferentes segmentos intestinales (duodeno, yeyuno e íleon) de ratas alimentadas con dietas control (Pi al 0.6 %), y se determinó la actividad y la expresión de proteína y de ARNm de los dos transportadores NaPi (NaPi2b y PiT1) en los diferentes segmentos del intestino delgado (Figura 19). De esto se concluyó que la actividad determinada por la absorción de ^{32}P in vitro, era mayor en duodeno, seguida por yeyuno, y prácticamente nula en íleon. También se corroboró que el transporte de Pi presenta un componente sodio dependiente que se determinó comparando el transporte de Pi en presencia y ausencia de Na (sustituido por cloruro de colina). Adicionalmente se determinó, por medio de *western-blot* e inmunofluorescencia (Figura 21), que la expresión de NaPi2b y PiT1 en BBM se corresponde con lo observado en el transporte de Pi, ya que la expresión de estas proteínas es prácticamente nula en el íleon. Sin embargo, aunque los mayores niveles de expresión de ambas proteínas se observan en yeyuno, el transporte de Pi fue claramente mayor en duodeno en condiciones de dietas con concentración normal de fosfato (Pi al 0.6 %). Dicha expresión en los dos primeros segmentos son congruentes con los niveles de ARNm medidos, pero contrastan con lo observado en íleon, ya que se encontró una elevada abundancia de ARNm de PiT1 en íleon, mientras que la proteína correspondiente no había sido detectada en las BBM.

También se confirmó que la expresión de ARNm de PiT2 a lo largo del intestino delgado era casi inapreciable. Se especula que las diferencias observadas entre un mayor transporte de Pi en duodeno, que contrasta con una mayor expresión de los transportadores de fosfato en yeyuno, podría ser explicada por varios factores: 1) la posibilidad de que otros transportadores de

Pi, no identificados, se expresen en duodeno pero no en íleon, o por otro lado que presenten diferentes funciones en estos mismos segmentos; o 2) que diferentes modificaciones postrancpcionales en estos dos segmentos del intestino afecten a la actividad de NaPi2b, ya que se han descrito en estudios previos la presencia de sitios susceptibles a glicosilación [98], ubicuitinación [107], y palmitoilación [108] en la secuencia de NaPi2b, y se especula que dichas modificaciones podrían modular la actividad de este transportador. Sin embargo, dichos mecanismos puedan afectar no sólo a la actividad sino también al tráfico de estas proteínas, lo cual necesita ser estudiado con mayor profundidad.

Aunque PiT1 se expresa de un modo similar a NaPi2b (con la excepción de la expresión de ARNm en el íleon), la función de NaPi2b en el transporte transcelular en el intestino es todavía enigmático. Antes de la publicación de los resultados obtenidos por parte de nuestro grupo, PiT1 se consideraba un transportador encargado únicamente de mantener un suministro de fosfato para los procesos celulares (*housekeeping transporter*) [109, 110], expresándose en la membrana basolateral de células de diferentes tejidos. Al igual que PiT2 (otro transportador de fosfato tipo III), el ARNm correspondiente a PiT1 fue detectado en intestino delgado. Nuestros estudios demuestran la expresión de PiT1 en las BBM de enterocitos aislados de duodeno y yeyuno de rata, lo cual indica la posibilidad de que esté implicado en la absorción de Pi en intestino delgado bajo condiciones fisiológicas. Dicho papel se hace más evidente en estudios del transporte de Pi en BBM de yeyuno de rata en presencia de bajas concentraciones de PFA, los cuales muestran una inhibición parcial del transporte de Pi. Esto es interesante ya que el PFA es un fuerte inhibidor de NaPi2b y un inhibidor débil de PiT1 y PiT2 [111, 112].

Adicionalmente llama la atención que la expresión proteica de PiT1, analizada por *western-blot*, presenta una tendencia similar a la de NaPi2b en BBM de duodeno y yeyuno. Sin embargo, la importancia relativa de PiT1 en el transporte transcelular de intestino y el papel que éste puede tener en la regulación postranscripcional de ambos transportadores es algo que requerirá un estudio más profundo.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos, y claramente muestran que la absorción de Pi en el intestino de ratas esta concentrada en duodeno y yeyuno, y que es prácticamente nula en íleon. Además, ese mayor transporte está correlacionado con una alta expresión de los transportadores de fosfato, principalmente NaPi2b. Gracias a estudios por parte del profesor Sabbagh y cols., los cuales a partir de experimentos de transporte *in vitro*, usando íleon aislado de NaPi2b -/- inducido, en los que observaron que el transporte activo de fosfato se había reducido en casi un 90 %, se destaca la importancia de NaPi2b en el transporte intestinal de fosfato. Adicionalmente, la administración aguda mediante alimentación forzada de altas concentraciones de Pi a ratones *knock-out* para NaPi2b da lugar a una reducción del 45 % en la concentración de Pi en sangre al ser comparados con ratones control. Esto se correlaciona con experimentos de inhibición con nicotinamida, un inhibidor del transporte de fosfato sodio dependiente y de la expresión de ARNm de NaPi2b [113]. Los ratones tratados con nicotinamida presentan una reducción semejante en la concentración de Pi en sangre (alrededor del 50 %).

Otros estudios en ratas basados en experimentos *in vitro* muestran la importancia que el íleon puede tener en la absorción neta de fosfato [114]. En estos estudios, Kayne y colaboradores comparan la tasa de absorción de ^{32}Pi en los diferentes segmentos del intestino de ratas vivas, y concluyen que aunque el duodeno presenta una alta tasa de absorción, el efecto en el Pi neto absorbido en el intestino delgado (aproximadamente 1/3) puede ser comparado con la baja tasa de absorción del íleon, ya que el tiempo de transito del Pi en el íleon es mucho mas lento, permitiendo una alta absorción paracelular de Pi. Esto contrasta con los estudios obtenidos por Eto y cols. a través de estudios *in vitro* usando *voltaje-clamp* en yeyuno de rata. En ellos comparan la importancia relativa de ambos componentes, paracelular y transcelular, concluyendo que el primero contribuye aproximadamente con el 22 % y el transporte transcelular con el 78 % de la absorción total de Pi en este segmento del intestino delgado (estos resultados están de acuerdo con los de experimentos de inhibición con PFA) [115]. Estas conclusiones son mas congruentes con nuestras observaciones, y se podrían explicar por una alta expresión de NaPi2b, aunque no desestimamos la importancia del transporte paracelular de Pi, o la posibilidad de la existencia de otros transportadores.

Como parte del estudio de la regulación de los transportadores de fosfato en rata, también se realizaron estudios de adaptación a concentraciones altas y bajas de fosfato en condiciones agudas y crónicas. Dado el bajo transporte de Pi y la nula expresión de los trasportadores NaPi en el íleon, se enfocó la atención en el duodeno y el yeyuno. Así, ratas adaptadas crónicamente durante 7 días con dietas bajas en Pi (0.1 %), presentaron un incremento de la expresión de la proteína de NaPi2b en BBM aisladas de yeyuno, y en el ARNm específico. Además, se observó también un incremento en el transporte de Pi *in vitro* en estas BBM, en comparación a los valores obtenidos tanto en BBM de yeyuno de ratas control (dietas con Pi al 0.6 %) como las ratas adaptadas a alto Pi (1.2 %). Al comparar las ratas alimentadas con las diferentes dietas (Figura 22), no se observan en el duodeno cambios estadísticamente significativos en la expresión de NaPi2b, de PiT1, ni en el transporte, y tampoco se observó ninguna adaptación a bajo Pi como se presentó en el yeyuno.

Como se esperaba, las adaptaciones a bajo fosfato inducen un incremento de la expresión de los tres transportadores de fosfato renales, NaPi2a, NaPi2c y PiT2, lo cual promueve un aumento significativo de la absorción de Pi en BBM aisladas de riñón. Cabe destacar, que aunque se observa adaptación en intestino y en riñón a las dietas crónicas de bajo Pi, y que el incremento de la expresión de los transportadores de fosfato tiene como objetivo aumentar la absorción en el intestino y la reabsorción en el riñón, este mecanismo de adaptación no es suficiente para mantener una concentración fisiológica normal de Pi en sangre, y que se observa una disminución de 8.2 a 4.9 mg/dL de Pi.

En contraste con las adaptaciones crónicas a bajo fosfato que afectan al yeyuno, las adaptaciones agudas a altas concentraciones de Pi afectan principalmente al duodeno. Ratas alimentadas agudamente con dietas con alto contenido en Pi (1.2 %), luego de ser alimentadas durante una semana con dietas con bajo Pi, es decir siendo sometidas primero a una adaptación crónica a bajo fosfato seguida de una adaptación aguda a alto fosfato (adaptación aguda bajo a alto), presentan un incremento de 5 veces en la tasa de

transporte de Pi *in vitro* en BBMs aisladas de duodeno. Este incremento es paralelo al aumento en la expresión proteica de NaPi2b, aunque la expresión de ARNm no fue modificada. Al igual que lo observado en el yeyuno, la expresión de PiT1 no se vio afectada.

Los cambios en la absorción de Pi en el duodeno como respuesta a una adaptación aguda de bajo a alto Pi tienen repercusión en la concentración de Pi en sangre, ya que ésta se incrementa aproximadamente tres veces (de 5 a 16 mg/dL), lo cual se puede observar hasta dos horas tras la ingesta. Este efecto postprandial, que induce hiperfosfatemia transitoria, llama mucho la atención y es algo importante a tener en cuenta en estudios clínicos, ya que hasta muy recientemente muchos de los estudios fisiológicos realizados en humanos se enfocaban hacia las determinaciones aleatorias de Pi en sangre tras ayuno. Recientemente, Nishida y cols. estudiaron los efectos postprandiales de dietas con altas concentraciones de fosfato en humanos [116]. Aunque observaron resultados similares a los nuestros ya que hay incrementos en los niveles de Pi en sangre de forma muy temprana (dos horas tras la ingesta), la hiperfosfatemia transitoria inducida en humanos no alcanza la observada en rata: de 3.5 mg/dL a 5 mg/dL. Estos cambios en la concentración de Pi en sangre en humanos están asociados al incremento del riesgo de desarrollar ECV, incluso en sujetos sanos [117]. Este efecto transitorio postprandial puede ser mucho más marcado en pacientes con ERC, ya que presentan un capacidad limitada de excreción de Pi renal y un desajuste hormonal que no les permite mantener la homeostasis de Pi. Además, estos pacientes ingieren dietas restringidas en fosfato, y/o son sometidos a tratamientos con quelantes de Pi, por los que se podría esperar un marcado incremento de la absorción de Pi en duodeno, como se muestra en nuestro estudio. Bajo estas condiciones, NaPi2b se puede considerar una diana farmacológica, con el fin de inhibir su función, para con ello prevenir la hiperfosfatemia en los pacientes con ERC. La disminución en la expresión de NaPi2b sí se ha conseguido, parcialmente, en un modelo animal con el uso de ligandos del LXR, lo cual se muestra en los resultados correspondientes al siguiente apartado y que es tema central de esta tesis doctoral.

2. REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO POR PARTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES FXR Y LXR.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo muestran que los ligandos que activan los receptores nucleares FXR y LXR pueden aliviar diferentes aspectos asociados con la enfermedad diabética renal, en especial la acumulación ectópica de lípidos en el riñón y la inflamación. También se ha demostrado que la activación de LXR y FXR puede disminuir el progreso de la enfermedad cardiovascular, en especial la formación de la placa de ateroma. Adicionalmente, a partir de estudios previos se observa que la modificación del perfil lipídico de la membrana apical de las células del túbulo proximal altera la actividad de los transportadores de fosfato renales, y en general la reabsorción de fosfato, lo cual se observó también en las células OK. A partir de ello se consideró la posibilidad de que la activación de estos receptores nucleares en riñón y en intestino podrían modificar la actividad de los transportadores de fosfato que se expresan en estos tejidos, dado que estos receptores nucleares pueden modificar el perfil lipídico.

Dada la importancia de las células OK en el estudio de los transportadores renales, en primer lugar se determinó la expresión de los transportadores de fosfato diferentes a NaPi2a (NaPi4). Así, utilizando técnicas de clonación por homología y la amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE) se obtuvieron las secuencias de RNA de NaPi2c, PiT2 y PiT1 de esta línea celular (*Didelphis virginiana*). También se determinó la secuencia de una proteína de tipo PDZ (PIST), involucrada en un mecanismo de reciclaje de NaPi2a en el aparato de Golgi, como se mostró en nuestra reciente publicación [118].

Para determinar si las células OK constituyen un modelo válido para el estudio de los efectos de la activación de los receptores nucleares FXR y LXR en los transportadores renales, se determinaron las concentraciones ideales

de uso en estos estudios mediante la determinación de la actividad de la enzima LDH intracelular liberada al medio de cultivo como indicador de citotoxicidad. A partir de los resultados obtenidos se determinó que es posible el uso de tres de los agonistas de FXR, GW4064 y 6-ECDCA en el rango de 2.5 a 10 μ M, y CDCA con concentraciones de hasta 30 μ M, ya que a esas concentraciones no se observó ningún incremento en muerte celular. Para el caso de los tres agonistas de LXR las concentraciones útiles se encuentran en el rango de 2.5 a 15 μ M para el caso del TO901317 y DMHCA, y de 2.5 a 10 μ M para GW3965. Por lo tanto, en estos estudios se decidió utilizar todos los agonistas a concentración 5 μ M, con excepción de CDCA y DMHCA, los cuales se utilizaron a concentración 30 y 7.5 μ M respectivamente.

Posteriormente se determinó la activación de estos receptores por microscopía confocal. Tras tratar las células durante 24 horas con el agonista más potente de cada grupo (TO901317 para el caso de LXR y 6-ECDCA para el caso de FXR), se llevó a cabo el análisis inmunofluorescente, observándose un incremento en la expresión de ambos receptores en el núcleo de las células OK (consecuencia de su translocación), lo cual nos indica que el receptor nuclear (un factor de transcripción activado por ligando) ha sido activado. Esto fue también confirmado mediante la determinación de los cambios en el contenido lipídico en las células OK tras ser tratadas con algunos de estos ligandos. Por medio de la tinción de rojo de Nilo se observó (cuantitativamente) un incremento en el número de gotas lipídicas en el citoplasma. Estas gotas están constituidas principalmente por triglicéridos y ácidos grasos esterificados. En el caso de LXR se observó un incremento de gotas lipídicas (Figura 37), ya que al activar LXR con GW3965 y TO901317 se activa, a su vez, la expresión del factor de transcripción SREBP1c, el cual inicia la síntesis de triglicéridos. En el caso de los agonistas de FXR, el efecto esperado es la disminución de las gotas lipídicas en el citoplasma, dado que FXR tiene un efecto inhibidor en la expresión de SREBP1. Este efecto fue más claro cuando se usó el ligando 6-ECDCA, ya que tras tratar las células durante 24h con este compuesto el numero de gotas lipídicas fue prácticamente nulo (Figura 38), sin embargo el efecto de GW4064 es cuantitativamente imperceptible. Los cambios

observados en la concentración de triglicéridos y colesterol en la membrana de las células OK confirmaron las observaciones obtenidas con la tinción de rojo de Nilo. Tras tratar las células con los diferentes agonistas se aisló un extracto de membrana cruda por centrifugación y se confirmó que, efectivamente, los agonistas de LXR incrementan la concentración de triglicéridos y disminuye la concentración de colesterol en la membrana, sin embargo, los efectos en los triglicéridos debido a la activación de FXR es mínimo. La disminución de la concentración de colesterol es debida a la activación de los transportadores ABC como parte del transporte reverso del colesterol, como ya se mostró en intestino y riñón de ratón (Figura 50 y 51). Dicha capacidad de LXR de disminuir la presencia de colesterol han hecho este receptor nuclear altamente atractivo en el campo farmacéutico como tratamiento de las dislipidemias.

Una vez determinada la capacidad de activar de forma efectiva estos receptores nucleares en las células OK, se evaluó el efecto en el transporte de fosfato, y se midió específicamente el transporte de ^{32}P en presencia de sodio (Figura 41). A partir de estos resultados se observó que todos los ligandos de FXR presentaban un efecto inhibidor del transporte de fosfato, siendo CDCA el de mayor efecto (CDCA > GW4964 > 6-ECDCA). Cabe destacar que los tratamientos con CDCA fueron finalmente eliminados este estudio, ya que se percibieron efectos morfológicos negativos en la monocapa de las células OK, desprendiéndose fácilmente. En el caso de LXR el efecto inhibitorio se observó con los ligandos DMHCA > TO901317. Los resultados del efecto inhibitorio del transporte de fosfato se confirmaron al observarse una disminución en la expresión de la proteína NaPi4 encontrados en BBM aisladas de células OK tras ser tratadas con estos agonistas (Figura 42). Con excepción del agonista de FXR, GW4964, todos los demás agonistas indujeron la reducción de NaPi4 en las células OK, y cabe resaltar que dichos efectos fueron más pronunciados con los agonistas de LXR, TO901317 y DMHCA.

Una vez determinada la viabilidad de estos agonistas en las células OK y el efecto inhibitorio en el transporte de fosfato, se quiso determinar el efecto en ratón, usando para ello un agonista para cada receptor nuclear. En el caso del FXR se usó el 6-ECDCA (Int-747) a una concentración de 35 mg/Kg,

añadido al pienso con un contenido de Pi del 0.6 %. Para LXR se usó el agonista DMHCA, también en el pienso de los animales, pero en este caso a una concentración inicial de 80 mg/Kg. Las dietas se mantuvieron durante 4 días. Tras el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se aislaron las BBM del íleon y de riñón. La expresión proteica de los transportadores de fosfato fue determinada mediante *western-blot*, observándose llamativos resultados, como fueron la disminución en íleon de NaPi2b en un 83 % con DMHCA, y del 61 % con Int-747. De igual forma, se observó una disminución en la expresión de PiT1 del 30 %, pero sólo con el tratamiento de Int-747. En el caso del riñón, únicamente se observó un leve efecto en la expresión de NaPi2a, con una disminución del 14 % con el tratamiento con DMHCA (Figura 43). Estos resultados se compararon con la concentración de Pi en plasma, y se concluyó que Int-747, agonista de FXR, incrementa la fosfatemia en un 34 %, mientras que tras el tratamiento durante 4 días con DMHCA, no se observó ningún cambio en la concentración de Pi en plasma (Figura 44).

Como previamente se ha explicado en el apartado correspondiente de Resultados, el estudio de los efectos de los receptores nucleares sobre los transportadores de fosfato se centró en LXR. Esto fue debido principalmente a la ausencia de incremento en la concentración de fosfato en sangre, en contra de lo observado para el FXR. También se tuvieron en cuenta los efectos positivos que ha tenido, sobre todo el compuesto DMHCA, al disminuir la progresión de la aterosclerosis en modelos *knock-out* de ApoE y LDLR. Esto último es debido a dos procesos: 1) la inducción del transporte reverso del colesterol, sin activar con ello la síntesis de triglicéridos, y 2) la disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Este último efecto es dado gracias a la capacidad de LXR de inhibir la expresión del factor de transcripción NFkB.

Para determinar los efectos de DMHCA sobre los transportadores de fosfato en ratón, se incrementó el tiempo de ingesta de las dietas a dos semanas de tratamiento, y se usó un segundo agonista como control, a una concentración de 30 mg/Kg (TO901317), el cual aunque es mas potente que DMHCA induce lipogénesis. En nuestras condiciones ambos agonistas activaron LXR en intestino y riñón lo cual se determinó por el incremento de la

expresión de proteína y ARNm de ABCA1 y ABCG1. También se observó el incremento de SREBP1c (principalmente con TO901317), que a su vez induce la expresión de FAS y SCD1, enzimas fundamentales en la síntesis de triglicéridos. Esto es un efecto negativo de la activación de LXR, que tiene lugar con el uso de muchos de los ligandos comerciales. En el riñón de ratón se observó una baja expresión de la proteína SCD1 tras los tratamientos con DMHCA, lo que demuestra el mínimo efecto de este compuesto en la lipogénesis, dando esto último más relevancia a los efectos observados en los transportadores de fosfato por parte de DMHCA.

Ambos ligandos inducen una disminución en el transporte de fosfato en riñón, DMHCA reduce el transporte un 20 % y TO901317 un 15 %. Estos tratamientos tienen un efecto más marcado en el íleon, donde el transporte de fosfato en presencia de sodio se reduce un 56 % con DMHCA y un 51 % con TO901317 (Figura 47). El transporte de fosfato sodio-independiente fue cuantificado con cloruro de colina en vez de cloruro de sodio. En promedio, un 5 % en el riñón y un 14 % en el íleon del total del transporte, fue debido a un componente sodio-independiente, que no fue alterado por ninguno de estos compuestos. De forma paralela a esta disminución de la actividad del transporte de fosfato en riñón, se observó un incremento de la excreción de Pi en orina del 50 % aproximadamente, y lo cual se acompañó de una leve disminución de la concentración de Pi en plasma de hasta un 20 % con TO901317, y 14 % con DMHCA. Estos tratamientos no presentan cambios en las concentraciones de Ca o PTH en suero (Figure 48), pero sí la de FGF23, que se elevó en un 64 % con TO901317 y un 46 % con DMHCA (Figure 49).

La disminución del transporte de fosfato renal está asociada con una disminución de la abundancia de la proteína de los transportadores de fosfato renales, NaPi2a, NaPi2c, y PiT2, hasta de un 57 %, 40 % y 30 % respectivamente, comparado con BBM aisladas de ratones control. Esta reducción de la expresión proteica esta correlacionada con cambios significativos en la expresión de ARNm para el caso de NaPi2a y NaPi2c. Para el caso del PiT2 se observa un disminución mínima y no significativa del ARNm (Figura 45). De igual forma la reducción del transporte sodio

dependiente observado en las BBM de íleon está asociada a una disminución en la abundancia de la proteína de NaPi2b (Figura 46), principal transportador de fosfato sodio dependiente expresado en el íleon, el cual presenta una reducción de su expresión del 61 % por TO901317 (75 % de reducción del ARNm) y en de un 52 % con el tratamiento de DMHCA (50 % para el ARNm).

Dado que las proteínas PDZ (NHERF1 y PDZK1) han estado claramente vinculadas con la regulación de los transportadores de fosfato renales y, que nuestro grupo había demostrado que esto ocurre de igual forma con el NaPi2b intestinal [119], la expresión de las proteínas NHERF1 y PDZK1 en BBM fueron también cuantificadas mediante WB en ambos casos, riñón e intestino. Estos no mostraron ningún cambio significativo (Figura 45 y 46). De igual forma se cuantificó la expresión proteica de los transportadores de Na-Glucosa, SGLT1, en BBM de íleon, y SGLT2 en BBM de riñón por *western-blot* (Figura 54) para determinar la especificidad de los efectos en los transportadores de fosfato. En este caso se observó una reducción del 39 % en la expresión de SGLT2 en el riñón por parte del TO901317, pero ningún cambio fue observado en SGLT1, ni en la glucosa sanguínea.

Para confirmar aún más la especificidad de estos efectos, se empleó el modelo celular OK para corroborar los resultados obtenidos en riñón de ratón. Se realizó un análisis dosis-respuesta, midiendo el transporte de fosfato (^{32}P) con ambos compuestos. El transporte se redujo claramente, en forma gradual e inversamente proporcional al aumento de la concentración de cada agonista. DMHCA mostró un efecto inhibitorio en el rango entre 5 y 10 μM , con una reducción máxima del transporte del 50 %. TO901317 fue más potente, con un efecto inhibitorio ya a 2.5 μM , y siendo máximo a concentración de 10 μM , con una inhibición del 51 %. Estos resultados corroboran nuestras observaciones preliminares sobre los efectos de los agonista de FXR y LXR en el transporte de fosfato de las células OK (Figura 41), lo cual fue nuestro punto de partida. Y como se podría esperar dados los resultados previos, estos efectos están asociados a una disminución de la expresión proteica de NaPi4 en las BBM

aisladas de células OK, que se cuantificó por *western-blot*, y corroboró mediante microscopía inmunofluorescente y confocal (Figura 53).

La reducción de la expresión de los transportadores de fosfato renales se podrían explicar por medio del incremento en la concentración plasmática de FGF23. El efecto fosfatúrico de esta hormona a través de su capacidad para disminuir la abundancia de los transportadores de fosfato renales ha sido demostrado previamente [120, 121], siendo estos efectos en parte debidos a la fosforilación de NHERF1 en la ruta de señalización de ERK1/2 [122]. Sin embargo este efecto no está aun claro para PiT2, y aún más, los efectos en NaPi4 observados en las células OK son independientes de FGF23. Adicionalmente, resultados sin publicar de nuestro grupo muestran que, efectivamente, LXR presenta ligeros cambios en la concentración de colesterol en las BBM aisladas de riñones de ratón tratados con agonistas de LXR. Esto último fue determinado por mediciones de fluidez a través de GP Laurdan, lo cual no es sorprendente, ya que cambios mínimos en el contenido lipídico celular pueden modificar la actividad y el tráfico de estas proteínas [123]. Esta consideración también se podría tener en cuenta en el caso de NaPi2b, ya que el efecto de FGF23 en NaPi2b aún se desconoce.

Un factor importante a tener en cuenta es la capacidad de los receptores nucleares de regular la expresión de proteínas a nivel transcripcional, y el efecto de la vitamina D en la regulación del transporte de fosfato intestinal. Estos efectos se dan a través del también receptor nuclear de tipo II VDR. Aunque cabe destacar la existencia de otros receptores nucleares que han sido también relacionados con la regulación de la homeostasis del Pi, como PXR (*Pregnane X receptor*), el receptor nuclear xenobiótico, y RAR (el receptor de la vitamina A). En general, los receptores nucleares se conocen por la capacidad de incrementar la expresión de genes a través de la unión directa con el promotor de los genes diana. Por el contrario, poco se sabe de efectos inhibitorios usando la misma estrategia molecular. Sin embargo se conoce la capacidad inhibitoria de LXR a través de mecanismos post-transcripcionales, como la SUMOilación [124].

Aunque no sabemos claramente el mecanismo por el cual la activación de LXR en riñón e intestino induce la reducción de la expresión de los transportadores de fosfato, estos resultados no dejan de ser muy interesantes. En términos de hiperfosfatemia asociada a enfermedad renal crónica y su relación con la enfermedad cardiovascular, el tener una nueva posibilidad farmacológica que permita la inhibición del transporte de fosfato intestinal a través de la inhibición de la expresión de NaPi2b tiene un impacto clínico enorme. Sin embargo, el estudio del mecanismo por el que tienen lugar las observaciones descritas en este trabajo continúan siendo de nuestro interés, para lo cual sería de gran ayuda un modelo celular de transporte intestinal, siendo esto último, otro de los objetivos de esta tesis doctoral.

3. MODELO CELULAR PARA EL ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO INTESTINALES.

El estudio de los transportadores de fosfato intestinales ha sido un proceso lento, en parte, debido a la ausencia de un modelo celular que cumpla unas determinadas características: expresión de los diferentes transportadores, presencia de microvellosidades (BBM), constitución de una monocapa densa que permita una diferenciación celular completa, transporte de fosfato *in vitro*, y por último, capacidad de adaptación a cambios de fosfato en el medio de incubación. Este modelo permitiría además el estudio del mecanismo de la regulación de NaPi2b por parte de LXR. Con ese objetivo tras estudiar diferentes líneas celulares de rata y ratón, seleccionamos las células CaCo-2_{BBE}, que habían sido originalmente aisladas en el laboratorio del profesor Mooseker de la Universidad de Yale (New Haven, EE.UU) [104]. Aunque nuestro intento de caracterizar este modelo es aún inconcluso, estas células presentan algunas de las características deseadas.

CaCo-2_{BBE} es un subclón de las clásicas células CaCo. Como se muestra en las figuras 55 y 57, estas células presentan una BBM con una microvelocidad densa, lugar donde se localizan NaPi2b-GFP y otras proteínas conjugadas tras ser transfectadas. Esto nos han permitido el estudio de la

interacción de NaPi2b y la proteína PDZ, resultados publicados recientemente por nuestro grupo en Denver en la revista *Journal of Biological Chemistry* [119]. Aunque este estudio es muy relevante, al mostrar por primera vez que NaPi2b interactúa con NHERF1 a través de su extremo C-terminal usando este modelo celular, estos resultados no se incluyeron en esta tesis doctoral.

Adicionalmente se ha determinado que estas células expresan el transportador de fosfato NaPi2b, aunque nuestras observaciones preliminares a través de la microscopía confocal muestran una expresión subapical. Hasta el momento hemos observado resultados contradictorios con respecto al cambio en la expresión del NaPi2b endógeno, bien sea por los tratamientos con los agonistas de LXR, o como respuesta a tratamientos con diferentes concentraciones de Pi. Además, la presencia del transporte sodio-dependiente es también controvertida, ya que se han obtenido resultados en los cuales se observa un componente sodio-dependiente, pero los tiempos de transporte que deben emplearse necesariamente deben ser superiores a 20 minutos. Esto genera un efecto negativo en la estabilidad de la monocapa, ya que se despega fácilmente durante los experimentos de transporte, probablemente por la ausencia de Na en el medio de incubación durante un tiempo muy prolongado. Algo muy interesante que se observó fue la capacidad de estas células para adaptarse a altas concentraciones de fosfato. El transporte de fosfato en estas células se incrementa notablemente cinco veces (5X) al adaptarse a Pi 4 mM durante 24 horas, y aún más (14X) tras adaptarlas durante 4 días a 4 mM de Pi. Las células así adaptadas presentan casi exclusivamente un componente de transporte de Pi sodio-independiente, lo cual contrasta con los resultados obtenidos con células OK y con el transporte en las BBM aisladas de intestino de rata o ratón, ya que estas últimas presentan una componente sodio-dependiente muy elevado, que claramente está determinado por los transportadores NaPi. Adicionalmente, el alto transporte que presentan estas células tras ser adaptadas a 2 o 4 mM es inhibido con PFA, un fuerte inhibidor de los transportadores de fosfato de tipo II.

Para intentar identificar la naturaleza de este transporte, se realizaron varias cinéticas de saturación de sustrato en células adaptadas a alto fosfato y en células control (Pi 1 mM en el medio de cultivo). Los resultados muestran que estas células presentan un transporte de Pi mayor en ausencia de sodio, y al calcular las Kms teóricas se observa una afinidad mayor por el Pi en ausencia de sodio. La Km teórica calculada en ausencia de sodio tiene un valor de $51,6 \pm 9,4 \mu\text{M}$, y contrasta con una Km de $89,0 \pm 28,3 \mu\text{M}$ calculada en presencia de Na. Luego de que las células fueron adaptadas a 4 mM de Pi se observan los cambios mas interesantes, ya que la afinidad por el Pi se ve reducida en ambos casos: las Kms calculadas aumentan aproximadamente tres veces, con valores de $254,3 \pm 33,4 \mu\text{M}$ en presencia de Na y $206,5 \pm 32,7 \mu\text{M}$ en ausencia de Na. Esto indica la presencia de sistemas de transporte diferentes antes y después de la adaptación a 4 mM de Pi. Además, la Vmax se incrementa más de 10 veces con la adaptación a 4 mM de Pi, pasando de $0,28 \pm 0,04$ a $3,12 \pm 0,35 \text{ nmol Pi/mg/min}$ en presencia de Na. En ausencia de sodio el incremento es a $2,61 \pm 0,34$ desde $0,19 \pm 0,02 \text{ nmol Pi/mg/min}$. Este aumento significativo en la Vmax de ambos componentes nos puede indicar un incremento en la expresión de un transportador, que basado en nuestras observaciones, no es ninguno de los hasta ahora conocidos (NaPi2b, Pit-1 o Pit-2). A esta conclusión se llega debido a la sodio-independencia del transporte expresado, y a la menor afinidad del nuevo transporte. Con la idea de elucidar inicialmente la naturaleza del sistema de transporte expresado tras la incubación de las células CaCo-2_{BBE} con 4 mM de Pi, se decidió determinar un patrón de inhibición. Para esto se utilizaron diferentes compuestos, unos inhibidores clásicos del transporte de Pi (PFA y Pi frío en altas concentraciones), y otros que funcionan como sustratos naturales para un grupo de intercambiadores de la familia Slc26. Dichos intercambiadores de igual forma se expresan en el intestino. Como se esperaba, el transporte de Pi se inhibió completamente con más Pi frío considerado como inhibidor, pero también por PFA, lo cual sorprende porque, hasta la fecha, el PFA se ha considerado un inhibidor exclusivo de los transportadores de Pi de tipo II, que son Na-dependientes. También se observó una leve inhibición (12 %) con DIDS y con oxalato. En este caso hubo que utilizar un medio de incubación sin

calcio para evitar la precipitación del ácido oxálico, por lo que se comparó con el transporte en ausencia de oxalato y sin calcio. Estos valores contrastan con los observados en células control, en las que se determinó una inhibición aproximada promedio de casi el 50 % del transporte de Pi con todos los compuestos utilizados. De todo esto se puede concluir la participación de un intercambiador similar a los de la familia Slc26, y cuya identificación se está persiguiendo en estos momentos en nuestro laboratorio de Zaragoza.

VII. CONCLUSIONES

- 1- Se ha demostrado la presencia de los transportadores NaPi2b y PiT1 en la membrana apical de los enterocitos de rata, estando localizados principalmente en duodeno y yeyuno, y siendo prácticamente indetectables en íleon.
- 2- NaPi2b presenta un papel fundamental en las adaptaciones crónicas y agudas del intestino a dietas altas y bajas en fosfato, lo cual contrasta con la respuesta de PiT1, que es mínima. La relevancia y función de este transportador de fosfato tipo III en el intestino queda aún por determinar.
- 3- La adaptación de NaPi2b en duodeno como respuesta a diferentes contenidos de Pi en la dieta difiere de la observada en yeyuno, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de regulación de este transportador en estos segmentos del intestino delgado.
- 4- El yeyuno parece ser la fracción del intestino delgado más importante en la adaptación a dietas crónicas con bajo fosfato, mientras el duodeno parece ser más importante en la adaptación aguda a alto fosfato. En duodeno, los cambios en la expresión de NaPi2b no son tan considerables como los observados en yeyuno en respuesta a la adaptación a bajo Pi crónico. Lo opuesto es cierto en el caso del transporte de fosfato en estos dos segmentos, y la expresión de NaPi2b no es suficiente para justificar estos cambios. Lo cual nos indica la presencia de otro mecanismo, u otro transportador, que pueden ayudar a entender el por qué de estas diferencias tan marcadas.
- 5- La hiperfosfatemia postprandial transitoria y la elevada expresión en el NaPi2b como respuesta aguda a dietas ricas en Pi, denotan la relevancia de NaPi2b en el intestino, y que la inhibición farmacológica de éste podría ser una posibilidad terapéutica importante en el tratamiento de la hiperfosfatemia.

- 6- La activación de los receptores nucleares FXR y LXR en células OK induce una reducción del transporte de fosfato, y esto, en parte, es debido a la inhibición de la expresión de NaPi4 en BBM.
- 7- El agonista de FXR, Int-747, reduce la expresión de NaPi2b en intestino, y de NaPi2a en riñón de ratón, pero genera un incremento en la concentración de Pi en sangre.
- 8- La activación de LXR, a través de los agonistas DMHCA y TO901317, induce la reducción del transporte de fosfato en íleon y riñón de ratón, así como una disminución de la expresión de los transportadores de fosfato NaPi2b en intestino, y de NaPi2a, NaPi2c, y Pit2 en riñón. Esto genera una disminución de la concentración de Pi en sangre y un incremento de su excreción urinaria. Adicionalmente se observó un aumento en la concentración de FGF23 en sangre.
- 9- Los efectos de los agonistas del LXR pueden tener aplicaciones farmacológicas muy importantes en el tratamiento de la hiperfosfatemia, en especial en pacientes con ERC.
- 10-DMHCA es un agonista que puede presentar aplicaciones farmacológicas en diferentes patologías, ya que se ha demostrado en diferentes estudios la capacidad de estimular el transporte reverso del colesterol sin inducir lipogénesis. Adicionalmente puede reducir la absorción de fosfato en intestino.
- 11-Las células CaCo-2_{BBE} constituyen un modelo parcial para el estudio del transporte de Pi por el intestino. Se trata de un modelo incompleto, ya que sólo muestra un componente Na-independiente de transporte. Sin embargo, las claras características cinéticas de este transporte y su regulación por el propio Pi le constituyen en sí un modelo válido para el estudio del transporte Na-independiente de Pi por el intestino.

12-El transporte Na-independiente de Pi en las células CaCo-2_{BBE} e inhibido por PFA, DIDS y oxalato, por lo que, probablemente, se trate de un transportador miembro de la familia Slc26, cuya identificación se está llevando a cabo en estos momentos por el grupo de Zaragoza.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alizadeh Naderi, A.S. and R.F. Reilly, *Hereditary disorders of renal phosphate wasting*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(11): p. 657-65.
2. Farrow, E.G. and K.E. White, *Recent advances in renal phosphate handling*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(4): p. 207-17.
3. Foley, R.N., et al., *Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Am Heart J, 2008. **156**(3): p. 556-63.
4. Adeney, K.L., et al., *Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 381-7.
5. Bertram, J.F., et al., *Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney*. Cell Tissue Res, 1992. **270**(1): p. 37-45.
6. Pastoriza-Munoz, E., et al., *Effect of parathyroid hormone on phosphate reabsorption in rat distal convolution*. Am J Physiol, 1978. **235**(4): p. F321-30.
7. Prie, D. and G. Friedlander, *Genetic disorders of renal phosphate transport*. N Engl J Med, 2010. **362**(25): p. 2399-409.
8. Levi, M., et al., *Renal phosphate-wasting disorders*. Adv Chronic Kidney Dis, 2006. **13**(2): p. 155-65.
9. Levi, M. and S. Bruesegem, *Renal phosphate-transporter regulatory proteins and nephrolithiasis*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1171-3.
10. Murer, H., et al., *Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 531-42.
11. Murer, H., I. Forster, and J. Biber, *The sodium phosphate cotransporter family SLC34*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 763-7.
12. Beck, L., et al., *Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5372-7.
13. Villa-Bellosta, R. and V. Sorribas, *Compensatory regulation of the sodium/phosphate cotransporters NaPi-IIc (SLC34A3) and Pit-2 (SLC20A2) during Pi deprivation and acidosis*. Pflugers Arch, 2010. **459**(3): p. 499-508.

14. Forster, I.C., et al., *Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective*. Kidney Int, 2006. **70**(9): p. 1548-59.
15. Magen, D., et al., *A loss-of-function mutation in NaPi-IIa and renal Fanconi's syndrome*. N Engl J Med, 2010. **362**(12): p. 1102-9.
16. Silverstein, D., M. Barac-Nieto, and A. Spitzer, *Mechanism of renal phosphate retention during growth*. Kidney Int, 1996. **49**(4): p. 1023-6.
17. Sabbagh, Y., et al., *Intestinal phosphate transport*. Adv Chronic Kidney Dis, 2011. **18**(2): p. 85-90.
18. Mc, H.G. and D.S. Parsons, *The absorption of water and salt from the small intestine of the rat*. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci, 1957. **42**(1): p. 33-48.
19. Hilfiker, H., et al., *Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14564-9.
20. Giral, H., et al., *Regulation of the Rat Intestinal Na-dependent Phosphate Transporters by Dietary Phosphate*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009.
21. Murer, H., et al., *Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1373-409.
22. Marks, J., E.S. Debnam, and R.J. Unwin, *Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(2): p. F285-96.
23. Benais-Pont, G., et al., *Identification of a tight junction-associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability*. J Cell Biol, 2003. **160**(5): p. 729-40.
24. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Tight junction proteins*. Prog Biophys Mol Biol, 2003. **81**(1): p. 1-44.
25. Balda, M.S., et al., *Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol*. J Cell Biol, 1993. **123**(2): p. 293-302.
26. Prie, D., P. Urena Torres, and G. Friedlander, *Latest findings in phosphate homeostasis*. Kidney Int, 2009. **75**(9): p. 882-9.
27. Levi, M., et al., *Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal P(i) transporter to alterations in dietary P(i)*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 2): p. F900-8.

28. Lotscher, M., et al., *Role of microtubules in the rapid regulation of renal phosphate transport in response to acute alterations in dietary phosphate content*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1302-12.
29. Kumar, R., et al., *Inhibitors of renal epithelial phosphate transport in tumor-induced osteomalacia and uremia*. Proc Assoc Am Physicians, 1995. **107**(3): p. 296-305.
30. Cai, Q., et al., *Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia*. N Engl J Med, 1994. **330**(23): p. 1645-9.
31. Jonsson, K.B., et al., *Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1656-63.
32. Mannstadt, M., H. Juppner, and T.J. Gardella, *Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. F665-75.
33. Villa-Bellosta, R., et al., *Interactions of the growth-related, type IIc renal sodium/phosphate cotransporter with PDZ proteins*. Kidney Int, 2008. **73**(4): p. 456-64.
34. Chen, Y., et al., *Cold induces micro- and nano-scale reorganization of lipid raft markers at mounds of T-cell membrane fluctuations*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5386.
35. Chen, Y., J. Qin, and Z.W. Chen, *Fluorescence-topographic NSOM directly visualizes peak-valley polarities of GM1/GM3 rafts in cell membrane fluctuations*. J Lipid Res, 2008. **49**(10): p. 2268-75.
36. Cheng, Z.J., et al., *Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(1): p. 101-10.
37. Janich, P. and D. Corbeil, *GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(9): p. 1783-7.
38. Roper, K., D. Corbeil, and W.B. Huttner, *Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 582-92.
39. Surviladze, Z., et al., *FcepsilonRI and Thy-1 domains have unique protein and lipid compositions*. J Lipid Res, 2007. **48**(6): p. 1325-35.

40. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
41. Dietrich, C., et al., *Lipid rafts reconstituted in model membranes*. Biophys J, 2001. **80**(3): p. 1417-28.
42. Dietrich, C., et al., *Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10642-7.
43. Levi, M., et al., *Lipid phases in renal brush border membranes revealed by Laurdan fluorescence*. Photochem Photobiol, 1993. **57**(3): p. 420-5.
44. Parasassi, T., et al., *Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes*. Biophys J, 1997. **72**(6): p. 2413-29.
45. Lajoie, P., et al., *Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane*. J Cell Biol, 2009. **185**(3): p. 381-5.
46. Lajoie, P., et al., *Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells*. J Cell Biol, 2007. **179**(2): p. 341-56.
47. Lasserre, R., et al., *Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(9): p. 538-47.
48. Lemmon, M.A., *Membrane recognition by phospholipid-binding domains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 99-111.
49. Liu, X., et al., *Adenylyl cyclase type 6 overexpression selectively enhances beta-adrenergic and prostacyclin receptor-mediated inhibition of cardiac fibroblast function because of colocalization in lipid rafts*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 359-69.
50. Ostrom, R.S., et al., *Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(5): p. 983-92.

51. Thangavel, M., et al., *The C1 and C2 domains target human type 6 adenylyl cyclase to lipid rafts and caveolae*. Cell Signal, 2009. **21**(2): p. 301-8.
52. Westover, E.J., et al., *Cholesterol depletion results in site-specific increases in epidermal growth factor receptor phosphorylation due to membrane level effects. Studies with cholesterol enantiomers*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51125-33.
53. Wymann, M.P. and R. Schneiter, *Lipid signalling in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 162-76.
54. Bacic, D., et al., *Regulation of the renal type IIa Na/Pi cotransporter by cGMP*. Pflugers Arch, 2001. **443**(2): p. 306-13.
55. Bacic, D., et al., *Involvement of the MAPK-kinase pathway in the PTH-mediated regulation of the proximal tubule type IIa Na+/Pi cotransporter in mouse kidney*. Pflugers Arch, 2003. **446**(1): p. 52-60.
56. Cunningham, R., et al., *Signaling pathways utilized by PTH and dopamine to inhibit phosphate transport in mouse renal proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(2): p. F355-61.
57. Lederer, E.D., S.S. Sohi, and K.R. McLeish, *Parathyroid hormone stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity through two independent signal transduction pathways: role of ERK in sodium-phosphate cotransport*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(2): p. 222-31.
58. Yamashita, T., et al., *Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 28265-70.
59. Kojic, L.D., et al., *Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29305-13.
60. Lajoie, P. and I.R. Nabi, *Regulation of raft-dependent endocytosis*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 644-53.
61. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 603-12.
62. Sarnataro, D., et al., *Lipid rafts and clathrin cooperate in the internalization of PrP in epithelial FRT cells*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5829.

63. Singh, A.K., et al., *Differential roles of NHERF1, NHERF2, and PDZK1 in regulating CFTR-mediated intestinal anion secretion in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 540-50.
64. Singh, R.D., et al., *Inhibition of caveolar uptake, SV40 infection, and beta1-integrin signaling by a nonnatural glycosphingolipid stereoisomer*. J Cell Biol, 2007. **176**(7): p. 895-901.
65. Singh, R.D., et al., *Caveolar endocytosis and microdomain association of a glycosphingolipid analog is dependent on its sphingosine stereochemistry*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30660-8.
66. Singh, R.D., et al., *Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3254-65.
67. Zoncu, R., et al., *Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 3793-8.
68. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.
69. Slatopolsky, E., A. Brown, and A. Dusso, *Calcium, phosphorus and vitamin D disorders in uremia*. Contrib Nephrol, 2005. **149**: p. 261-71.
70. Harrison, H.E. and H.C. Harrison, *Transfer of Ca45 across intestinal wall in vitro in relation to action of vitamin D and cortisol*. Am J Physiol, 1960. **199**: p. 265-71.
71. Fuchs, R. and M. Peterlik, *Vitamin D-induced phosphate transport in intestinal brush border membrane vesicles*. Biochem Biophys Res Commun, 1980. **93**(1): p. 87-92.
72. Fuchs, R. and M. Peterlik, *Intestinal phosphate transport*. Adv Exp Med Biol, 1980. **128**: p. 381-90.
73. Marks, J., et al., *Intestinal phosphate absorption and the effect of vitamin D: a comparison of rats with mice*. Exp Physiol, 2006. **91**(3): p. 531-7.
74. Xu, H., et al., *Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)(2) vitamin D(3)*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(3): p. C487-93.
75. Sitara, D., *Correlation among hyperphosphatemia, type II sodium phosphate transporter activity, and vitamin D metabolism in Fgf-23 null mice*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1116**: p. 485-93.

76. Obrador, G.T., M. Mahdavi-Mazdeh, and A.J. Collins, *Establishing the Global Kidney Disease Prevention Network (KDPN): a position statement from the National Kidney Foundation*. Am J Kidney Dis, 2011. **57**(3): p. 361-70.
77. Zelmanovitz, T., et al., *Diabetic nephropathy*. Diabetol Metab Syndr, 2009. **1**(1): p. 10.
78. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(1): p. 164-76.
79. Jiang, T., et al., *Farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism, fibrosis, and diabetic nephropathy*. Diabetes, 2007. **56**(10): p. 2485-93.
80. Seyer-Hansen, K., *Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus*. Kidney Int, 1983. **23**(4): p. 643-6.
81. Jiang, T., et al., *Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(37): p. 32317-25.
82. Najafian, B. and M. Mauer, *Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. **83**(1): p. 1-8.
83. Mehrotra, R., *Disordered mineral metabolism and vascular calcification in nondialyzed chronic kidney disease patients*. J Ren Nutr, 2006. **16**(2): p. 100-18.
84. Rubinger, D., et al., *Regulation of the renal sodium-dependent phosphate cotransporter NaPi2 (Npt2) in acute renal failure due to ischemia and reperfusion*. Nephron Physiol, 2005. **100**(1): p. p1-12.
85. Forbes, J.M., M.T. Coughlan, and M.E. Cooper, *Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1446-54.
86. Proctor, G., et al., *Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2502-9.
87. Navarro-Diaz, M., et al., *Obesity, inflammation, and kidney disease*. Kidney Int Suppl, 2008(111): p. S15-8.

88. Kim, H.J., et al., *Renal mass reduction results in accumulation of lipids and dysregulation of lipid regulatory proteins in the remnant kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(6): p. F1297-306.
89. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Sterol regulatory element-binding proteins, liver X receptor, ABCA1 transporter, CD36, scavenger receptors A1 and B1 in nephrotic kidney*. Am J Nephrol, 2009. **29**(6): p. 607-14.
90. Kalaany, N.Y. and D.J. Mangelsdorf, *LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism*. Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 159-91.
91. Pharmaceuticals, I. *Study of INT-747 (6-ECDCA) in Patients With Diabetes and Presumed NAFLD*.
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00501592> 2007.
92. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
93. Rizzo, G. and S. Fiorucci, *PPARs and other nuclear receptors in inflammation*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 421-7.
94. Levi, M., *Nuclear receptors in renal disease*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(8): p. 1061-7.
95. Gomes, P., et al., *Expression and function of sodium transporters in two opossum kidney cell clonal sublines*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(1): p. F73-85.
96. Sorribas, V., et al., *Thyroid hormone stimulation of Na/Pi-cotransport in opossum kidney cells*. Pflugers Arch, 1995. **431**(2): p. 266-71.
97. Xu, H., et al., *Regulation of intestinal NaPi-IIIb cotransporter gene expression by estrogen*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(6): p. G1317-24.
98. Arima, K., et al., *Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIIb Na-P(i) cotransporter during ontogeny*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(2): p. G426-34.
99. Sorribas, V., et al., *Cloning of a Na/Pi cotransporter from opossum kidney cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(9): p. 6615-21.
100. Allain, C.C., et al., *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. Clin Chem, 1974. **20**(4): p. 470-5.

101. Kratzer, A., et al., *Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE-/- mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia*. J Lipid Res, 2009. **50**(2): p. 312-26.
102. Quaroni, A., et al., *Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria*. J Cell Biol, 1979. **80**(2): p. 248-65.
103. Mohrmann, I., et al., *Sodium-dependent transport of Pi by an established intestinal epithelial cell line (CaCo-2)*. Am J Physiol, 1986. **250**(3 Pt 1): p. G323-30.
104. Peterson, M.D. and M.S. Mooseker, *Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBe clones of the human intestinal cell line, Caco-2*. J Cell Sci, 1992. **102** (Pt 3): p. 581-600.
105. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-49.
106. Kirchner, S., et al., *Luminal fructose inhibits rat intestinal sodium-phosphate cotransporter gene expression and phosphate uptake*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 1028-38.
107. Palmada, M., et al., *Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G143-50.
108. McHaffie, G.S., et al., *The role of an intracellular cysteine stretch in the sorting of the type II Na/phosphate cotransporter*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(9): p. 2099-106.
109. Katai, K., et al., *Regulation of intestinal Na+-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Biochem J, 1999. **343 Pt 3**: p. 705-12.
110. Bai, L., J.F. Collins, and F.K. Ghishan, *Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(4): p. C1135-43.
111. Villa-Bellosta, R., et al., *The Na+-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and*

- regulated by dietary Pi.* Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(4): p. F691-9.
112. Ravera, S., et al., *Deciphering PiT transport kinetics and substrate specificity using electrophysiology and flux measurements.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(2): p. C606-20.
 113. Katai, K., et al., *Nicotinamide inhibits sodium-dependent phosphate cotransport activity in rat small intestine.* Nephrol Dial Transplant, 1999. **14**(5): p. 1195-201.
 114. Kayne, L.H., et al., *Analysis of segmental phosphate absorption in intact rats. A compartmental analysis approach.* J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 915-22.
 115. Eto, N., M. Tomita, and M. Hayashi, *NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats.* Drug Metab Pharmacokinet, 2006. **21**(3): p. 217-21.
 116. Nishida, Y., et al., *Acute effect of oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men.* Kidney Int, 2006. **70**(12): p. 2141-7.
 117. Shuto, E., et al., *Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(7): p. 1504-12.
 118. Lanaspa M.A., C.Y., Breusegem S., Andrés-Hernando A., Cicerchi C., Levi M., and Sorribas V., *Inorganic Phosphate Modulates the Expression of the NaPi-2a Transporter in the trans-Golgi Network and the Interaction with PIST in the Proximal Tubule.* BioMed Research International, 2013. **2013**(513932): p. 9.
 119. Giral, H., et al., *NHE3 regulatory factor 1 (NHERF1) modulates intestinal sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-2b) expression in apical microvilli.* J Biol Chem, 2012. **287**(42): p. 35047-56.
 120. Gattineni, J., et al., *FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1.* Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(2): p. F282-91.
 121. Komaba, H. and M. Fukagawa, *FGF23-parathyroid interaction: implications in chronic kidney disease.* Kidney Int, 2010. **77**(4): p. 292-8.

122. Andrukova, O., et al., *FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway*. Bone, 2012. **51**(3): p. 621-8.
123. Inoue, M., et al., *Partitioning of NaPi cotransporter in cholesterol-, sphingomyelin-, and glycosphingolipid-enriched membrane domains modulates NaPi protein diffusion, clustering, and activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49160-71.
124. Ghisletti, S., et al., *Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 57-70.

IX. ANEXOS

Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate

Hector Giral, Yupanqui Caldas, Eileen Sutherland, Paul Wilson, Sophia Breusegem, Nicholas Barry, Judith Blaine, Tao Jiang, Xiaoxin X. Wang, and Moshe Levi

Division of Renal Diseases and Hypertension, Department of Medicine, University of Colorado Denver, and Veterans Affairs Medical Center, Aurora, Colorado

Submitted 21 May 2009; accepted in final form 6 August 2009

Giral H, Caldas Y, Sutherland E, Wilson P, Breusegem S, Barry N, Blaine J, Jiang T, Wang XX, Levi M. Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1466–F1475, 2009. First published August 12, 2009; doi:10.1152/ajprenal.00279.2009.—Hyperphosphatemia associated with chronic kidney disease is one of the factors that can promote vascular calcification, and intestinal P_i absorption is one of the pharmacological targets that prevents it. The type II Na- P_i cotransporter NaPi-2b is the major transporter that mediates P_i reabsorption in the intestine. The potential role and regulation of other Na- P_i transporters remain unknown. We have identified expression of the type III Na- P_i cotransporter PiT-1 in the apical membrane of enterocytes. Na- P_i transport activity and NaPi-2b and PiT-1 proteins are mostly expressed in the duodenum and jejunum of rat small intestine; their expression is negligible in the ileum. In response to a chronic low- P_i diet, there is an adaptive response restricted to the jejunum, with increased brush border membrane (BBM) Na- P_i transport activity and NaPi-2b, but not PiT-1, protein and mRNA abundance. However, in rats acutely switched from a low- to a high- P_i diet, there is an increase in BBM Na- P_i transport activity in the duodenum that is associated with an increase in BBM NaPi-2b protein abundance. Acute adaptive upregulation is restricted to the duodenum and induces an increase in serum P_i that produces a transient postprandial hyperphosphatemia. Our study, therefore, indicates that Na- P_i transport activity and NaPi-2b protein expression are differentially regulated in the duodenum vs. the jejunum and that postprandial upregulation of NaPi-2b could be a potential target for treatment of hyperphosphatemia.

SLC34A2; PiT-1; hyperphosphatemia; chronic kidney disease; dietary P_i

IN THE PAST SEVERAL YEARS, numerous studies have related hyperphosphatemia with progression of chronic kidney disease (CKD), increased vascular stiffness, vascular calcification, and increased cardiovascular morbidity (1, 4, 21, 26). End-stage renal disease patients undergoing dialysis show particularly increased cardiovascular morbidity and mortality. In an attempt to control serum phosphate levels, emerging treatments have focused on reducing P_i availability in the intestinal lumen by dietary restriction or by use of P_i binders (7–9). The effects and success of these measures are limited in part because of compliance issues and the side effect profile of P_i binders (6, 17). Although it would be desirable to identify specific inhibitors of intestinal P_i transport allowing specific modulation of P_i absorption, not much is known about the physiological regulation of P_i absorption in the small intestine and how

Address for reprint requests and other correspondence: H. Giral-Arnal, Division of Renal Diseases & Hypertension, Univ. of Colorado Denver, 12700 East 19th Ave., C-281, Research 2, Rm. 7450, Aurora, CO 80045 (e-mail: Hector.Giral-Arnal@ucdenver.edu).

metabolic conditions can affect the fine tuning of the regulation between intestinal P_i absorption and renal P_i reabsorption.

Low dietary P_i intake (11, 14), vitamin D (19), and estrogens (32) increase intestinal P_i reabsorption, whereas fibroblast growth factor-23 (22) and glucocorticoids (2) decrease intestinal P_i reabsorption. Dietary P_i intake and vitamin D are the most important regulators of P_i absorption in the intestine. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃], the active form of vitamin D, activates vitamin D receptor (VDR), inducing transcriptional upregulation of NaPi-2b in the small intestine. Chronic low- P_i diets induce an increase in serum 1,25-(OH)₂D₃ by activation of 1 α -hydroxylase in the kidney. This effect suggests that intestinal adaptation to a chronic low- P_i diet is mediated by vitamin D. However, low- P_i diet-induced upregulation of NaPi-2b is independent of 1,25-(OH)₂D₃ and VDR, since adaptation to a low- P_i diet is intact in VDR- and 1 α -hydroxylase-deficient mice (5).

In the present study, we have characterized the protein expression profile of NaPi-2b in the rat small intestine. Moreover, we have identified expression of the type III transporter PiT-1 in the apical membrane of the enterocytes. We have also studied the adaptation of these Na- P_i transporters to chronic and acute changes in dietary P_i . Our findings suggest that the duodenum and jejunum can play different roles in the adaptation to chronic vs. acute alterations of dietary P_i .

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets. Male Sprague-Dawley rats (8–10 wk old, 200–250 g body wt; Harlan, Madison, WI) were fed diets with different concentrations of phosphate: low (0.1%) P_i (diet TD.85010, Teklad, Madison, WI), normal (0.6%) P_i (diet TD.84122, Teklad), and high (1.2%) P_i (diet TD.85349, Teklad). The diets were otherwise matched for their calcium, magnesium, sodium, protein, fat, and vitamin D content. In the chronic adaptation studies, the rats were fed the different P_i diets ad libitum for 7 days. In the acute adaptation studies, the rats were fed the 0.1% P_i diet for 4 h in the morning for 7 consecutive days. On the day of the experiment, the rats were fed the 0.1% or 1.2% P_i diet for 4 h before the experiments. Normal drinking water was supplied ad libitum. We studied 18 rats in each experimental group.

The animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Colorado Denver.

Materials. All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO) except when noted. The polyclonal rabbit anti-NaPi-2b antibody was custom generated by Davids Biotechnologie (Regensburg, Germany) by injection of the peptide CKNLEEEKEQDVPVKAS (amino acids 644–661) located at the COOH terminus of the rat protein. Peptide conjugated to keyhole limpet hemocyanin was injected into two different rabbits. The affinity-purified antibody was used at 1:1,000 dilution for Western blotting and at 1:100 dilution for immunofluorescence. The rabbit anti-PiT-1 antibody was produced by Davids Biotechnologie using a method similar to that described for

polyclonal rabbit anti-NaPi-2b antibody, but with use of the peptide SLVAKGQEGIKWSELIK. Polyclonal rabbit PiT-1 antibody was used at 1:1,000 dilution for Western blotting. Another polyclonal chicken PiT-1 antibody raised against the same peptide was used successfully at 1:50 dilution for immunofluorescence. Specificity of all the antibodies was tested by blocking the signal with the corresponding antigenic peptide for Western blotting (see supplemental Fig. 1 in the online version of this article) and immunofluorescence microscopy.

Isolation of brush border membrane vesicles. Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (Pentothal, Abbott; 100 mg/kg ip). The renal vessels were clamped off, and the kidneys were removed and processed for brush border membrane (BBM) vesicle (BBMV) isolation, as described previously (12). The full small intestine (~90 cm) was removed, flushed with cold saline solution, and cut into sections as follows: duodenum [the first 10 cm (0–10 cm)], jejunum [the next 20 cm (10–30 cm)], and ileum [the last 30 cm (~60–90 cm)]. Mucosa scraped from each section was homogenized with a Polytron homogenizer in isolation buffer (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, and 15.2 mM Tris-HCl, pH 7.5). Homogenates were filtered through gauze to remove mucus and centrifuged at 38,000 g for 35 min at 4°C. The pellet was resuspended with isolation buffer and subjected to the first Mg²⁺ precipitation step (15 mM Mg²⁺ final concentration). After centrifugation at 2,500 g for 15 min at 4°C, the supernatant was transferred to a clean tube and centrifuged again at 38,000 g for 35 min at 4°C. The pellet was resuspended in isolation buffer and subjected to the second Mg²⁺ precipitation under the same conditions and centrifuged at 2,500 g for 15 min at 4°C. The supernatant was carefully transferred to a new tube and centrifuged at 38,000 g for 35 min at 4°C. The final pellet was resuspended in 50–100 µl of 300 mM mannitol and 16 mM HEPES-Tris (pH 7.5) supplemented with Complete Mini Roche protease inhibitor cocktail.

The purity of the BBMV preparation was analyzed by testing the specific activity of several enzymes in homogenate and final BBM fractions, resulting in >15-fold enrichment of the BBM specific enzyme activity compared with the homogenates (~17- and 65-fold enrichment for leucine aminopeptidase and γ-glutamyl transferase, respectively) and no significant enrichment of Na⁺-K⁺-ATPase, a specific marker of basolateral membrane (see supplemental Table 1).

Measurement of Na-Pi transport activity. Pi transport was measured by radioactive ³²P uptake in freshly isolated BBMV. Pi uptake in renal proximal tubule BBM was assayed as described elsewhere (33). ³²P uptake of intestinal BBM was measured in a similar way with some modifications. Briefly, 10 µl of isolated BBM prewarmed to 37°C were incubated with 40 µl of uptake buffer [150 mM NaCl, 16 mM HEPES (pH 7.5), and 0.1 mM K₂HPO₄] containing K₂H³²PO₄ tracer (Perkin Elmer Life Sciences). After 30 s of incubation at 37°C,

uptake buffer was quickly removed by rapid Millipore filtration and washed with ice-cold stop solution (100 mM NaCl, 100 mM mannitol, and 5 mM HEPES, pH 7.5). All uptake measurements were performed in triplicate and expressed as specific activity (pmol P_i·30 s⁻¹·mg BBM protein⁻¹). Na-independent uptake was measured after substitution of choline chloride for NaCl in the uptake buffer. The Na-independent component was subtracted from the total uptake.

Immunoblotting. Intestinal or renal BBM protein (20 µg) was separated by 7.5% or 10% SDS-PAGE (Criterion, Bio-Rad, Hercules, CA) and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked for 30 min at room temperature with 5% milk in PBS-Tween 20 buffer (80 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.5) and then incubated with primary antibodies for 2 h at room temperature. After three washes with PBS-Tween 20 buffer, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibodies diluted 1:10,000 for 1 h at room temperature. Enzymatic detection of horseradish peroxidase was carried out by incubation in Supersignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL) using the charge-coupled device imaging system in a Bio-Rad imager. Band intensities were quantified using Quantity One software and normalized vs. β-actin (mouse β-actin, Sigma) as control for total protein loading.

Immunofluorescence microscopy. A section of small intestine was removed in all its extension and flushed with cold saline solution. Sections (0.5 cm long) were cut every 10 cm along the entire small intestine. Each section was embedded in optimal cutting temperature compound and “flash-frozen” in liquid nitrogen, and samples were stored at -80°C. Cryostat sections (6 µm) were fixed with acetone at -20°C for 5 min and then washed and incubated with antibodies in PBS. Polyclonal rabbit anti-NaPi-2b antibody was used at 1:100 dilution with overnight incubation at 4°C. Polyclonal chicken anti-PiT-1 antibody was used at 1:50 dilution with overnight incubation at 4°C. Specific secondary antibody link to the fluorescent dye Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA) was incubated for 1 h at room temperature. Fluorescence images were acquired on a laser scanning confocal microscope (model 510, Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY).

RNA isolation and analysis. Sections of small intestine (see above) were flushed with cold saline solution and homogenized with a Polytron in the presence of RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA). Total RNA was isolated from the resulting homogenates using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using reverse transcription reagents (Bio-Rad). Using a Bio-Rad iCycler real-time PCR machine, we determined mRNA levels using the following primers: rat NaPi-2b [5'-CAGAAGGCCAGAACAA-GAG-3' (forward) and 5'-CCAGCAATATGAAGGAGAGG-3' (re-

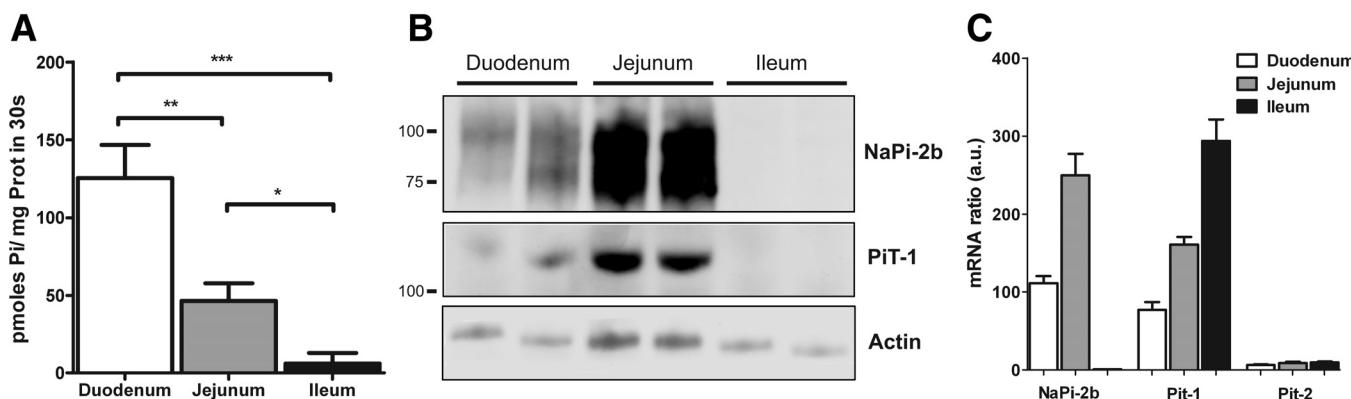


Fig. 1. Expression profile of Na-Pi transporter activity, protein, and mRNA along the small intestine of rats ($n = 6$) fed the 0.6% Pi diet ad libitum. A: brush border membrane vesicle (BBMV) Na-dependent Pi uptake activity in small intestinal segments. B: BBMV expression of NaPi-2b and PiT-1 protein showing specific signal in duodenum and jejunum, but not ileum, of rats; 20 µg of protein were loaded per well. C: type II (NaPi-2b) and type III (PiT-1, PiT-2) Na-Pi transporter mRNA abundance determined by quantitative PCR in rats. AU, arbitrary units. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

verse)], rat PiT-1 [5'-TGGCTCTGTCAGTGCTATG-3' (forward) and 5'-CAGTTGGACCATTGATACC-3' (reverse)], and rat PiT-2 [5'-GTGGATGGAACCTCGTCAAG-3' (forward) and 5'-CAGGAT-GAACAGCACACC-3' (reverse)]. All the data were calculated from triplicate reactions. Cyclophilin was used as an internal control, and the amount of RNA was calculated by the comparative cycle threshold method, as recommended by the manufacturer.

Statistical analysis. Data were analyzed for statistical significance by unpaired Student's *t*-test. Values are means \pm SE. Six animals were used per condition in each experiment, and each experiment was repeated three times.

RESULTS

Characterization of specific antibodies against NaPi-2b and PiT-1. A rabbit polyclonal antibody was raised against a COOH-terminal peptide of rat NaPi-2b. Western blot analyses

of intestinal BBM of chronically fed rats resulted in recognition of two bands of \sim 85 and \sim 110 kDa (and a third \sim 130-kDa band under chronic adaptation) (Fig. 1; see Fig. 4). Previous studies have described, in rat and mouse, different-sized bands related to different degrees of glycosylation (2, 32). Immunofluorescence microscopy of intestinal sections using the same antibody stained the apical membrane of the enterocytes on the villi (Fig. 2).

A specific peptide located in the extracellular loop between the fourth and fifth transmembrane domain of rat PiT-1 was used to raise polyclonal antibodies. Rabbit anti-PiT-1 was successfully used for detection of PiT-1 by Western blot. A single sharp band at \sim 120 kDa corresponding to PiT-1 was detected in BBM derived from rat small intestine. A different antibody raised in chicken against the same peptide was needed

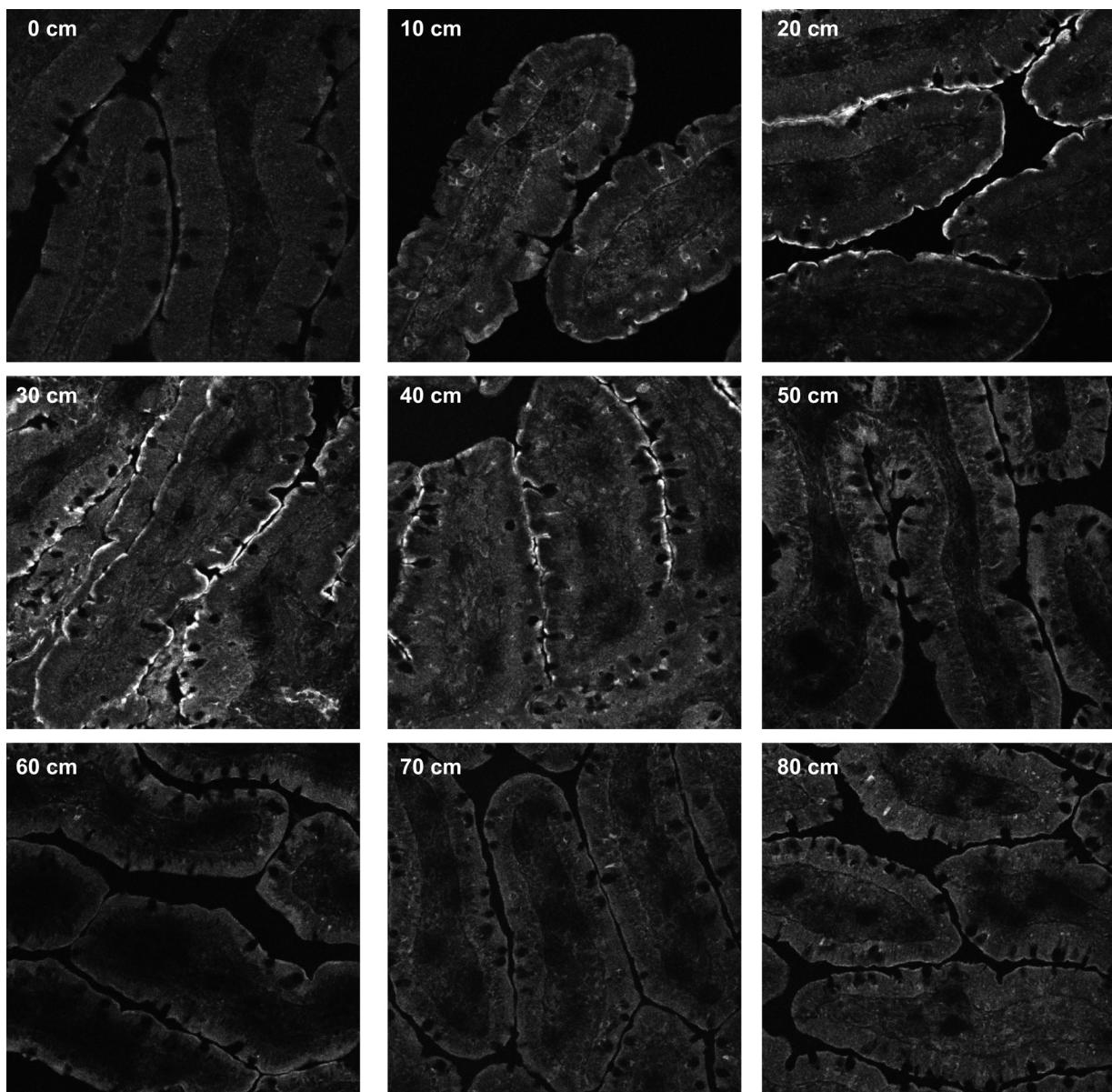


Fig. 2. Immunofluorescence microscopy of rat small intestine sections showing NaPi-2b expression on apical membrane of enterocytes. NaPi-2b signal is weak in duodenum (0–10 cm), intense in jejunum (20–40 cm), and negligible in ileum (50–80 cm). Sections (0.5 cm) were obtained from rats that were chronically fed the low-P_i (0.1%) diet, fixed with methanol, stained with anti-NaPi-2b antibody, and examined at 10-cm intervals along the small intestine.

for immunofluorescence microscopy. The specificity of the antibodies was tested by blocking with the corresponding antigenic peptide (see supplemental Fig. 1).

Expression of $\text{Na}-\text{P}_i$ transporters along rat small intestine. P_i uptake assays in BBMV were performed to evaluate transcellular P_i absorption in the different segments of the small intestine. The Na -independent component, determined after substitution of choline chloride for NaCl in the buffer, was a small portion of the total P_i uptake (see supplemental Fig. 3) and was subtracted from total uptake. P_i uptake measurements of intestinal BBMV showed that Na -dependent P_i activity was higher in the duodenum and jejunum and negligible in the ileum (Fig. 1A).

The expression profile of NaPi-2b protein along the rat small intestine coincides with the distribution of the transcellular P_i uptake activity, with expression of the transporter in the duodenum and jejunum (Fig. 1B). However, NaPi-2b protein expression is significantly higher in the jejunum, whereas NaPi-2b uptake activity in BBMV is higher in the duodenum.

NaPi-2b has been considered the main $\text{Na}-\text{P}_i$ transporter involved in intestinal P_i absorption. In view of the recent characterization of the expression and regulation of the renal proximal tubular apical membrane type III $\text{Na}-\text{P}_i$ transporter PiT-2 (31), we also examined the mRNA expression levels of the type III $\text{Na}-\text{P}_i$ transporters in the small intestine. PiT-1 mRNA was expressed in all three intestinal segments, with the highest expression in the ileum (Fig. 1C). However, PiT-2 mRNA expression was minimal along the entire small intestine compared with the other two $\text{Na}-\text{P}_i$ transporters (Fig. 1C).

We found specific expression of PiT-1 protein in the apical membrane of the enterocytes. It was assumed that PiT-1 is located in the basolateral membrane (3, 15). We confirmed the expression of PiT-1 protein in BBM of the duodenum and jejunum, but not in the ileum, by Western blot (Fig. 1B). PiT-1 protein shows the same expression pattern as NaPi-2b, with higher protein levels in the jejunum than duodenum, which suggests that PiT-1 could play a role in transcellular P_i absorption in these segments.

The expression of NaPi-2b and PiT-1 protein in the apical membrane of the enterocytes was confirmed by immunostaining of small intestinal sections and colocalization with phal-

loidin-stained actin (see supplemental Fig. 2). The expression profile along the entire small intestine of NaPi-2b protein by immunofluorescence microscopy paralleled the expression profile shown by Western blotting: lower NaPi-2b expression in the duodenum (corresponding to 0 and 10 cm in Fig. 2) and higher NaPi-2b expression in the jejunum (corresponding to 20, 30, and 40 cm). Expression of NaPi-2b protein in the ileum was also undetectable by immunofluorescence, in accordance with the Western blot results.

Effects of chronic alterations of dietary P_i on regulation of intestinal $\text{Na}-\text{P}_i$ transporter activity, protein, and mRNA. Intestinal BBMV were isolated from rats chronically fed the 0.1, 0.6, or 1.2% P_i diet. P_i uptake activity was determined in BBMV isolated from the duodenum and jejunum (Fig. 3). Jejunal BBMV isolated from rats chronically fed the low- P_i (0.1%) diet showed a 67% increase in the Na -dependent P_i uptake compared with BBMV isolated from rats fed the normal- P_i (0.6%) or high- P_i (1.2%) diet. However, there were no significant differences in the duodenal BBMV P_i transport activity among the three P_i diets.

Kidney BBMV isolated from the same animals showed, as expected, a progressive and stepwise upregulation of $\text{Na}-\text{P}_i$ uptake with the 0.6% and 0.1% P_i diets compared with the 1.2% P_i diet (Fig. 3). In contrast to the kidney, there was no progressive stepwise increase in $\text{Na}-\text{P}_i$ activity in the jejunum, with no significant differences between the 0.6% and 1.2% P_i diets.

NaPi-2b and PiT-1 protein levels were determined in BBMV isolated from the duodenum and jejunum by Western blotting (Fig. 4, A and B). Duodenal BBM did not show significant changes in NaPi-2b expression. However, BBM isolated from the jejunum of rats fed the 0.1% P_i diet showed an upregulation of NaPi-2b total protein expression. Although the 85-kDa band showed a marked upregulation, the 110-kDa band did not show significant changes. Moreover, a new larger (\sim 130-kDa) band appeared also to be upregulated in rats fed the 0.1% P_i diet. PiT-1 protein expression in BBM did not change in the duodenum or jejunum as a function of dietary P_i .

Quantification of mRNA levels of the $\text{Na}-\text{P}_i$ cotransporters showed a significant increase of NaPi-2b mRNA levels in the jejunum of rats fed the 0.1% P_i diet. This implies that chronic

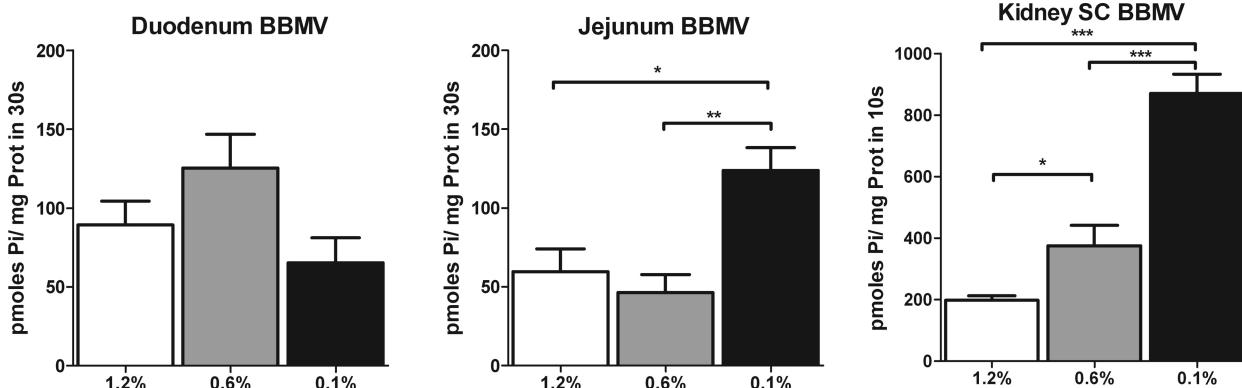


Fig. 3. Effects of dietary P_i on intestinal and renal BBMV P_i transport activity. NaPi-2b transporter uptake was measured in BBMV of duodenum (A) and jejunum (B) of rats chronically fed high- P_i (1.2%), normal- P_i (0.6%), or low- P_i (0.1%) diet. P_i uptake in BBMV from jejunum was increased 67% in rats fed the low- P_i diet compared with rats fed the high- P_i diet (59.6 ± 14.2 , 46.3 ± 11.4 , and 123.9 ± 14.3 pmol $\text{P}_i \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ for rats fed 1.2%, 0.6%, and 0.1% P_i , respectively). No significant regulation is observed in BBMV from duodenum. C: progressive upregulation of phosphate uptake in BBMV isolated from kidney superficial cortex (SC-BBMV) in rats fed normal- P_i and low- P_i diet compared with rats fed high- P_i diet. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

adaptation to the low-P_i diet is at least in part mediated by transcriptional mechanisms (Fig. 5). NaPi-2b mRNA expression was unchanged in the duodenum. Furthermore, there were no changes in PiT-1 mRNA levels in either of these intestinal segments.

Intestinal sections of the proximal and distal jejunum (30, 40, and 50 cm) were stained with antibodies against NaPi-2b and analyzed by immunofluorescence. There was a marked increase in NaPi-2b protein intensity in the apical membrane of the enterocytes in the jejunum of rats fed the low-P_i diet (Fig. 6), confirming the results obtained by Western blotting.

Changes in serum P_i levels under different dietary P_i conditions. We measured serum P_i concentration of rats fed the different P_i diets. It was clear that the adaptation to the different dietary P_i conditions induced dramatic changes in the serum P_i levels in the rat. First, rats fed the high- and normal-P_i diets ad libitum showed 1.7- and 1.5-fold increases, respectively, in

serum P_i compared with rats fed the low-P_i diet (8.3 ± 0.9 vs. 7.4 ± 0.7 vs. 4.9 ± 0.6 mg P_i/dl). Rats fed acutely the low-P_i diet after 20 h of fasting showed the same serum P_i level as rats fed the low-P_i diet ad libitum (Fig. 7). However, when the rats were fed acutely the high-P_i diet, there was a drastic (>3-fold) increase in serum P_i levels 2 and 4 h after feeding (4.7 ± 0.2 vs. 14.6 ± 4.3 vs. 17.2 ± 1.8 mg P_i/dl). This marked increase in serum P_i levels suggests a regulatory increase in the P_i absorption rate in the small intestine as a result of acute feeding of the high-P_i diet.

In rats chronically adapted to a low-P_i diet, acute feeding of a high-P_i diet induces a marked increase in intestinal P_i absorption in the duodenum, resulting in a dramatic increase in serum P_i. For these studies, rats were trained to eat their diets during a 4-h period everyday for 7 days. On the 8th day, rats that were chronically adapted on a low-P_i diet were fed acutely a low-P_i diet or a high-P_i diet for 4 h. In BBMV

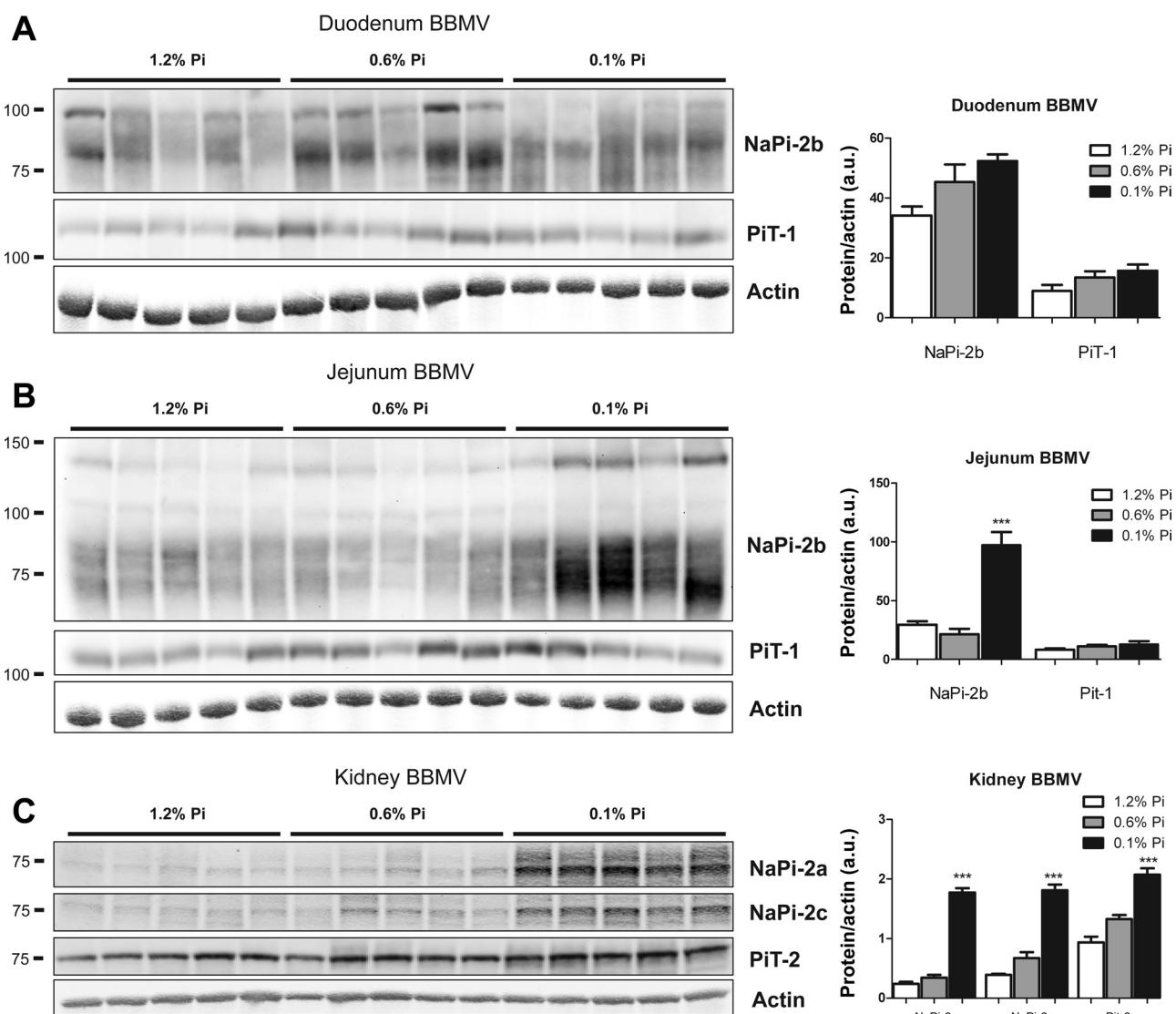


Fig. 4. BBMV Na-P_i protein regulation in rats chronically fed high-, normal-, or low-P_i diet. BBMV NaPi-2b and PiT-1 protein abundance was determined by Western blot analysis in duodenum (A) and jejunum (B). NaPi-2b protein abundance is markedly and significantly increased in response to chronic low-P_i diet in jejunal BBMV. There is a gradual increase in duodenal BBMV NaPi-2b abundance that did not reach statistical significance. C: upregulation of NaPi-2a, NaPi-2c, and PiT-2 protein abundance in kidney SC-BBMV in response to chronic low-P_i diet. Densitometry analysis was performed for each section; results were normalized to actin expression. ***P < 0.001.

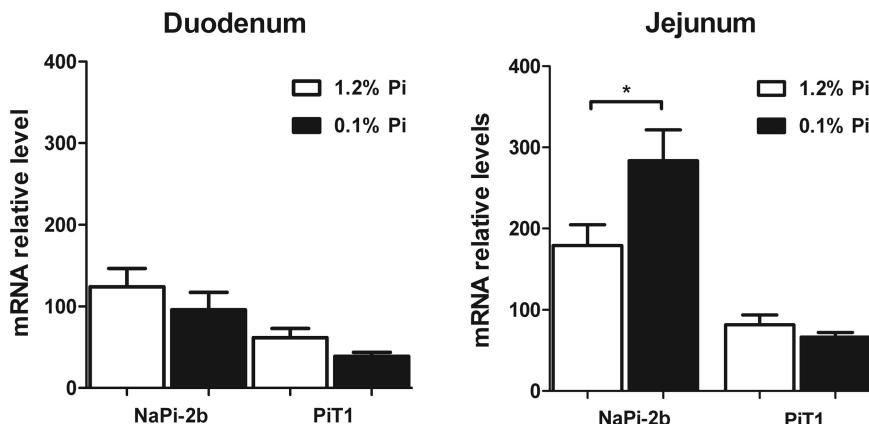


Fig. 5. Intestinal Na-P_i mRNA regulation in rats chronically fed high- or low-P_i diet. In jejunum, NaPi-2b mRNA abundance is increased in parallel with increases in BBM NaPi-2b protein abundance and BBM P_i uptake in response to chronic low-P_i diet. There are no changes in jejunal PiT-1 mRNA or duodenal NaPi-2b or PiT-1 mRNA abundance in response to low-P_i diet. *P < 0.05.

isolated from the duodenum, there was a fivefold increase in the P_i uptake rate when the rats were switched from a chronic low-P_i to an acute high-P_i diet (Fig. 8). In contrast, in BBMV isolated from the jejunum, there was no change in P_i uptake under the same conditions, indicating a regulatory adaptation different from that in chronic conditions.

The increased P_i uptake activity in the duodenal segment can explain the marked and dramatic increase in the serum P_i levels observed in rats fed acutely a high-P_i diet (Fig. 7). In contrast to the duodenum, in BBMV isolated from the kidney, in the same experiments and in parallel, there was an adaptive decrease in BBM Na-P_i transport activity (Fig. 8).

The increase in BBMV P_i uptake in the duodenum was associated with an increase in NaPi-2b protein abundance in the absence of any changes in PiT-1 protein abundance (Fig. 9). There

were no changes in NaPi-2b or PiT-1 protein abundance in BBM isolated from the jejunum, and also there were no changes in NaPi-2b mRNA abundance in the duodenum or jejunum (Fig. 10).

DISCUSSION

Cardiovascular disease in CKD patients has emerged as one of the main causes of morbidity and mortality. CKD-associated hyperphosphatemia is one of the factors that can promote vascular stiffness and vascular calcification and is one of the pharmacological targets selected to reduce the impact on cardiovascular disease (1, 21). Although there are treatments to reduce hyperphosphatemia, a detailed knowledge of the mechanisms of intestinal P_i absorption and its regulation by dietary

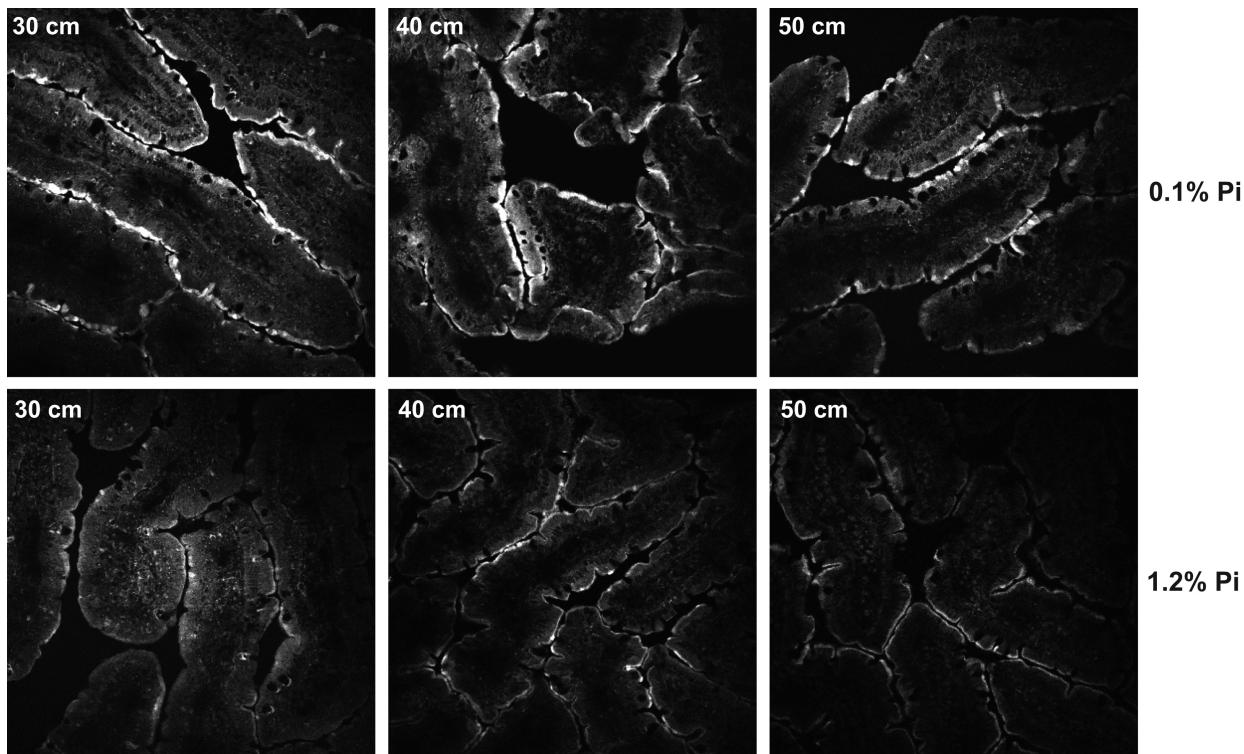
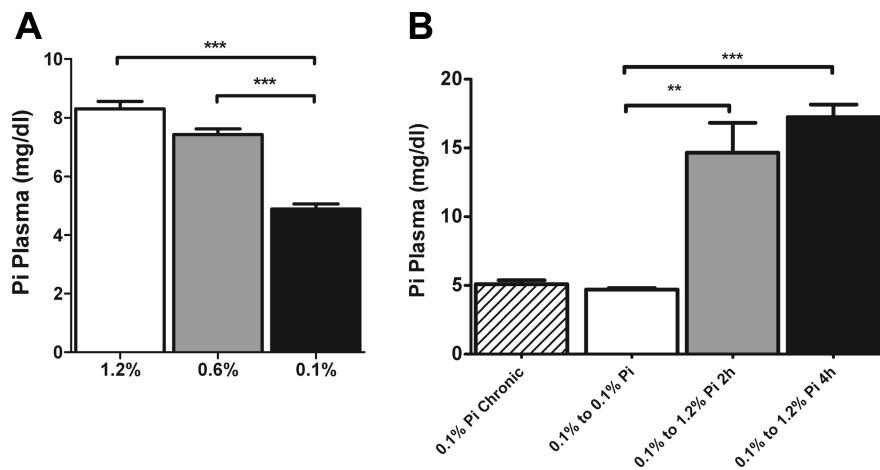


Fig. 6. Immunofluorescence microscopy of NaPi-2b protein in intestinal sections corresponding to rat jejunum (30–50 cm). Abundance of NaPi-2b protein is increased in apical membrane of enterocytes in rats chronically fed low-P_i diet. Sections were embedded in optimal cutting temperature compound, fixed with methanol, and stained with anti-NaPi-2b antibody.

Fig. 7. Effects of dietary P_i on serum P_i levels. A: serum P_i levels of rats chronically fed high-, normal-, or low-P_i diet. Serum P_i concentration is significantly lower in rats chronically fed low-P_i diet than in rats fed high- or normal-P_i diet. B: serum P_i concentration is markedly increased (to levels as high as 16 mg/dl) in rats chronically fed low-P_i diet when they are acutely fed high-P_i diet as early as 2 h after the high-P_i diet. There are no significant changes in serum P_i concentrations between rats chronically low-P_i diet and those trained to eat a low-P_i diet for 4 h/day for 7 days and then acutely fed the same low-P_i diet (chronic low-P_i diet to acute low-P_i diet). **P < 0.01. ***P < 0.001.



P_i uptake is crucial for development of more efficient and specific treatment modalities.

In this study, we found that NaPi-2b protein expression is highest in the BBM of rat jejunum. This finding is in agreement with a previous study that showed the highest NaPi-2b mRNA expression in rat jejunum as well (19). However, it was surprising that BBM Na-P_i cotransport activity was highest in the duodenum, despite lower NaPi-2b protein and mRNA expression than in the jejunum. The equilibrium values of P_i uptake determined in duodenal and jejunal BBMV were very similar, suggesting that this discrepancy was not induced by differences in intravesicular space/total protein rates (see supplemental Fig. 4). Posttranslational modification of NaPi-2b protein and/or the presence of additional Na-P_i transporters playing different roles in the duodenum and the jejunum could explain the discrepancy between Na-P_i cotransport activity and NaPi-2b protein expression. Posttranslational modifications of NaPi-2b described in previous studies include glycosylation (2), ubiquitination (25), and palmitoylation (20). However, the role of these modifications in modulation of the activity or trafficking of the intestinal Na-P_i transporters needs to be determined.

In regard to the potential presence of additional Na-P_i transporters, we also identified PiT-1 expression in the small intestine. Expression of type III Na-P_i transporters in the small intestine was detected by mRNA analysis (3, 14). Until recently, type III Na-P_i transporters (PiT-1 and PiT-2) were

assumed to be expressed ubiquitously, acting like P_i housekeeping basolateral transporters (3, 14). However, we report here PiT-1 expression in the apical membrane of enterocytes, suggesting that PiT-1 could play a role in P_i absorption in the small intestine under physiological conditions. This conclusion is supported by the partial inhibition of P_i transport activity in jejunal BBMV by low concentrations of phosphonoformic acid (18) (see supplemental Fig. 5). Several studies have shown that phosphonoformic acid is a stronger inhibitor for type II Na-P_i transporters (NaPi-2b) but a weaker inhibitor of type III Na-P_i transporters (PiT-1 and PiT-2) (27, 30). PiT-1 protein also showed an expression pattern similar to that of NaPi-2b protein, with higher levels in the duodenum and jejunum. However, the relative importance of PiT-1 in transcellular P_i absorption and the putative role of posttranscriptional regulation of the activity of both transporters need to be determined.

Our results suggest that intestinal P_i absorption in rats is concentrated in the duodenum and jejunum and is negligible in the ileum, in accordance with previous studies. However, caution is needed in evaluating the data derived from *in vitro* studies. Using a compartmental analysis method, Kayne et al. (16) showed that the final part of the ileum, or distal segment 2, can play a role as important as the duodenum in intestinal P_i absorption. Although the P_i absorption rate is 50 times higher in the duodenum than in the ileum, the mean residence time of P_i is much higher in the last section, resulting in similar P_i absorption rates. Whether low

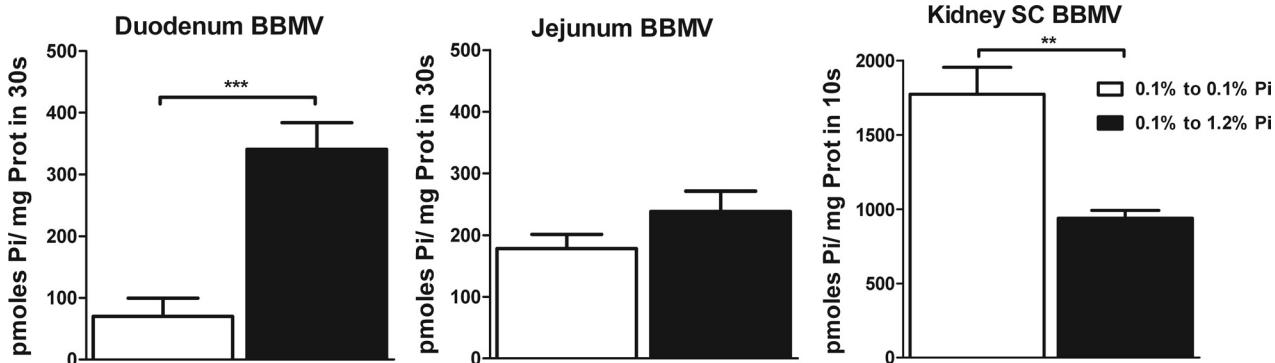


Fig. 8. Na-dependent P_i uptake in BBMV of rats chronically adapted to a low-P_i diet and then fed low- or high-P_i diet for 4 h. Duodenal and jejunal BBMV show an unexpected reverse adaptation to the change from low- to high-P_i diet compared with renal BBMV. Duodenal and jejunal BBMV demonstrate an increased Na-P_i transport activity, whereas kidney superficial cortex BBMV (SC BBMV) show a decreased Na-P_i transport activity, in response to an acute challenge with high-P_i diet. **P < 0.01. ***P < 0.001.

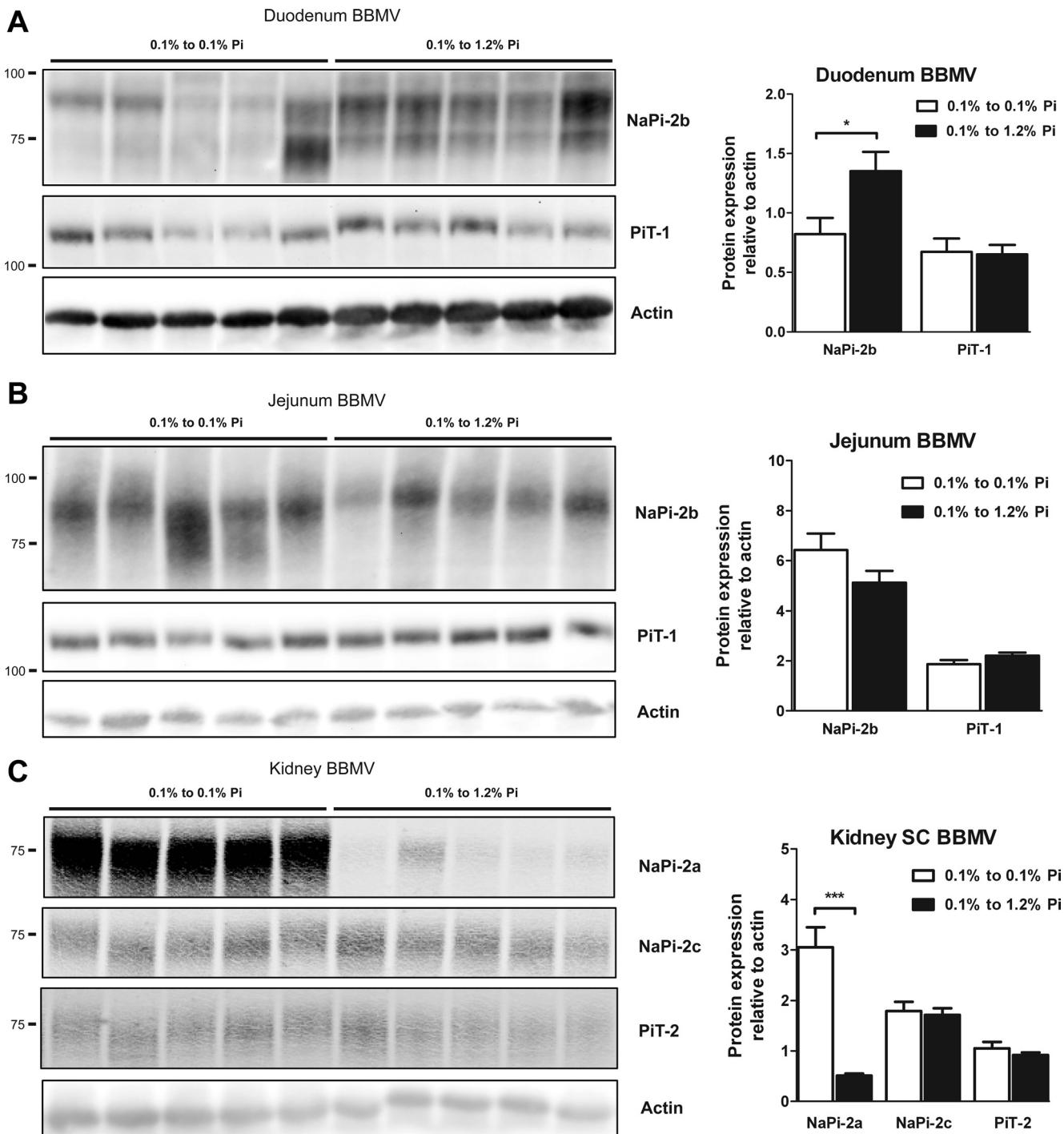
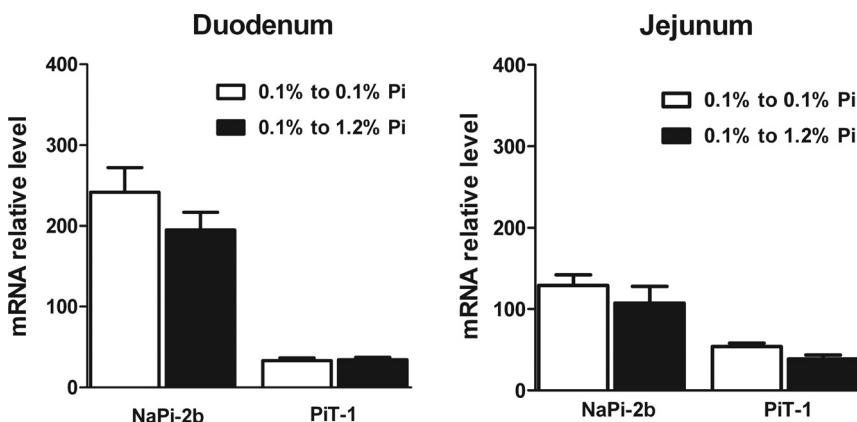


Fig. 9. Duodenal (A), jejunal (B), and renal (C) BBMV Na-Pi protein regulation in rats chronically adapted to low-Pi diet and then fed low- or high-Pi diet for 4 h. There is a significant increase in duodenal BBMV NaPi-2b protein abundance. No significant changes in NaPi-2b protein expression in jejunal BBMV or duodenal and jejunal PiT-1 protein expression were observed. In kidney superficial cortex BBMV, there is a marked and significant decrease in NaPi-2a protein abundance, whereas there are no changes in NaPi-2c or PiT-2 protein abundance in response to acute high-Pi diet for 4 h. * $P < 0.05$. *** $P < 0.001$.

expression levels of NaPi-2b or PiT-1 in the ileum contribute to this component of the total Pi absorption is unknown. In this study, we were not able to detect apical expression of NaPi-2b or PiT-1 transporters in the ileum. Paracellular transport is also contributing to the overall transport of Pi and, most likely, could be also regulated under different dietary conditions. Although we have not studied the contribution of the paracellular transport,

other recent studies have addressed the relative importance of both pathways. Eto et al. (9) used voltage-clamp analysis to differentiate the paracellular from the transcellular component of rat jejunum. Their results show a more important role of the transcellular pathway under these experimental conditions and indicate a greater contribution to Pi permeation by the transcellular than the paracellular route, with contributions of 78% and 22%, respec-

Fig. 10. NaPi-2b and PiT-1 mRNA regulation in rats chronically adapted to low-P_i diet and then fed low- or high-P_i diet for 4 h. There are no significant changes in NaPi-2b or PiT-1 mRNA abundance in response to acute (4 h) changes in dietary P_i.



tively. More recently, using inducible NaPi-2b knockout mice, Sabbagh et al. (28) also showed the importance of the NaPi-2b transporter in intestinal P_i absorption.

Our study also established the regulation of NaPi-2b and PiT-1 transporters with chronic and acute changes in dietary P_i intake. Jejunal transcellular P_i absorption rate, evaluated as BBMV Na-P_i uptake activity, is increased in animals adapted to a chronic low-P_i (0.1%) diet for 7 days compared with animals adapted to normal-P_i (0.6%) and high-P_i (1.2%) diets. In contrast, no significant response is observed in duodenal BBMV. The increase in Na-P_i transport activity is associated with parallel increases in NaPi-2b protein and mRNA in the jejunum, whereas PiT-1 did not show significant changes in protein or mRNA levels. In the kidney, the increase in BBM Na-P_i cotransport activity was paralleled by increases in BBM NaPi-2a, NaPi-2c, and PiT-2 protein abundance. Combined adaptation of the intestinal jejunum and kidney proximal tubule to increased P_i absorption rate in the small intestine and P_i reabsorption in the kidney may be designed to allow the rats to maintain P_i homeostasis. However, this adaptive mechanism is not completely able to maintain serum P_i levels in animals fed a low-P_i diet, as indicated by a significantly lower serum P_i in rats fed a low-P_i diet (7.4 ± 0.7 and 4.9 ± 0.6 mg P_i/dl in rats fed a normal- and a low-P_i diet, respectively).

In contrast, rats fed a low-P_i diet for 1 wk and then acutely adapted to a high-P_i diet show an unexpected marked increase in duodenal BBM Na-P_i cotransport activity associated with a parallel increase in duodenal BBM NaPi-2b protein abundance in the absence of significant changes in the jejunum. More interestingly, these animals show a marked increase in serum P_i after 2 and 4 h on the high-P_i diet. The unexpected increase in duodenal Na-P_i cotransport activity and NaPi-2b protein expression contributes to the transitory hyperphosphatemia and, therefore, represents a fully maladaptive response.

Most human physiological studies have focused on random or fasting measurements of P_i serum, but recent studies have addressed the postprandial adaptive changes in response to different levels of dietary P_i. In subjects fed a high-P_i diet, a significant postprandial elevation of serum P_i, with a peak value exceeding the normal range at 2 h, was observed (24). However, high-P_i diet-induced hyperphosphatemia seems to be milder in humans than in rats (13, 24). The increase in serum P_i (from 3.5 to 5.0 mg/dl) was not as dramatic as that in our rats fed the high-P_i diet (from 5 to 17 mg/dl). Nevertheless, these postprandial changes in serum P_i have also been associated

with increased risk of cardiovascular disease, even in healthy subjects (29).

CKD patients could be even more susceptible to the postprandial transitory hyperphosphatemia. First, they have impaired P_i renal excretion and hormonal adaptive response complicating P_i homeostasis. Moreover, they are often under dietary P_i restriction and P_i binder treatment (equivalent to a low-P_i diet in our study), which could induce a higher response of the duodenum, as we show in our study. For these reasons, NaPi-2b may be considered a target for specific therapy to prevent hyperphosphatemia and its associated complications, especially in CKD patients.

In contrast, as expected, there was a decrease in renal BBM Na-P_i cotransport activity that was accompanied by decreases in BBM NaPi-2a, but not NaPi-2c and PiT-2, protein abundance. It has been proposed that the renal Na-P_i transporters have a different temporal response to different stimuli (23, 31). NaPi-2a shows the fastest response to acute changes in dietary phosphate, whereas the other transporters need more time to adapt their expression. However, the fast downregulation of NaPi-2a to compensate for the P_i overload did not prevent the postprandial increase in serum P_i after 4 h of refeeding.

In conclusion, we determined the protein expression of the Na-P_i transporters NaPi-2b and PiT-1 in the apical membrane of rat enterocytes. NaPi-2b plays a major role in the adaptation to chronic and acute alterations in dietary phosphate, whereas the relative contribution of PiT-1 to intestinal P_i absorption remains to be determined. The dietary adaptation of NaPi-2b in the duodenum is different from that in the jejunum, suggesting different regulatory mechanisms. Although the jejunum seems to play a more important role in the chronic adaptation to a low-P_i diet, the duodenum plays a major role in the acute response to a high-P_i diet, with the increase in P_i reabsorption inducing an increase in serum P_i. Transitory postprandial hyperphosphatemia after a high-P_i diet is induced, at least partially, by increased NaPi-2b activity in the duodenum, suggesting that NaPi-2b could be a potential target for treatment of hyperphosphatemia.

GRANTS

This study was supported by National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grant R01 DK-066029 (to M. Levi and N. Barry), American Heart Association Postdoctoral Fellowship Award 0520054Z (to S. Breusegem) and Scientist Development Grant 0830394N (to J. Blaine), National Institute on Aging Minority Fellowship 3R01 AG-026529 (to Y. Caldas), and Genzyme Award PN200708-073 (to M. Levi and H. Giral).

REFERENCES

- Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, Kestenbaum BR. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 20: 381–387, 2009.
- Arima K, Hines ER, Kiela PR, Drees JB, Collins JF, Ghishan FK. Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIb Na-Pi cotransporter during ontogeny. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G426–G434, 2002.
- Bai L, Collins JF, Ghishan FK. Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1135–C1143, 2000.
- Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium \times phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 31: 607–617, 1998.
- Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, St-Arnoud R, Murer H, Biber J. Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1 α -OHase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C429–C434, 2005.
- Cizman B. Hyperphosphataemia and treatment with sevelamer in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 5: v47–v49, 2003.
- Cozzolino M, Staniforth ME, Liapis H, Finch J, Burke SK, Dusso AS, Slatopolsky E. Sevelamer hydrochloride attenuates kidney and cardiovascular calcifications in long-term experimental uremia. *Kidney Int* 64: 1653–1661, 2003.
- Cozzolino M, Brancaccio D. Hyperphosphatemia in dialysis patients: the therapeutic role of lanthanum carbonate. *Int J Artif Organs* 30: 293–300, 2007.
- Eto N, Tomita M, Hayashi M. NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats. *Drug Metab Pharmacokinet* 21: 217–221, 2006.
- Friedman EA. An introduction to phosphate binders for the treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* S2–S6, 2005.
- Hattenhauer O, Traebert M, Murer H, Biber J. Regulation of small intestinal Na-Pi type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277: G756–G762, 1999.
- Inoue M, Digman MA, Cheng M, Breusegem SY, Halaihel N, Sorribas V, Mantulin WW, Grattan E, Barry NP, Levi M. Partitioning of NaPi cotransporter in cholesterol-, sphingomyelin-, and glycosphingolipid-enriched membrane domains modulates NaPi protein diffusion, clustering, and activity. *J Biol Chem* 279: 49160–49171, 2004.
- Isakova T, Gutierrez O, Shah A, Castaldo L, Holmes J, Lee H, Wolf M. Postprandial mineral metabolism and secondary hyperparathyroidism in early CKD. *J Am Soc Nephrol* 19: 615–623, 2008.
- Katai K, Miyamoto K, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, Tani Y, Arai H, Tatsumi S, Morita K, Taketani Y, Takeda E. Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 343: 705–712, 1999.
- Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, Miller AD. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7071–7075, 1994.
- Kayne LH, D'Argenio DZ, Meyer JH, Hu MS, Jamgotchian N, Lee DB. Analysis of segmental phosphate absorption in intact rats. A compartmental analysis approach. *J Clin Invest* 91: 915–922, 1993.
- Kestenbaum B. Phosphate metabolism in the setting of chronic kidney disease: significance and recommendations for treatment. *Semin Dial* 20: 286–294, 2007.
- Loghman-Adam M, Levi M, Scherer SA, Motock GT, Totzke MT. Phosphonoformic acid blunts adaptive response of renal and intestinal Pi transport. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 265: F756–F763, 1993.
- Marks J, Srai SK, Biber J, Murer H, Unwin RJ, Debnam ES. Intestinal phosphate absorption and the effect of vitamin D: a comparison of rats with mice. *Exp Physiol* 91: 531–537, 2006.
- McHaffie GS, Graham C, Kohl B, Strunk-Warnecke U, Werner A. The role of an intracellular cysteine stretch in the sorting of the type II Na/phosphate cotransporter. *Biochim Biophys Acta* 1768: 2099–2106, 2007.
- Menon V, Greene T, Pereira AA, Wang X, Beck GJ, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS, Sarnak MJ. Relationship of phosphorus and calcium-phosphorus product with mortality in CKD. *Am J Kidney Dis* 46: 455–463, 2005.
- Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 9: 331–335, 2005.
- Moe OW. PiT-2 coming out of the pits. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F689–F690, 2009.
- Nishida Y, Taketani Y, Yamanaka-Okumura H, Imamura F, Taniguchi A, Sato T, Shuto E, Nashiki K, Arai H, Yamamoto H, Takeda E. Acute effect of oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men. *Kidney Int* 70: 2141–2147, 2006.
- Palma M, Dieter M, Speil A, Bohmer C, Mack AF, Wagner HJ, Klingel K, Kandolf R, Murer H, Biber J, Closs EI, Lang F. Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G143–G150, 2004.
- Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S, Amin N, Dillon M, Burke SK, Chertow GM. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* 39: 695–701, 2002.
- Ravera S, Virkki LV, Murer H, Forster IC. Deciphering PiT transport kinetics and substrate specificity using electrophysiology and flux measurements. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C606–C620, 2007.
- Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, Schiavi SC. Intestinal Npt2b is an active component of systemic phosphate regulation. *J Am Soc Nephrol*. In press.
- Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, Nashiki K, Amo K, Yamamoto H, Higashi Y, Nakaya Y, Takeda E. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *J Am Soc Nephrol* 20: 1504–1512, 2009.
- Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1030–1036, 2007.
- Villa-Bellosta R, Ravera S, Sorribas V, Stange G, Levi M, Murer H, Biber J, Forster IC. The Na⁺-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F691–F699, 2009.
- Xu H, Uno JK, Inouye M, Xu L, Drees JB, Collins JF, Ghishan FK. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G1317–G1324, 2003.
- Zajicek HK, Wang H, Puttaparthi K, Halaihel N, Markovich D, Shayman J, Beliveau R, Wilson P, Rogers T, Levi M. Glycosphingolipids modulate renal phosphate transport in potassium deficiency. *Kidney Int* 60: 694–704, 2001.

Liver X receptor-activating ligands modulate renal and intestinal sodium-phosphate transporters

Yupanqui A. Caldas^{1,2}, Hector Giral¹, Michael A. Cortázar^{1,3}, Eileen Sutherland¹, Kayo Okamura¹, Judith Blaine¹, Victor Sorribas², Hermann Koepsell⁴ and Moshe Levi¹

¹Department of Medicine, Division of Renal Diseases and Hypertension, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado, USA;

²Laboratory of Molecular Toxicology, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; ³Department of Chemistry, Universidad del Valle, Cali, Colombia, USA and ⁴Institute of Anatomy and Cell Biology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Cholesterol is pumped out of the cells in different tissues, including the vasculature, intestine, liver, and kidney, by the ATP-binding cassette transporters. Ligands that activate the liver X receptor (LXR) modulate this efflux. Here we determined the effects of LXR agonists on the regulation of phosphate transporters. Phosphate homeostasis is regulated by the coordinated action of the intestinal and renal sodium-phosphate (NaPi) transporters, and the loss of this regulation causes hyperphosphatemia. Mice treated with DMHCA or TO901317, two LXR agonists that prevent atherosclerosis in ApoE or LDLR knockout mice, significantly decreased the activity of intestinal and kidney proximal tubular brush border membrane sodium gradient-dependent phosphate uptake, decreased serum phosphate, and increased urine phosphate excretion. The effects of DMHCA were due to a significant decrease in the abundance of the intestinal and renal NaPi transport proteins. The same effect was also found in opossum kidney cells in culture after treatment with either agonist. There was increased nuclear expression of the endogenous LXR receptor, a reduction in NaPi4 protein abundance (the main type II NaPi transporter in the opossum cells), and a reduction in NaPi co-transport activity. Thus, LXR agonists modulate intestinal and renal NaPi transporters and, in turn, serum phosphate levels.

Kidney International (2011) **80**, 535–544; doi:10.1038/ki.2011.159; published online 15 June 2011

KEYWORDS: arteriosclerosis; chronic kidney disease; hyperphosphatemia; phosphate uptake; vascular calcification

Increase in serum inorganic phosphate (Pi) concentration (hyperphosphatemia) is associated with endothelial dysfunction¹ and increased incidence of cardiovascular disease,² including accelerated atherosclerosis,³ vascular stiffness,⁴ and vascular calcification.^{2,5–7} We have recently found that hyperphosphatemia *in vivo* and increase in extracellular Pi in vascular smooth muscle cells grown in cell culture induce lipid accumulation and vascular calcification, further emphasizing a role for Pi in vascular disease.⁸ Serum Pi concentration is determined by coordinated activity of the renal and intestinal sodium-gradient-dependent Pi (Na-Pi) transporters.^{9–11} In the renal proximal tubule, at least three different phosphate transporters are expressed in the brush border membrane: type II NaPi-2a and NaPi-2c, and type III PiT-2.^{12,13} Interestingly, both type III NaPi transporters, PiT-1 and PiT-2, are expressed in mouse ileum; however, a third type II NaPi transporter (NaPi-2b) is considered to be the main transporter that mediates phosphate absorption in the gut.^{14,15} Novel pathways that can inhibit renal and intestinal Na-Pi transporters and prevent hyperphosphatemia, especially in the presence of chronic kidney disease, are likely to have important effects in the inhibition of hyperphosphatemia-mediated cardiovascular disease.

The nuclear receptors are involved in the regulation of essential metabolic functions, including glucose and lipid metabolism, reverse cholesterol transport, and inflammation.^{16–18} All of these factors have an important role in the development of cardiovascular disease. Activation of liver X receptor (LXR), a nuclear receptor, has been shown to prevent the development of atherosclerosis in ApoE-knockout¹⁹ and low-density lipoprotein receptor-knockout²⁰ mice.^{21,22} In addition, LXR activation reduces the expression of several genes, *iNOS*, *COX2*, *MMP9*, *IL-1 β* , and *IL-6*, which are mediators of inflammation and atherosclerosis.^{23,24} LXR is present in two different isoforms. LXR α (NR1H3) is mostly expressed in liver, intestine, kidney, spleen, macrophages, and adipose tissue. The second isoform LXR β (NR1H2) is ubiquitously expressed.²⁵ LXRs belong to a family of the type II nuclear receptors, which form heterodimers with the retinoid X receptor and, on ligand binding, stimulate the expression of target genes.^{26,27} Recently, the oxidized

Correspondence: Moshe Levi, Department of Physiology and Biophysics, Division of Renal Diseases and Hypertension, University of Colorado Denver, 12700 East 19th Avenue, Research 2, Room 7002, Aurora, Colorado 80045, USA. E-mail: Moshe.Levi@ucdenver.edu

Received 23 July 2010; revised 14 March 2011; accepted 14 April 2011; published online 15 June 2011

cholesterol derivatives (oxysterols) have been identified as their natural ligands for LXR.²⁸ Oxysterols are formed in amounts proportional to the cholesterol content in the cell; therefore, LXRs operate as cholesterol sensors, which protect from cholesterol overload by inhibiting intestinal cholesterol absorption.^{19,29} LXRs stimulate cholesterol efflux from cells via the activation of adenosine-triphosphate-binding cassette (ABC) transporters for the subsequent transport of cholesterol to the liver, conversion to bile acids, and biliary excretion.^{27,30,31} However, some synthetic non-steroidal LXR agonists (TO901317 and GW3965) have shown to induce lipogenesis mainly through the activation of sterol-regulatory-element-binding protein 1c, a master regulator of lipids. In contrast to this, our group²² and others³² have demonstrated that a new steroidal LXR ligand, *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide (DMHCA), activates the ABC transporters that mediate reverse cholesterol transport but does not activate lipogenesis.

In addition to the liver and the intestine, LXR α and LXR β are also highly expressed in the kidney.^{33,34} Although LXR agonists have been shown to increase the activity of the intestinal and renal ABC cholesterol transporters ABCA1 and ABCG1,^{35,36} their potential effect in the modulation of intestinal and renal Na-Pi transporters have not been studied.

In this study, we document a novel role for the LXR-activating ligands, DMHCA and TO901317, in the inhibition of the major renal and intestinal Na-Pi transporters, resulting in a decrease of serum phosphate levels. This study along with our previous findings of reduction of atherosclerosis, suggests that LXR-activating ligands, such as DMHCA, capable of inducing reverse cholesterol transport without the lipogenic effects might be a promising therapeutic agent in the prevention of hyperphosphatemia and its cardiovascular consequences.

RESULTS

The effects of the LXR agonists on renal and intestinal gene regulation

In our initial studies, we determined the effects of both TO901317 and DMHCA on potential LXR targets in the kidney and the intestine.²² We found that both TO901317 and DMHCA increased ABCA1 and ABCG1 mRNA abundance in the kidney and the ileum (Figure 1). As previously shown in hepatocytes and macrophages,³² TO901317 also increased sterol-regulatory-element-binding protein 1c, FAS, and SCD-1 mRNA abundance in the kidney and the ileum; however, the effects of DMHCA on sterol-regulatory-element-binding protein 1c, FAS, and SCD-1 were minimal (Figure 1). These results were also in agreement with the previous data, showing the activation of LXR target genes in the kidney when the mice were treated with TO901317.³⁷ Upregulation of ABCA1 and stearoyl-CoA desaturase 1 protein in kidney and ileum was also confirmed by western blotting and immunofluorescence microscopy (Figure 1c-e). No significant effects were observed in the expression of carbohydrate-responsive-element-binding protein and liver pyruvate kinase.

Treatment with DMHCA or TO901317 causes decreases in Na⁺-dependent phosphate uptake in kidney and ileum brush border membrane (BBM)

In kidney BBM, sodium-dependent Pi uptake was reduced by 20% and 15% in the DMHCA- and TO901317-treated mice, respectively. Treatment with DMHCA had even more marked effects in the ileum where sodium-dependent Pi uptake was reduced by 56% and by 51% when mice were treated with TO901317 (Figure 2). In all cases, sodium-gradient-independent Pi transport was measured by using choline chloride rather than sodium chloride. An average of 5% of total uptake in the kidney BBM and an average of 14% of the total uptake in the ileum BBM was due to Na-independent Pi uptake, and this Na-independent component of total uptake was modified by neither DMHCA nor TO901317. Therefore, both drugs are inhibiting the transport of Pi in both epithelia.

The DMHCA- or TO901317-induced decrease in renal and intestinal NaPi transport activity was paralleled by an increase in urinary Pi excretion and a small but significant decrease in serum Pi concentration (Figure 3). Changes in the urinary glucose or protein excretion were not detectable after treatment; however, a small significant decrease in the urine pH was detected in the treated mice (Supplementary Figure A online).

Treatment with DMHCA or TO901317 decreases serum Pi and increases serum FGF23

To determine the serum levels of Pi, Ca, FGF23, and parathyroid hormone, blood was collected when animals were killed. Treatment with TO901317 caused a 20% decrease in serum phosphate concentration, with a smaller reduction of 14% after treatment with DMHCA (Figure 3a). This is associated with an increase of ~30% in the urine phosphate excretion with either compound (Figure 3b). No significant changes in the serum calcium concentration were observed (Figure 3c). Additionally treatment with TO901317 caused a 64% increase in serum FGF23 concentration, with a smaller increase of 46% after treatment with DMHCA (Figure 4a). No significant changes in the serum parathyroid hormone levels were observed after treatment with either compound (Figure 4b).

Treatment with DMHCA or TO901317 causes decreases in NaPi cotransporter protein and mRNA abundance in kidney and ileum

To determine the mechanism of the LXR-agonist-mediated decrease in renal BBM NaPi cotransport activity, we determined the abundance of BBM NaPi cotransporters by western blotting. We found that treatment with DMHCA or TO901317 caused significant decreases in the protein abundance of all of the three renal transporters, namely, NaPi-2a, NaPi-2c, and Pit-2 (Figure 5a). The effect of these compounds on the renal NaPi transporter abundance was independent of alterations in the protein abundance of the PDZ-domain-interacting proteins, namely, NHERF-1 and PDZK-1 (Figure 5c). These proteins are well known for the regulation of the renal phosphate transporters. In addition,

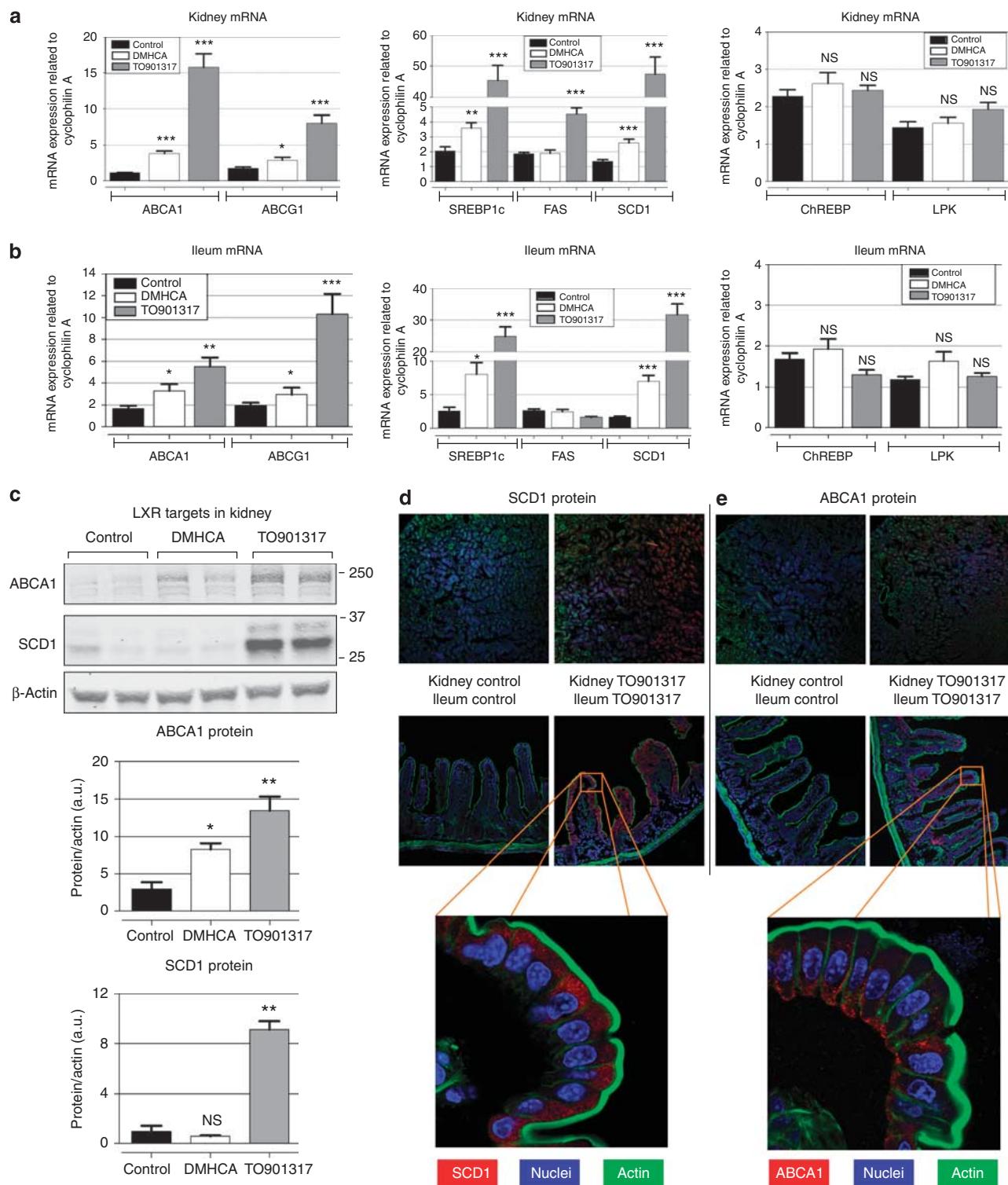
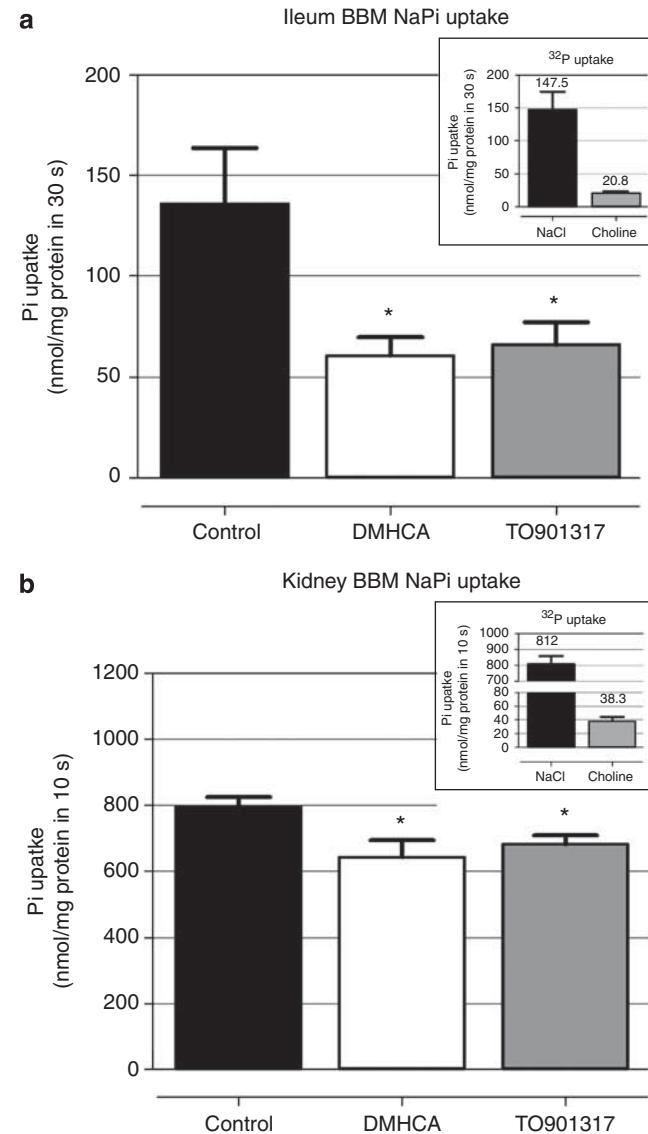


Figure 1 | Effect of the LXR agonist DMHCA and TO901317 on the abundance of LXR target genes in mouse kidney and ileum. (a, b) LXR target gene mRNA abundance in kidney and ileum was analyzed by real-time quantitative PCR. TO901317 induced significant increases in the mRNA abundance of ABCA1 and ABCG1 as well as SREBP1c, FAS, and SCD1. Increases in the mRNA abundance of these genes with DMHCA were lower than activation by TO901317, especially activation of lipogenic genes, such as SREBP1c, FAS, and SCD1. DMHCA or TO901317 did not activate ChREBP and LPK, neither in kidney nor in ileum. (c) ABCA1 and SCD1 protein expression in mouse kidney was analyzed by western blotting. TO901317 induced a more significant upregulation of both of these proteins in kidney, which was also confirmed by immunofluorescence. (d, e) The expressions of ABCA1 and SCD1 were also increased in mouse ileum. Protein increase of SCD1 was not observed with DMHCA. Values represent means \pm s.e.m., at least $n = 6$ mice per group. ChREBP, carbohydrate-responsive-element-binding protein; DMHCA, *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide; LPK, liver pyruvate kinase; LXR, liver X receptor; NS, nonsignificant; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; SREBP1c, sterol-regulatory-element-binding protein 1c.

we found that DMHCA did not alter renal Na-glucose SGLT-2 protein levels, whereas TO901317 caused a decrease of SGLT-2 protein abundance (Supplementary Figure C online).

Measurements of the mRNA abundance of these transporters in parallel samples of the kidney cortex by



real-time quantitative PCR indicate that these ligands decrease the mRNA abundance of NaPi-2a and NaPi-2c but not Pit-2 (Figure 5b).

Treatment with DMHCA or TO901317 also caused a significant decrease in ileum BBM NaPi-2b protein abundance, with no significant effects on Pit-1 protein abundance (Figure 6a). The effect of these ligands on the intestinal NaPi-2b transporter abundance was independent of the alterations in the protein abundance of the PDZ-domain-interacting proteins, namely, NHERF-1 and PDZK-1 (Figure 6c). In addition, we found no effects of these LXR agonists on the intestinal Na-glucose SGLT1 transporter protein levels (Supplementary Figure B online).

The effect of DMHCA or TO901317 on NaPi-2b protein abundance was associated with a parallel decrease in NaPi-2b mRNA; 75% after treatment with TO901317 and 50% with DMHCA (Figure 6b).

DMHCA or TO901317 causes decreases in NaPi cotransport activity and NaPi-4 protein abundance in opossum kidney (OK) cells in culture

To determine whether DMHCA or TO901317 has direct modulatory effects on NaPi cotransport activity, independent of systemic metabolic and hormonal factors, we studied their effects in OK cells. OK cells are a well-established model of the renal proximal tubule, which expresses the endogenous type IIa NaPi cotransporter, also known as NaPi-4. Treatment of OK cells with DMHCA induced translocation of LXR to the nucleus (Figure 7a). This effect was also observed with TO901317 compound (data not shown). Both LXR agonists

Figure 2 | Treatment with DMHCA or TO901317 reduces Na⁺-dependent phosphate uptake in mouse ileum and kidney BBM. (a) Sodium-dependent ³²P uptake was reduced in ileum BBM in DMHCA- or TO901317-treated mice. (b) Sodium-dependent ³²P was also reduced in kidney BBM in DMHCA- or TO901317-treated mice. Small panels in the upper right show sodium-independent uptake, measured in presence of Cl-choline, compared with the total phosphate uptake (NaCl). These values represent the average of two different experiments with at least $n = 10$ per group. BBM, brush border membrane; DMHCA, *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide; NaPi, sodium-phosphate; Pi, inorganic phosphate.

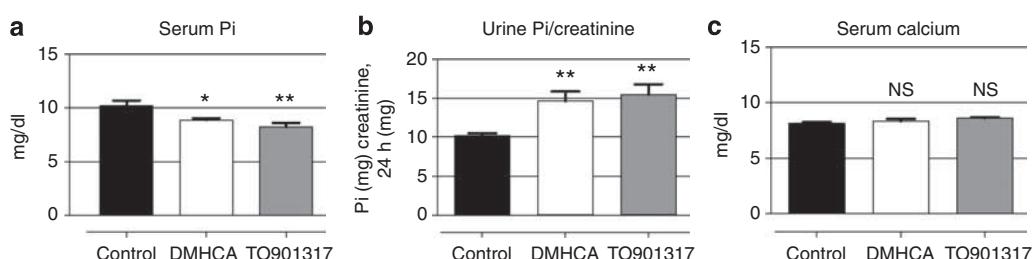


Figure 3 | Treatment with DMHCA or TO901317 decreases blood phosphate concentration, increases urine phosphate excretion in mouse, and does not change serum calcium concentration. (a) Treatment with TO901317 caused a 20% decrease in serum phosphate concentration, with a smaller reduction of 14% after treatment with DMHCA. (b) Approximately a 30% increase in urine phosphate excretion with either compound. (c) No changes in the serum calcium concentration were observed with either compound. At least $n = 10$ mice per group. DMHCA, *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide; NS, nonsignificant; Pi, inorganic phosphate.

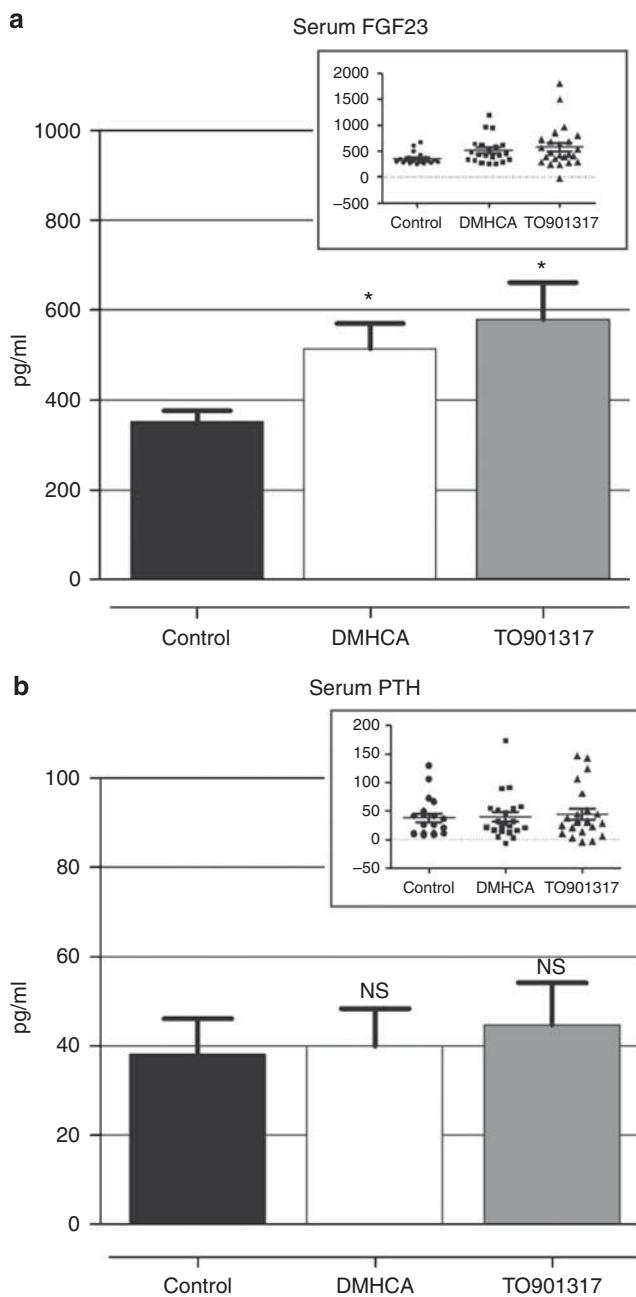


Figure 4 | Effects of DMHCA and TO901317 on mouse serum FGF23 and serum PTH. (a) Treatment with TO901317 caused a 64% increase in serum FGF23 concentration, with a smaller increase of 46% after treatment with DMHCA. (b) Changes on the serum PTH levels were determined to be not significant for both compounds. At least $n=10$ mice per group. DMHCA, *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide; FGF23, fibroblast growth factor 23; NS, nonsignificant; PTH, parathyroid hormone.

caused a dose-dependent decrease in OK cell NaPi cotransport activity (Figure 7b), measured by whole-confluent cells ^{32}P uptake. Western blot of apical membranes isolated from OK cells and immunofluorescence studies indicate that these agonists caused parallel decreases in the apical membrane NaPi-4 protein abundance (Figure 7c, d and Supplementary Figure D online).

DISCUSSION

Hyperphosphatemia is a major risk factor for cardiovascular disease. Any interventions that decrease serum Pi concentration and possibly prevent the cardiovascular consequences of hyperphosphatemia are welcomed. In this study, we show that TO901317 and DMHCA, two LXR-activating ligands, which have been previously described and shown to prevent atherosclerosis in ApoE-knockout mice,²² also causes a significant decrease in serum Pi concentration by inhibiting the activity of the renal and intestinal NaPi transporters.

The effects of TO901317 or DMHCA in decreasing renal proximal tubular BBM NaPi cotransport activity are reflected by an increase in the urinary Pi excretion and significant decreases in the abundance of NaPi-2a, NaPi-2c, and Pit-2. Although the decreases in NaPi-2a and NaPi-2c protein abundance may be mediated by the transcriptional mechanisms, the decrease in Pit-2 protein abundance seems to be independent of Pit-2 transcriptional regulation. These results are associated with a significant increase of the FGF23 serum levels after treatment with LXR agonist. FGF23 is a well-known phosphaturic hormone³⁸ capable of downregulating the expression of the renal NaPi transporters. In addition, it is also important to mention that the protein levels of the Na-glucose transporters SGLT2 in kidney BBM are also reduced after treatment with TO901317, with no significant effects with DMHCA.

It is now quite well established that NaPi-PDZ-type (PSD-95, discs-large, and ZO-1) protein interactions are important for the regulation of NaPi-2a and NaPi-2c protein expression in the proximal tubular apical BBM.^{39–41} Our studies indicate that the effects of these LXR agonists on NaPi-2a, NaPi-2c, and NaPi-2b protein abundance are independent of alterations on BBM expression of the PDZ proteins, NHERF-1 or PDZK-1. However, LXR-induced modifications in NHERF-1 or PDZK-1–NaPi interactions cannot be ruled out.

DMHCA and TO901317 also have marked effects in inhibiting intestinal BBM NaPi cotransport activity. This inhibition occurs via a major decrease in the BBM protein abundance of the major intestinal NaPi transporter NaPi-2b. There is also a parallel decrease in NaPi-2b mRNA abundance, which indicates that DMHCA and TO901317 may downregulate NaPi-2b via transcriptional mechanisms.

To determine whether LXR activation has also direct effects in modulating NaPi cotransport activity, we have performed parallel studies in OK cells, a well-established model of the renal proximal tubule.^{39,42} We found that both of the LXR agonists cause a dose-dependent decrease in OK cells NaPi cotransport activity by decreasing the apical BBM abundance of the OK cell type II NaPi cotransporter NaPi-4 protein. Additional studies indicate that DMHCA as well as TO901317 induce increased nuclear expression of LXR protein, further supporting that these drugs are LXR-activating ligands; this is correlated with the upregulation of LXR target genes, including ABCA1 (data not shown), after treatment of the OK cells with this agonist.

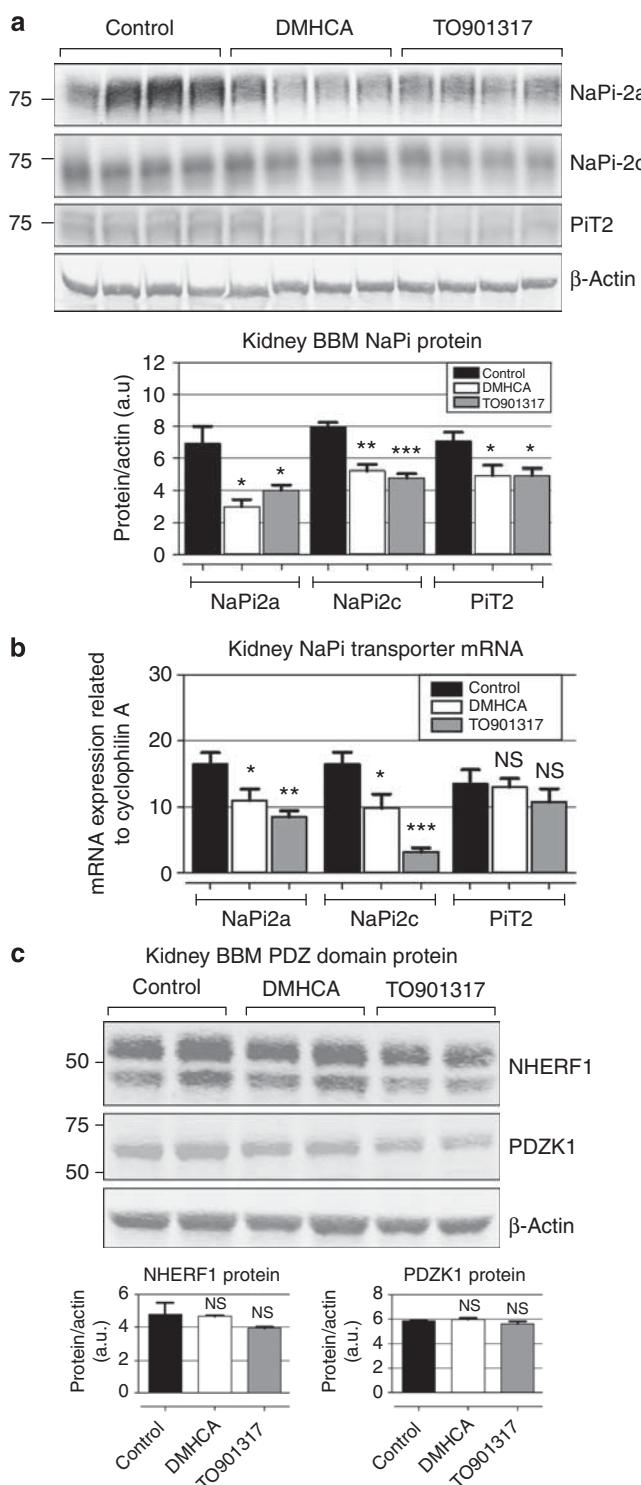
Our study demonstrates that LXR has a novel role in inhibiting renal and intestinal NaPi transporters and decreasing serum Pi concentration through multiple mechanisms, including phosphatoinositide modulation and direct control of Pi transporter abundance in epithelia. This effect of LXR, along with its well-established effects in mediating reverse cholesterol transport, inhibiting inflammatory cytokines, and preventing atherosclerosis, establishes it as a

major target for the prevention of hyperphosphatemia and the associated cardiovascular complications.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Male C57Bl/6 mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and maintained in a clean environment on a regular 12-h light–12-h dark cycle. Before the initiation of the corresponding diets, mice were kept on a standard laboratory chow diet (Harlan Teklad 2019 chow diet) with 0.9% of Ca and 0.7% of Pi. Male C57Bl/6 mice were fed chow diet containing (a) no ligands, or (b) DMHCA (80 mg/kg body weight/day), or (c) TO901317 (35 mg/kg body weight/day) for 15 days. Diets were supplemented with the respective LXR ligand at a level sufficient to provide the appropriate mg/kg food dose on consumption of a 5 g diet by a 25 g mouse/day. Body weight and food intake were monitored regularly. We studied $n = 24$ mice in each treatment group: 12 mice for renal and intestinal BBM isolation and 12 mice for renal and intestinal RNA isolation. On the 14th day of the treatment, the mice were placed in metabolic balance cages for urine collection. Animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of the University of Colorado at Denver.



Cell culture

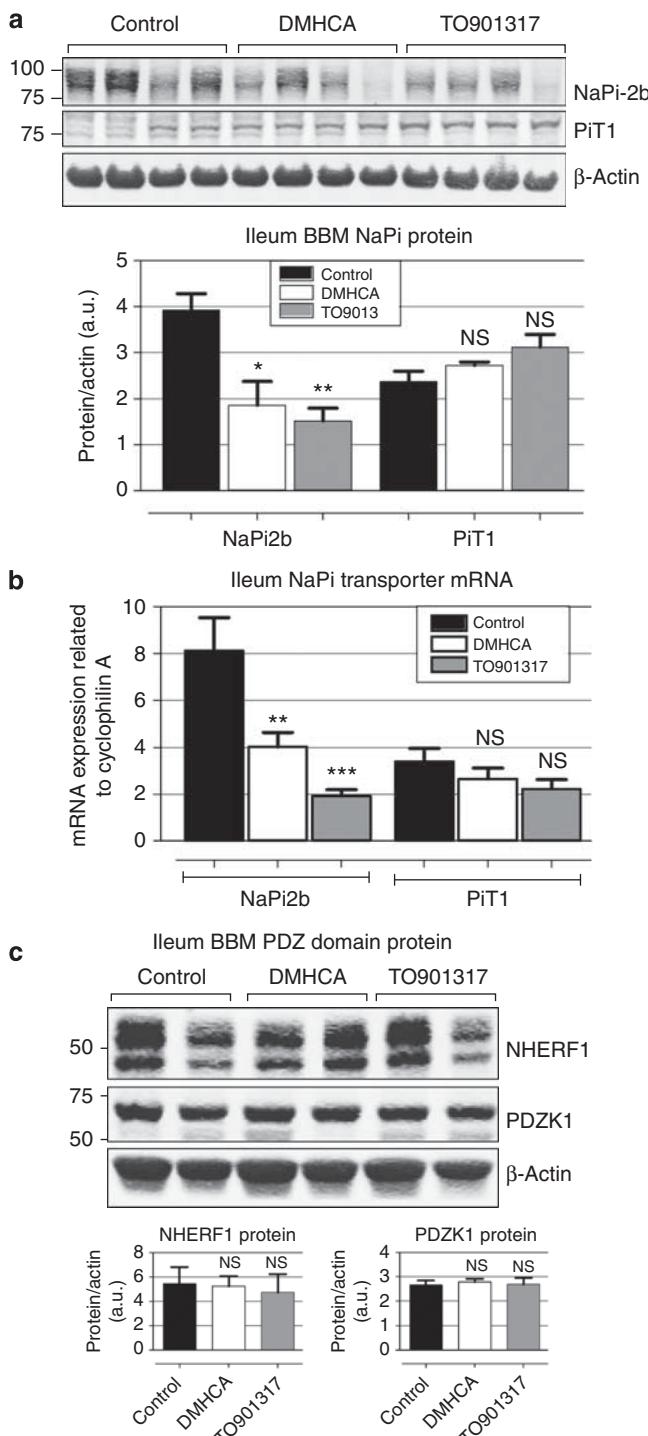
OK proximal tubule cells were grown in DMEM-F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. For experimental work, cells were seeded on porous membrane inserts (Corning, Lowell, MA). After confluence, cells were placed in DMEM-F-12 supplemented with 0.2% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin to get them quiescent for 24–48 h before treatment. Cells were treated with different concentration of LXR agonist, either DMHCA or TO901317 (stocks were resuspended in dimethyl sulfoxide). Working solutions of these agonists were prepared in DMEM-F-12 supplemented with 0.2% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin. Cells were treated with 1:1000 dilution of dimethyl sulfoxide (control) or DMHCA or TO901317 for 24 h.

Materials and antibodies

All chemicals were obtained from Sigma (Saint Louis, MI), except when noted. A polyclonal rabbit anti-NaPi-IIa antibody was generated by Affinity Bio Reagents (Golden, CO) and used at 1:5,000 for western blotting.¹³ A rabbit anti-NaPi-IIc antibody was custom-made by Davids Biotechnologie (Regensburg, Germany), as previously described,¹³ and was used at 1:1000 for western blotting. The polyclonal rabbit anti-NaPi-2b, anti-PiT1, and anti-PiT2

Figure 5 | Effects of DMHCA or TO901317 on renal BBM NaPi transporter protein abundance and NaPi transporter mRNA abundance. (a) Mouse kidney brush border membrane (BBM) vesicles were isolated after treatment with DMHCA or TO901317. A significant decrease in protein abundance was observed in all three NaPi transporters: 57% for NaPi-2a, 40% for NaPi-2c, and 30% for PiT-2. **(b)** NaPi transporter mRNA abundance was measured by quantitative PCR and normalized against cyclophilin A. Decreases in NaPi-2a and NaPi-2c mRNA levels were observed with either DMHCA or TO901317. **(c)** NHERF1 and PDZK1 protein levels were not affected by these LXR agonists. At least $n = 6$ –8 mice per group. BBM, brush border membrane; DMHCA, *N,N*-dimethyl-3β-hydroxy-cholenamide; NHERF1, Na/H exchange regulatory factor-1; NaPi, sodium-phosphate; NS, nonsignificant.

antibodies were also custom generated by Davids Biotechnologie (Regensburg, Germany) as described before,¹⁴ and was used at 1:1,000 dilution for western blotting. The goat anti-LXR α / β was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The rabbit anti-ABCA1 was purchased from Novus Biologicals (Littleton, CO), and the rabbit anti-stearoyl-CoA desaturase 1 was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The rabbit anti-Na/H exchange regulatory factor-1 antibody was purchased from Sigma. The rabbit anti-PDZK1 was a kindly gift from Dr David Silver (Columbia University).



BBM vesicle isolation

Mice were anesthetized via an intraperitoneal injection of 50 mg/kg pentobarbital sodium (Pentothal, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). After clamping of the renal vessels, blood was drawn for biochemical analysis, the kidneys and the ileum were removed, and the ileum mucosa was scraped for BBM isolation.

Kidney slices from two mice were combined in 7.5 ml isolation buffer consisting of 15 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 300 mmol/l mannitol, 5 mmol/l ethylene glycol tetraacetic acid, and 1 Roche Complete inhibitor tablet per 250 ml buffer. The kidney slices were homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer with 8–10 rapid strokes and transferred to a chilled capable tube. Kidney residues remaining on the homogenizer were rinsed off with 10 ml water that was then added to the kidney homogenate. BBM was prepared by a double Mg²⁺ precipitation. For the first Mg²⁺ precipitation, MgCl₂ was added to the homogenate (final concentration of 15 mmol/l), and the homogenate was shaken every 5 min on ice for 20 min before centrifugation at 2500 g for 15 min. The supernatant was subjected to a second Mg²⁺ precipitation; and from the resulting supernatant, the BBM was recovered by centrifugation at 38,000 g for 40 min. The BBM was resuspended, and its protein content quantified.

Ileum BBM was similarly isolated by double Mg²⁺ precipitation as described above. BBM of the OK cells was isolated by Mg²⁺ precipitation. Briefly, OKP cells were grown to confluence in 100 mm dishes. At 24 h before the experiment, the cells were placed in DMEM medium containing 0.2% fetal bovine serum to synchronize them. Cells were incubated with control media (1:1000 dimethyl sulfoxide) or DMHCA or TO901317 for 24 h. After treatment, the cells were washed in ice cold PBS and scraped into isolation buffer (15 mmol/l Tris (pH7.4), 300 mmol/l mannitol, 5 mmol/l ethylene glycol tetraacetic acid, and one Mini-Complete tablet (Roche)) on ice. The cells were then homogenized by aspirating 30 times through a 23-gauge needle. MgCl₂ was added to a final concentration of 15 mmol/l, and the homogenate was shaken on ice for 20 min. The homogenate was centrifuged at 2500 \times g at 4°C for 15 min. The supernatant was removed and spun at 60,000 \times g for 40 min. The final pellet was resuspended in isolation buffer.

Pi transport assays

Phosphate transport from kidney or ileum was measured by rapid filtration of radioactive ³²Pi uptake in freshly isolated BBM vesicles.⁴³ The BBM and the uptake solution were incubated for 10 s at 25°C for kidney and 30 s at 37°C for ileum. Phosphate

Figure 6 | Effects of DMHCA or TO901317 on intestinal BBM NaPi transporter protein abundance and NaPi transporter mRNA abundance. (a) Mouse ileum brush border membrane (BBM) vesicles were isolated after treatment with DMHCA or TO901317. There was a significant 61% decrease in the protein abundance of the major intestinal NaPi transporter NaPi-2b with TO901317 treatment, and a 52% after treatment with DMHCA, while there were no significant changes in type III NaPi transporter PiT1 protein expression. (b) NaPi2b mRNA abundance was reduced by 50% after treatment with DMHCA, and by 75% with TO901317. (c) NHERF1 and PDZK1 protein levels were not significantly affected by DMHCA or TO901317. At least $n = 6$ mice per group. BBM, brush border membrane; DMHCA, N,N-dimethyl- β -hydroxy-cholenamide; NHERF1, Na/H exchange regulatory factor-1; NaPi, sodium-phosphate; NS, nonsignificant.

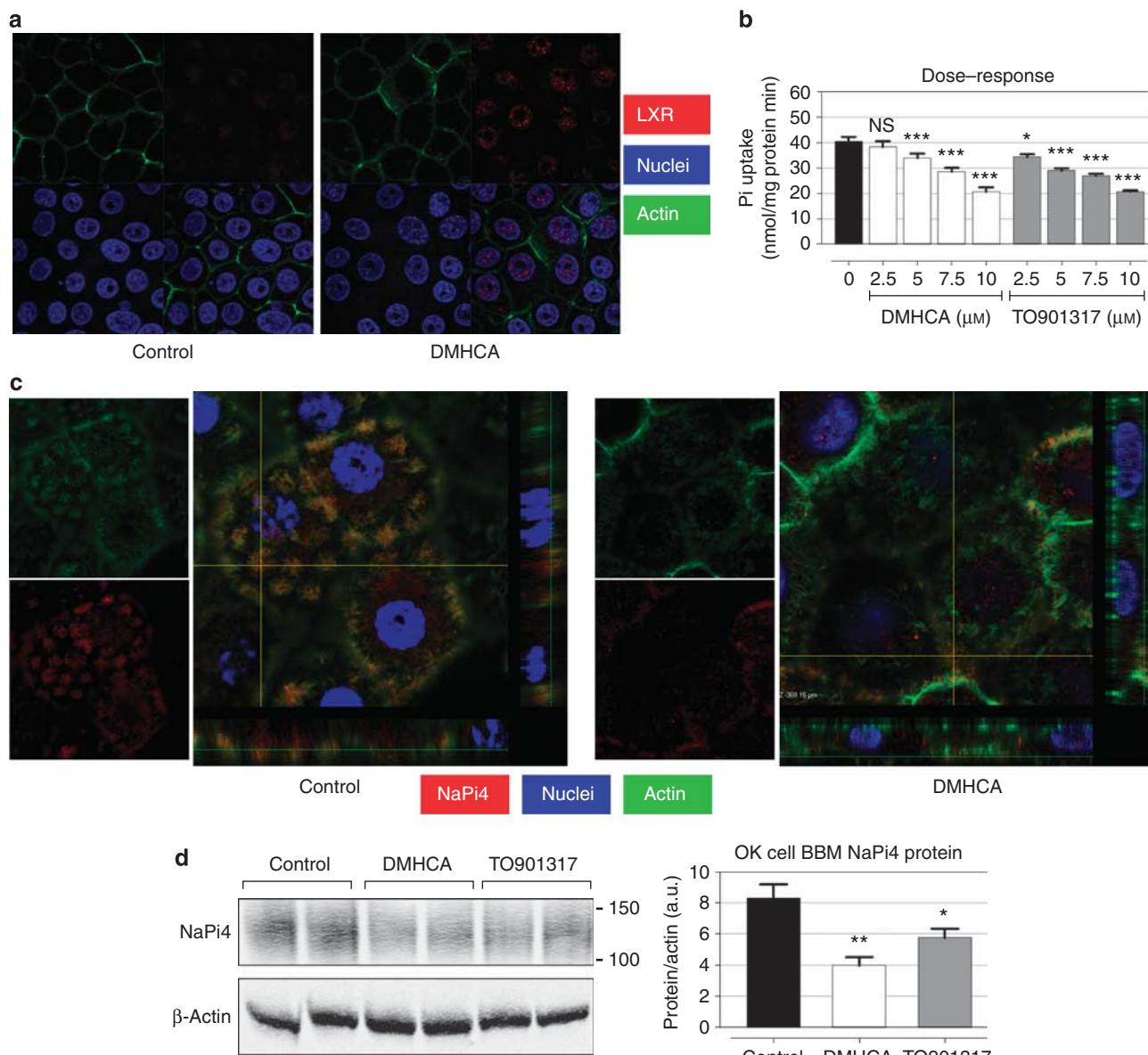


Figure 7 | Treatment of opossum kidney (OK) cells with LXR agonists DMHCA or TO901317 induces activation of endogenous LXR, decrease in the phosphate uptake in a dose-dependent manner, and decrease in the expression of the endogenous NaPi transporter (NaPi4). (a) Activation and translocation of the endogenous LXR nuclear receptor is shown by immunofluorescence after incubation of the OK cells with DMHCA. Notice the increased red signal inside the nucleus in the treated cells. **(b)** Correlation between concentration of the LXR agonist and reduction of the whole cells ^{32}P uptake was observed for both compounds. **(c)** Reduced expression of the endogenous NaPi4 phosphate transporter is observed by immunofluorescence in the apical membrane of OK cells. Notice the decrease in the red signal, and **(d)** this is confirmed by western blot in isolated OK cell BBM. At least $n = 3$ per group. BBM, brush border membrane; DMHCA, *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide; NaPi, sodium-phosphate; NS, nonsignificant; OK, opossum kidney; Pi, inorganic phosphate; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1.

transport in OK cells was measured by radioactive ^{32}Pi uptake in treated confluent cells for 6 min at 25°C, as described.^{14,40,44}

Urine and blood analysis

Blood samples were collected in heparin-containing tubes during sacrifice. The 24 h and spot urine was collected in animals treated for 2 weeks. Plasma obtained after centrifugation and urine samples were analyzed for phosphate (Pi) concentrations by using the commercial kit Stanbio Liqui-UV (Stanbio; Boerne, TX). Creatinine concentration in urine was determined using QuantiChrom

Creatinine Assay (BioAssay Systems; Hayward, CA). FGF-23 (C-Term) and intact parathyroid hormone were determined with specific ELISA kits from Immunotopics (San Clemente, CA). $n = 10$ –12 animals per group was used in these assays.

Western blotting

BBM proteins (20 or 30 μg) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% milk in PBS Tween 20 before incubation with primary antibodies diluted in PBS

overnight at 4°C. After washes with phosphate buffered saline and Tween 20, membranes were incubated with Licor-conjugated (LI-COR, Lincoln, NE) donkey secondary antibodies diluted 1:5,000 for 1 h. Membranes were scanned using Licor system. Densitometry data are presented as average \pm s.d.

RNA extraction and real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from kidney cortex and ileum using the Qiagen RNeasy Mini Kit, and complementary DNA was synthesized using reverse transcription reagents from Bio-Rad (Hercules, CA). The mRNA level was quantified using a Bio-Rad iCycler real-time PCR machine. Cyclophilin A was used as an internal control, and the amount of RNA was calculated by the comparative threshold cycle method as recommended by the manufacturer. All of the data were calculated from duplicate reactions of three different experiments.

Confocal microscopy

Cells were washed with PBS before blocking for 30 min with 5% goat serum and permeabilized with 0.1% saponin in PBS. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. After washing with saponin solution, sections were incubated with secondary fluorescent goat antibodies for 1 h. After washing three times, the cells were mounted in Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA). Confocal images were acquired on a Zeiss 510 NLO-META LSM laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY), and the Olympus Fluoview 1000 confocal microscope (Olympus, Center Valley, PA).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm s.d., * P <0.05, ** P <0.005, and *** P <0.001. Data were analyzed for statistical significance by unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing of interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Makoto Miyazaki for help and advice. This work was supported by grants from the National Institutes of Health (NIH) 3R01 AG026529 supplemental grant to Yupanqui Caldas and NIH 2R01 DK066029-6 to Moshe Levi.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure A. Treatment with DMHCA or TO901317 compound induced a small significant decrease in the urine pH compared to control samples.

Figure B. Protein abundance by western blotting of the renal Na-glucose transporter SGLT2 in BBM showed a significant reduction after treatment with TO901317 compound. No significant change was observed with DMHCA.

Figure C. Protein abundance by western blotting of the Na-glucose transporter SGLT1 in intestinal BBM shows no significant changes after treatment with either compound.

Figure D. Western blotting of NaPi4 in OK cells BBM showing down-regulation after treatment with either LXR agonist.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

REFERENCES

1. Tonelli M, Pannu N, Manns B. Oral phosphate binders in patients with kidney failure. *N Engl J Med* 2010; **362**: 1312–1324.
2. Foley RN. Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 1136–1139.
3. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA et al. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 397–404.
4. Ix JH, De Boer IH, Peralta CA et al. Serum phosphorus concentrations and arterial stiffness among individuals with normal kidney function to moderate kidney disease in MESA. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 609–615.
5. Chiu YW, Adler SG, Budoff MJ et al. Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Int* 2010; **77**: 1107–1114.
6. Villa-Bellotta R, Bogaert YE, Levi M et al. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1030–1036.
7. Brandenburg VM, Jähnen-Dechent W, Ketteler M, Sevelamer and the bone-vascular axis in chronic kidney disease: bone turnover, inflammation, and calcification regulation. *Kidney Int Suppl* 2009; **114**: S26–S33.
8. Miyazaki-Anzai S, Levi M, Kratzer A et al. Farnesoid X receptor activation prevents the development of vascular calcification in ApoE-/- mice with chronic kidney disease. *Circ Res* 2010; **106**: 1807–1817.
9. Virkki LV, Biber J, Murer H et al. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F643–F654.
10. Forster IC, Hernando N, Biber J et al. Proximal tubular handling of phosphate: a molecular perspective. *Kidney Int* 2006; **70**: 1548–1559.
11. Kiela PR, Ghishan FK. Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis. *Lab Invest* 2009; **89**: 7–14.
12. Villa-Bellotta R, Sorribas V. Compensatory regulation of the sodium/phosphate cotransporters NaPi-IIc (SCL34A3) and Pit-2 (SLC20A2) during Pi deprivation and acidosis. *Pflugers Arch* 2010; **459**: 499–508.
13. Breusegem SY, Takahashi H, Giral-Arnal H et al. Differential regulation of the renal sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa, NaPi-IIc, and Pit-2 in dietary potassium deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**: F350–F361.
14. Giral H, Caldas Y, Sutherland E et al. Regulation of the Rat Intestinal Na-dependent Phosphate Transporters by Dietary Phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**: F1466–F1475.
15. Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W et al. Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 2348–2358.
16. Hansen MK, Connolly TM. Nuclear receptors as drug targets in obesity, dyslipidemia and atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; **9**: 247–255.
17. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008; **454**: 470–477.
18. Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 2008; **134**: 97–111.
19. Joseph SB, McKilligan E, Pei L et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 7604–7609.
20. Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T et al. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett* 2003; **536**: 6–11.
21. Kim GH, Park K, Yeom SY et al. Characterization of ASC-2 as an antiatherogenic transcriptional coactivator of liver X receptors in macrophages. *Mol Endocrinol* 2009; **23**: 966–974.
22. Kratzer A, Buchebner M, Pfeifer T et al. Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE-/- mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 2009; **50**: 312–326.
23. Hong C, Tontonoz P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18**: 461–467.
24. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 2003; **17**: 985–993.
25. Wang XX, Jiang T, Levi M. Nuclear hormone receptors in diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 342–351.
26. Rizzo G, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2006; **6**: 421–427.
27. Peet DJ, Turley SD, Ma W et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; **93**: 693–704.
28. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR et al. An oysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; **383**: 728–731.
29. Knight BL, Patel DD, Humphreys SM et al. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res* 2003; **44**: 2049–2058.
30. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszevicz K et al. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; **61**: 736–759.

31. Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. LXRs and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol* 2006; **68**: 159–191.
32. Quinet EM, Savio DA, Halpern AR et al. Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J Lipid Res* 2004; **45**: 1929–1942.
33. Morello F, de Boer RA, Steffensen KR et al. Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression *in vivo*. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1913–1922.
34. Zhang Y, Mangelsdorf DJ. LuXuRies of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. *Mol Interv* 2002; **2**: 78–87.
35. Levy E, Spahis S, Sinnott D et al. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2007; **18**: 310–318.
36. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y et al. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003; **278**: 36091–36098.
37. Zhang Y, Zhang X, Chen L et al. Liver X receptor agonist TO-901317 upregulates SCD1 expression in renal proximal straight tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F1065–F1073.
38. Komaba H, Fukagawa M. FGF23-parathyroid interaction: implications in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; **77**: 292–298.
39. Hernando N, Deliot N, Gisler SM et al. PDZ-domain interactions and apical expression of type Ila Na/P(i) cotransporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11957–11962.
40. Lanaspa MA, Giral H, Breusegem SY et al. Interaction of MAP17 with NHERF3/4 induces translocation of the renal Na/Pi Ila transporter to the trans-Golgi. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F230–F242.
41. Villa-Bellosta R, Barac-Nieto M, Breusegem SY et al. Interactions of the growth-related, type IIC renal sodium/phosphate cotransporter with PDZ proteins. *Kidney Int* 2008; **73**: 456–464.
42. Sorribas V, Markovich D, Hayes G et al. Cloning of a Na/Pi cotransporter from opossum kidney cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 6615–6621.
43. Sorribas V, Lotscher M, Loffing J et al. Cellular mechanisms of the age-related decrease in renal phosphate reabsorption. *Kidney Int* 1996; **50**: 855–863.
44. Breusegem SY, Halaihel N, Inoue M et al. Acute and chronic changes in cholesterol modulate Na-Pi cotransport activity in OK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F154–F165.

