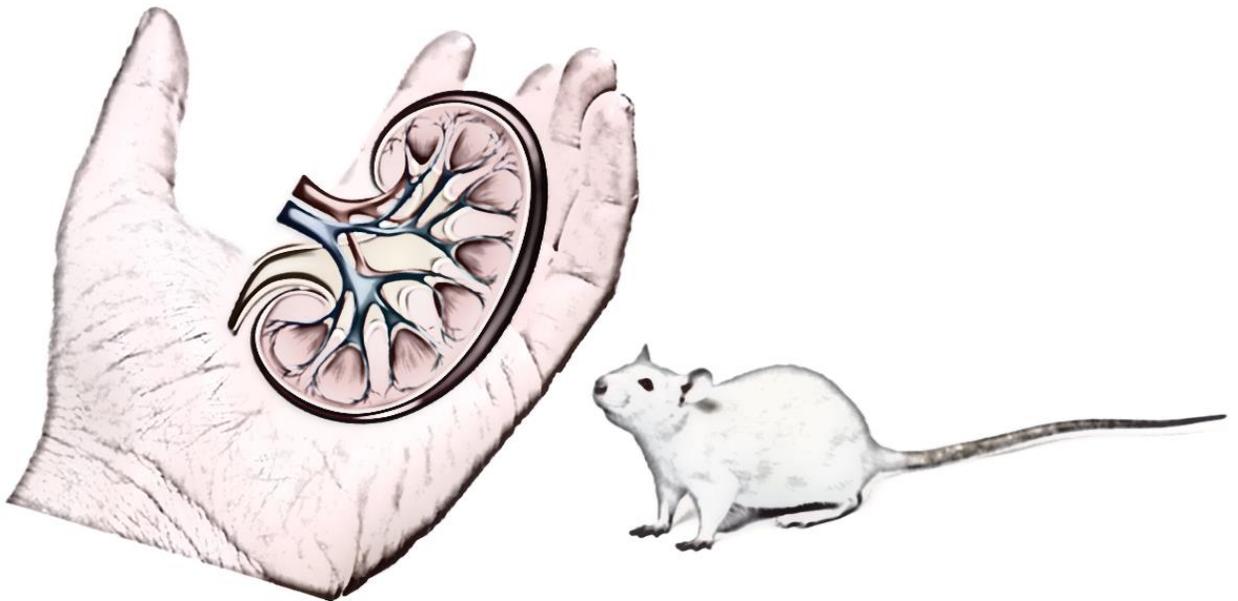


Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral y la enfermedad renal

“Effect of caloric restriction on mineral metabolism and kidney disease”



Ángela Vidal Carrascosa

Directores:

Dr. Escolástico Aguilera Tejero

Dra. Ana Isabel Raya Bermúdez

P.D. Biociencias y Ciencias Agroalimentarias
Octubre, 2021

TITULO: *Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral y la enfermedad renal*

AUTOR: *Ángela Vidal Carrascosa*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Instituto de Estudios de Postgrados (IDEP), Universidad de Córdoba



Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral y la enfermedad renal

“Effect of caloric restriction on mineral metabolism and kidney disease”

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Ángela Vidal Carrascosa para optar al grado de DOCTOR.

Depositada el 19 de Octubre de 2021

Directores:

Dr. Escolástico Aguilera Tejero

Catedrático. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Córdoba.

Dra. Ana Isabel Raya Bermúdez

Profesora Titular. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Córdoba.

D. ESCOLÁSTICO AGUILERA TEJERO, DOCTOR EN VETERINARIA
POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

INFORMA:

Que doña ÁNGELA VIDAL CARRASCOSA, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, el trabajo titulado: “*Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral y enfermedad renal (Effect of caloric restriction on mineral metabolism and kidney disease)*” y que a mi criterio dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba, a 13 de octubre de 2021.

AGUILERA
TEJERO
ESCOLASTICO
- 80129676E

Firmado digitalmente
por AGUILERA
TEJERO ESCOLASTICO
- 80129676E
Fecha: 2021.10.13
09:25:34 +02'00'

Fdo.: Escolástico Aguilera Tejero

D^a ANA ISABEL RAYA BERMÚDEZ, DOCTORA EN VETERINARIA
POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA
UNIVERSIDAD DE CORDOBA

INFORMA:

Que doña ÁNGELA VIDAL CARRASCOSA, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, el trabajo titulado: *“Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral y enfermedad renal (Effect of caloric restriction on mineral metabolism and kidney disease)”* y que a mi criterio dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba, a 13 de octubre de 2021.

RAYA BERMUDEZ
ANA ISABEL -
44370079C

Firmado digitalmente
por RAYA BERMUDEZ
ANA ISABEL - 44370079C
Fecha: 2021.10.18
10:50:58 +02'00'

Fdo.: Ana Isabel Raya Bermúdez



TÍTULO DE LA TESIS: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA SOBRE EL METABOLISMO MINERAL Y ENFERMEDAD RENAL

DOCTORANDO/A: ÁNGELA VIDAL CARRASCOSA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda Ángela Vidal Carrascosa inició su labor investigadora durante sus estudios de Máster en Medicina, Mejora y Sanidad Animal en el año 2016, año en el cual participó en tareas de investigación desarrolladas en nuestro grupo de trabajo “CTS179. Clínica médica”, perteneciente a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. En el año 2018, coincidiendo con el inicio de sus estudios de doctorado, se incorporó oficialmente a nuestro grupo como investigadora, siendo además beneficiaria de las ayudas de contratación de personal investigador joven. También se adscribió como colaboradora en el grupo “GC13. Metabolismo del Calcio. Calcificación Vascular” en IMIBIC.

La presente Tesis Doctoral, englobada dentro del Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Córdoba, se ha desarrollado durante los años 2018 a 2021, bajo nuestra dirección y supervisión. Durante estos años, la doctoranda ha estado colaborando activamente en todas las tareas desarrolladas por el grupo demostrando

interés y dedicación. Fruto de su trabajo ha publicado numerosos artículos en revistas de impacto en el área de biociencias e indexadas en *Journal Citation Reports*, permitiendo la presentación de esta Tesis con carácter de compendio de artículos. Además, durante el desarrollo de la Tesis, la doctoranda ha participado en congresos de ámbito tanto nacional como internacional.

Derivado del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, así como de la labor investigadora de la doctoranda, se ha generado la siguiente producción científica:

a) Publicaciones científicas en revistas indexadas como primer autor:

Vidal, A., Rios, R., Pineda, C., Lopez, I., Muñoz-Castañeda, J. R., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E., & Raya, A. I. (2020). Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR. *Scientific reports*, *10*(1), 1795. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58663-7>

Vidal, A., Rios, R., Pineda, C., Lopez, I., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E., & Raya, A. I. (2020). Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification. *American journal of physiology. Renal physiology*, *318*(5), F1188–F1198. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00009.2020>

Vidal, A., Rios, R., Pineda, C., Lopez, I., Raya, A. I., Aguilera-Tejero, E., & Rivero, J. L. (2021). Increased 1,25(OH)₂-Vitamin D Concentrations after Energy Restriction Are Associated with Changes in Skeletal Muscle Phenotype. *Nutrients*, *13*(2), 607. <https://doi.org/10.3390/nu13020607>

Vidal, A., Ríos, R., Pineda, C., López, I., Raya, A. I., Aguilera-Tejero, E., & Rodríguez, M. (2020). Caloric Intake in Renal Patients: Repercussions on Mineral Metabolism. *Nutrients*, 13(1), 18.
<https://doi.org/10.3390/nu13010018>

b) Comunicaciones científicas en Congresos Nacionales:

Vidal, A., Raya, A. I., & Aguilera-Tejero, E. Efecto de la restricción calórica sobre la expresión de FGF23 en células óseas UMR106. *VII Congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba*. (Comunicación oral). Córdoba 2019.

Vidal, A., Ríos, R., Pineda, C., López, I., Raya, A., & Aguilera-Tejero E. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) is regulated by nutrient availability. *10th IMIBIC young investigators meeting*. (Comunicación oral). Córdoba 2019.

Vidal, A., Ríos, R., Pineda, C., Raya, A. I., López, I., Rodríguez, M., & Aguilera-Tejero, E. Fibroblast growth factor 23 down-regulation by chronic metabolic acidosis in rats. *12th IMIBIC young investigators meeting*. (Comunicación oral). Córdoba 2021. *(Aceptada, pendiente de celebración)*

Espartero, A., **Vidal, A.,** Pineda, C., Raya, A. I., López, I., Rodríguez, M., & Aguilera-Tejero, E. Reduction of renal mass interferes with the phosphaturic action of rapamycin. *12th IMIBIC young investigators meeting*. (Comunicación oral). Córdoba 2021. *(Aceptada, pendiente de celebración)*

c) Comunicaciones científicas en Congresos Internacionales:

Vidal, A., Rios, R., Pineda, C., Lopez, I., Raya, A., Aguilera-Tejero, E.
Fibroblast growth factor 23 (FGF23) is regulated by nutrient availability.
EMBO Workshop: Organ crosstalk in energy balance and metabolic disease. (Póster). Chiclana 2019, España.

Ríos-Varo, R., **Vidal, A.**, Raya, A. I., Pineda, C., López, I., Rodríguez, M., &
Aguilera-Tejero, E. Caloric restriction does not protect against the
development of vascular calcification. *ERA-EDTA congress.* (Póster).
Milán 2020, Italia.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a 13 de Octubre de 2021

Firma de los directores

AGUILERA
TEJERO
ESCOLASTICO -
80129676E

Firmado digitalmente
por AGUILERA TEJERO
ESCOLASTICO -
80129676E
Fecha: 2021.10.13
09:32:51 +02'00'

RAYA BERMUDEZ
ANA ISABEL -
44370079C

Firmado digitalmente
por RAYA BERMUDEZ
ANA ISABEL - 44370079C
Fecha: 2021.10.18
10:55:51 +02'00'

Fdo.: Escolástico Aguilera Tejero

Fdo.: Ana Isabel Raya Bermúdez

PREFACIO

Corría el año 2016, mientras cursaba mis estudios de *Máster en Medicina, Sanidad y Mejora Animal*, cuando el Dr. Ignacio López Villalba contactó conmigo con motivo del Trabajo de Fin de Máster. Quería saber si tenía tutor y tema. Después de mi respuesta negativa me propuso hacer el trabajo bajo su tutela planteándome dos opciones posibles, ambas interesantes pero muy diferentes entre sí. Una consistía en hacer un estudio de casos clínicos, la otra era un trabajo puramente científico y experimental. Yo, que inicié mis estudios de veterinaria por mi pasión por la clínica, me vi por primera vez en la coyuntura de seguir por la rama clínica o aventurarme en el desconocido mundo de la investigación. Tras no mucho pensar me decidí por la opción de laboratorio. Mi intención era intentar continuar con el Doctorado por lo que iniciarme en investigación era imprescindible. Me encomendó a la Dra. Ana Isabel Raya Bermúdez quien con su característica pasión y entusiasmo me enseñó qué era aquello de la inmunohistoquímica. Altos y bajos. Fue un camino con baches, pero fructífero y el resultado fue una calificación de Matrícula de Honor y reconocimiento con el Premio de Trabajo de Fin de Máster. Ignacio y Ana, gracias, a vosotros debo mis inicios.

Terminado el máster no pude continuar con los estudios de Doctorado de forma inmediata por lo que el siguiente año lo pasé haciendo clínica en el Hospital Clínico Veterinario. Un año duro de trabajo en el que aprendí muchas cosas. Y ahí estaba Ignacio de nuevo. En un cruce de caminos por los pasillos del hospital me comentó que se iban a publicar unas becas de investigación.

Terminé mi año de internado clínico y las convocatorias salieron. No fue fácil, había estado todo el año alejada de la investigación y había vuelto a mi ciudad de origen. Hablé con Ignacio, también con Ana. Y, por supuesto, con Alberto. Pareja, compañero y confidente. La única persona que me conoce casi mejor que yo misma. Sólo hizo falta que me dijera: ¿quieres hacer investigación? ¿quieres seguir en la universidad? ¿quieres hacer el doctorado? Para, piensa y decide. La clínica ha sido siempre mi pasión, lo confieso, pero hay oportunidades que sólo se presentan una vez y en un momento determinado, y éste era el momento, así que solicité la beca. El 9 de enero de 2018 empecé a trabajar como investigadora junior en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal bajo la tutela del Dr. Escolástico Aguilera Tejero, quien conociendo mi interés por hacer la Tesis Doctoral me preguntó si quería empezarla. Dos meses después estaba matriculada, ya era oficialmente doctoranda. Hasta hoy, en todo este camino, Escolástico ha sido quien me ha enseñado a pensar como un científico: cuestionar, investigar, confirmar y explicar; y, por encima de todo, paciencia y rigor. Gracias por confiar en mí y en mi trabajo. Gracias por guiarme y enseñarme. Sin tu ayuda hoy no se estaría escribiendo esta Tesis Doctoral con mi nombre impreso en ella.

Equipo. Una palabra poco valorada y que, en el fondo, es una parte muy importante en todos los aspectos de nuestra vida. La familia es un equipo, los compañeros son equipo, los amigos son equipo. Equipo es un conjunto de personas unidas para beneficiarse de un bien común. La ciencia es el bien que

persigue el equipo al que me uní hace casi 4 años liderado por Escolástico y con la compañía y trabajo de Ignacio, Ana, Carmen y Rafa. Carmen, perfeccionismo en el mejor sentido de la palabra, contigo me inicié en la biología molecular, me haces ver que a la meta se llega con constancia. Rafa, alegre y optimista, me enseñaste a trabajar con los animales desde el primer al último detalle. Gracias a todos por vuestra ayuda, por los días eternos en el animalario y por las risas en esos momentos de cansancio.

Pero no todo es el equipo “rabanitos” cada uno de los compañeros del Grupo GC13 de IMIBIC han aportado su granito de arena en mi formación a lo largo de este camino. Juanmi, me enseñaste a trabajar con los cultivos celulares, una parte muy importante de mi trabajo como investigadora. Marién, un claro ejemplo de la vocación científica de un veterinario, siempre con respuesta a todas mis dudas técnicas. Yolanda, dispuesta a ofrecer tu extensa experiencia científica para ayudar en lo que fuera posible, dentro y fuera del laboratorio. Juan, imprescindible en mis primeras planificaciones de experimentos celulares, gracias por tus consejos y propuestas. Rodri y Cris, si alguien hay siempre en el laboratorio son ellos, compañía de agradecer en aquellas tardes interminables y aquellos fines de semana de trabajo en el laboratorio. Y, por último, aunque no menos, Dr. Mariano Rodríguez Portillo, tu conocimiento científico no se puede cuantificar, cuando aún no existía nuestra estrella de oro (el FGF23) ya estudiabas sus efectos, gracias por esos

análisis cargados de ideas y por aportar siempre el punto de vista traslacional a nuestro trabajo.

Experimentación animal, biología molecular, cultivos celulares... ¿quién me iba a decir que todo ello formaría parte de mi vida? Pero también se cruzó la anatomía en mi camino. De la mano del Dr. José Luis López Rivero aprendí a procesar, analizar e interpretar trabajando con muestras de musculatura esquelética. Un trabajo arduo y, a veces, desagradecido por los impedimentos técnicos, pero con resultado reconocido. Mi humilde conocimiento de biología muscular te lo debo a ti, a tu confianza y a tus ganas de enseñar.

Ha llegado el final de esta primera etapa y en este manuscrito dejo constancia del trabajo realizado y de los resultados obtenidos. Pero este final no es más que el principio de nuevas cuestiones por resolver. Si algo he aprendido en estos años es que el conocimiento es tan amplio que cuanto más sabes más conscienciente eres de lo que te queda por conocer. Mucho recorrido, pero sobre todo mucho por recorrer.

En memoria de Kira

“El conocimiento es el alimento del alma”

Platón, 427-347 a.C.

Índices

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN	1
1. Metabolismo energético	3
1.1. Obesidad: situación actual e implicaciones para la salud pública ..	3
1.2. Homeostasis del metabolismo energético	4
1.3. Vías de señalización celular de nutrientes	8
➤ Vía de señalización de la AMPK	10
➤ Vía de señalización de mTOR	14
1.4. Restricción calórica (RC)	18
2. Metabolismo mineral	23
2.1. Homeostasis del calcio y el fósforo	23
2.2. Mecanismos reguladores del metabolismo mineral	24
➤ Vitamina D	24
➤ Hormona paratiroidea	28
➤ Factor de crecimiento fibroblástico 23	29
3. Conexión entre metabolismo energético y mineral	35
3.1. Alteraciones del metabolismo mineral y enfermedades metabólicas. Visión general	35
3.2. Relación entre ingesta calórica y FGF23	36
3.3. Relación entre ingesta calórica y Trastorno Mineral-Óseo	38
3.4. Vías de señalización de nutrientes y metabolismo mineral	41
4. Enfermedad renal y calcificación vascular	45
4.1. Contexto actual de la enfermedad renal	45
4.2. Fisiopatología de la enfermedad renal y la calcificación vascular	45
4.3. Importancia de la dieta en pacientes renales	50
➤ Efecto del fósforo	51

➤ Efecto de la ingesta calórica	53
5. Músculo esquelético	57
5.1. Biología muscular. Estructura y función del músculo esquelético	57
➤ Estructura del músculo esquelético	57
➤ Función de la musculatura esquelética	60
5.2. Masa muscular: aspectos generales	61
5.3. Efecto del estatus nutricional en la masa muscular	63
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Experimentos <i>in vivo</i>	73
➤ Aspectos éticos	73
➤ Animales	73
➤ Dietas	74
➤ Procedimientos quirúrgicos	75
➤ Diseño experimental	77
➤ Eutanasia y toma de muestras	85
➤ Bioquímica sanguínea	86
➤ Balance de fósforo	87
➤ Estudio de calcificación vascular	88
➤ Estudio de histomorfometría muscular	89
➤ Estudios de biología molecular	92
Experimentos <i>in vitro</i>	98
➤ Línea celular	98
➤ Cultivo celular	98
➤ Diseño experimental	99
➤ Estudios de expresión génica	103

➤ Análisis estadístico	106
RESULTADOS	107
Sección 1. Metabolismo energético y mineral	109
Experimentos <i>in vivo</i>	109
➤ Estudio 1. Efecto de la ingesta calórica sobre el metabolismo energético y mineral: protocolo de dieta hipocalórica	109
➤ Estudio 2. Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo energético y mineral: protocolo de dieta normocalórica restringida	115
Experimentos <i>in vitro</i>	120
➤ Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el FGF23 en cultivos celulares	120
Sección 2. Enfermedad renal y calcificación vascular	127
➤ Estudio 3. Efecto de la restricción calórica sobre la enfermedad renal y la calcificación vascular	127
Sección 3. Metabolismo mineral y composición muscular	141
➤ Estudio 4. Efecto de la dieta hipocalórica sobre el metabolismo de la vitamina D y la composición muscular	141
DISCUSIÓN	151
Sección 1. Metabolismo energético y mineral	153
1.1. Efecto de la RC sobre el metabolismo energético	155
1.2. Efecto de la RC sobre el balance de fósforo	156
1.3. Efecto de la ingesta calórica sobre el FGF23	158
1.4. Efecto de la RC sobre la vitamina D	161
1.5. Modulación del FGF23 por la ingesta calórica: mecanismos moleculares	164

Sección 2. Enfermedad renal y calcificación vascular	173
2.1. Efecto de la RC en el desarrollo de calcificaciones urémicas ...	176
2.2. Efecto de la RC en la regresión de calcificaciones urémicas	184
Sección 3. Metabolismo mineral y composición muscular	187
3.1. Efecto de la RC sobre la masa muscular	187
3.2. Efecto de la RC sobre el fenotipo del músculo esquelético	190
3.3. RC y músculo esquelético: implicación de la vitamina D	193
CONCLUSIONES	201
RESUMEN	205
SUMMARY	211
REFERENCIAS	217
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	291
ARTÍCULO 1. <i>Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR</i>	293
ARTÍCULO 2. <i>Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification</i>	307
ARTÍCULO 3. <i>Increased 1,25(OH)₂-vitamin D concentrations after energy restriction are associated with changes in skeletal muscle phenotype</i>	321
ARTÍCULO 4. <i>Caloric intake in renal patients: repercussions on mineral metabolism</i>	337

APÉNDICES	357
Otras publicaciones científicas	359
Agradecimientos	361
Financiación	363

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de los órganos involucrados en el control de la homeostasis energética	5
Figura 2. Representación esquemática de las funciones fisiológicas en las que se encuentra involucrada AMPK. Fuente: Steinberg y Carling, 2019	12
Figura 3. Representación esquemática de las funciones fisiológicas en las que se encuentra involucrada mTOR. Fuente: Laplante y Sabatini, 2012	16
Figura 4. Resumen del proceso metabólico de la vitamina D	27
Figura 5. Representación del control hormonal de la homeostasis del fósforo	33
Figura 6. Factores que influyen en el desarrollo de enfermedad óseo-metabólica	41
Figura 7. Representación de la fisiopatología de la calcificación vascular durante la enfermedad renal crónica. Fuente: Zununi et al., 2020	48
Figura 8. Diseño experimental de los estudios de metabolismo energético y mineral	81
Figura 9. Diseño experimental de los estudios de calcificación vascular y regresión de calcificación vascular	84
Figura 10. Ingesta calórica (a), concentración plasmática de fósforo (b), absorción neta de fósforo (c) y concentración plasmática de FGF23 (d) en ratas alimentadas con una dieta con un contenido calórico alto (HC), normal (NC) o bajo (hC). *p<0,05 vs NC	112

Figura 11. (a) Concentración plasmática de calcitriol en ratas alimentadas con una dieta con un contenido calórico alto (HC), normal (NC) o bajo (hC). *p<0,05 vs NC. (b) Correlación entre FGF23 y calcitriol en plasma (r=-0,803, p<0,001) en el conjunto de las ratas de estudio 113

Figura 12. Correlación entre FGF23 y (a) ingesta calórica, (b) absorción intestinal de fósforo y (c) fósforo en plasma en ratas alimentadas con dieta de un contenido calórico alto, normal o bajo. *p<0,05 vs NC 114

Figura 13. Evolución del peso corporal en ratas alimentadas ad libitum (línea continua) o con un protocolo de restricción calórica (línea discontinua) durante el tiempo de experimento 116

Figura 14. (a) Concentración plasmática de FGF23, (b) expresión de ARNm de alfa-Klotho en el riñón y (c) proteína renal de alfa-Klotho en ratas alimentadas con una ingesta calórica normal (control) o restringida (NCR). *p<0,05 vs Control 119

Figura 15. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG) o baja (LG) durante 6 días. *p<0,05 vs HG 120

Figura 16. Respuesta de expresión de ARNm de FGF23 en un estudio de (a) dosis-dependencia en células UMR 106 incubadas durante 6 días con diferentes concentraciones de glucosa, *p<0,05 vs 4,5 g/L y (b) tiempo-dependencia en células UMR 106 incubadas con un medio de cultivo con una concentración baja de glucosa (LG), *p<0,05 vs 0 días 121

Figura 17. Expresión de ARNm de FGF23, RunX2 y Osterix en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG, barras negras) o baja (LG, barras grises) durante 6 días. *p<0,05 vs HG 122

Figura 18. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG) o baja (LG) y baja con adición de manitol (LG+Man) durante 6 días. *p<0,05 vs HG	122
Figura 19. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta y fósforo normal (HG-NP), glucosa alta y fósforo alto (HG-HP), glucosa baja y fósforo normal (LG-NP) o glucosa baja y fósforo alto (LG-HP) durante 6 días. *p<0,05 vs HG-NP	123
Figura 20. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG), glucosa alta y DMSO (HG+DMSO), glucosa alta y rapamicina 10 nM (HG+Rap) o glucosa alta y everolimus 10 nM (HG+Eve) durante 6 días. *p<0,05 vs HG	124
Figura 21. Expresión de ARNm de STIM1 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta sin inhibidor (HG), con rapamicina 10 nM (HG+Rap) o con everolimus 10 nM (HG+Eve) durante 6 días. *p<0,05 vs HG	124
Figura 22. Respuesta de expresión de ARNm de FGF23 en un estudio de (a) dosis-dependencia en células UMR 106 incubadas durante 6 días con diferentes concentraciones de rapamicina, *p<0,05 vs 0 nM; y (b) tiempo-dependencia en células UMR 106 incubadas con rapamicina a 10 nM, *p<0,05 vs 0 días	125
Figura 23. Evolución del peso corporal en los diferentes grupos de ratas incluidas en el estudio de calcificación vascular	128
Figura 24. (a) Concentración plasmática de FGF23 y (b) expresión renal de ARNm de <i>Klotho</i> en los grupos de ratas incluidos en el estudio de calcificación de vascular (CV)	133

Figura 25. Concentración de calcio contenido en tejido aórtico (superior) y secciones representativas de aorta teñida con Von Kossa (inferior) de los animales incluidos en el estudio de calcificación vascular (CV)	134
Figura 26. Curva de supervivencia Kaplan-Meier en ratas urémicas durante la fase de calcificación vascular (a) incluyendo todos los animales del estudio y (b) excluyendo a los animales sacrificados anticipadamente. (c) Correlación entre el peso corporal al inicio del periodo de calcificación y el tiempo de supervivencia	136
Figura 27. (a) Concentración plasmática de FGF23 y (b) Expresión renal de ARNm de <i>Klotho</i> en los grupos de ratas alimentadas con una ingesta calórica normal (Grupo 5) o reducida (Grupo 6) durante la fase de regresión de la calcificación vascular. ^a p<0.05 vs Grupo 1	139
Figura 28. Concentración de calcio contenido en tejido aórtico (superior) y secciones representativas de aorta teñida con Von Kossa (escala 100 μ m) (inferior) en los grupos de ratas alimentadas con una ingesta calórica normal (Grupo 5) o reducida (Grupo 6) durante la fase de regresión de la calcificación vascular	140
Figura 29. (a) Peso corporal de las ratas en el momento del sacrificio, (b) peso muscular y (c) índice somático muscular de los músculos tibial craneal, TC, y sóleo, SOL, en el momento del sacrificio en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (hC, barra gris). *p<0.05 vs Control	142
Figura 30. Composición fibrilar del músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (barra gris). *p<0.05 vs Control	144

Figura 31. Tamaño fibrilar en el músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (barra gris). * p<0.05 vs Control	145
Figura 32. Actividad media de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en las fibras en el músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (barra gris). * p<0.05 vs Control	146
Figura 33. (a) Concentración plasmática de calcidiol, (b) concentración plasmática de calcitriol, (c) expresión renal de la enzima 1-alfa-hidroxilasa, Cyp27b1, (d) expresión renal de la enzima 24-hidroxilasa, Cyp24a1, y (e) concentración plasmática de FGF23 en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control) o reducido (hC). * p<0.05 vs Control ...	148
Figura 34. Correlación entre la concentración de calcitriol plasmático y el índice somático muscular en el músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en el conjunto de ratas alimentadas con una dieta de un contenido calórico normal o reducido	149
Figura 35. Influencia del contenido calórico de los alimentos en la absorción intestinal de fósforo	158
Figura 36. Regulación del calcitriol por el contenido calórico de la dieta secundaria a cambios en el FGF23	164
Figura 37. Representación esquemática de la propuesta mecánica por la cual el FGF23 se encuentra regulado por la ingesta calórica	170
Figura 38. Regulación del FGF23 por el contenido calórico de la dieta	172
Figura 39. Factores que influyen sobre el desarrollo de la calcificación vascular	176

Figura 40. Propuesta mecanicista sobre la influencia de la restricción calórica en los cambios fenotípicos de la musculatura esquelética 200

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación y características de los tipos de fibras musculares	59
Tabla 2. Características de las dietas utilizadas durante los experimentos <i>in vivo</i>	75
Tabla 3. Secuencias de las parejas de <i>primers</i> utilizados para cada gen estudiado en tejido renal	95
Tabla 4. Secuencias de las parejas de <i>primers</i> utilizados para cada gen estudiado en cultivos celulares	105
Tabla 5. Parámetros bioquímicos relacionados con metabolismo energético y función renal	117
Tabla 6. Parámetros relativos al balance de fósforo	118
Tabla 7. Ingesta calórica e ingesta de fósforo pre y post inducción de calcificación vascular	129
Tabla 8. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal en ratas urémicas en fase de calcificación vascular	131
Tabla 9. Ingesta calórica e ingesta de fósforo en las distintas fases del experimento de los grupos incluidos en el estudio de regresión	138
Tabla 10. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal en ratas urémicas en fase de regresión de calcificación vascular	138

Lista de abreviaturas

ADP: Adenosín-difosfato

Akt: Proteína quinasa B

AMP: Adenosín-monofosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP (del inglés, *AMP-activated protein kinase*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín-trifosfato

Ca: Calcio

Calcidiol: 25(OH)-vitamina D₃ o 25(OH)-colecalfiferol

Calcitriol: 1,25(OH)₂-vitamina D₃

CaxP: Producto calcio-fósforo

CMO: Contenido mineral óseo

Colecalciferol: Vitamina D₃

CTR: Calcitriol

Cyp24a1: Enzima 24-hidroxilasa

Cyp27b1: Enzima 1-alfa-hidroxilasa

CV: Calcificación vascular

DMEM: del inglés, *dulbecco's modified Eagle's medium*

DMO: Densidad mineral ósea

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNasa: Desoxirribonucleasa

DO: Densidad óptica

DTT: Ditioneol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido egtazico

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción

EM: Energía metabolizable.

ERC: Enfermedad renal crónica

Ergocalciferol: Vitamina D₂

Eve: Everolimus

EWGSOP: Grupo de Trabajo de Sarcopenia en Personas Ancianas (del inglés, *European Working Group on Sarcopenia in Older People*)

FBS: Suero fetal bovino

FGFs: Factores de crecimiento fibroblásticos

FGF21: Factor de crecimiento fibroblástico 21

FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23

FGFR1: Receptor 1 de factor de crecimiento fibroblástico

FKBP12: del inglés, *12 kDa FK binding protein*

FOXO1: del inglés, *forkhead box O1*

GALNT3: Enzima UDP-N-acetil-alfa-galactosamina-transferasa 3

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GLUT2: Transportador de glucosa tipo 2

hC: Hipocalórico/a

HC: Hipercalórico/a

hC-NP: Hipocalórica con fósforo normal

HC-NP: Hipercalórica con fósforo normal

HEPES: Ácido hidroxietil piperazina etanosulfónico

HG: Alta glucosa/control *in vitro*

HP: Alto fósforo

ICP-MS: Espectrofotometría de masas por plasma acoplado inductivamente

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IMC: Índice de masa corporal

INE: Instituto Nacional de Estadística

ISM: Índice somático muscular

KDIGO: del inglés, *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

LG: Baja glucosa

LXR: Receptor X hepático

MHC: Miosina de cadena pesada

MG: Glucosa media

mTOR: del inglés, *mechanistic target of rapamycin*

mTORC1: Complejo 1 de mTOR

mTORC2: Complejo 2 de mTOR

NaPi: Transportador de fósforo sodio-dependiente

NaPi2a: Transportador de fósforo sodio-dependiente tipo IIa

NaPi2c: Transportador de fósforo sodio-dependiente tipo IIc

NC: Normocalórico/a

NC1,2: Normocalórico/a y 1,2% de fósforo

NC1,8: Normocalórico/a y 1,8% de fósforo

NC-NP: Normocalórica con fósforo normal

NCR: Normocalórico/a restringida

NP: Fósforo normal

Nx: Nefrectomía

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OCT: Temperatura de corte óptima (del inglés, *optimal cutting temperature*)

OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)

Orai 1: del inglés, *calcium release-activated calcium channel protein 1*

P: Fósforo

Pit1/Pit2: Transportador de fósforo sodio-dependiente tipo III.

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PTEN: Enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTH: Hormona paratiroidea

Rap: Rapamicina

RC: Restricción calórica

RC-NP: Dieta de restricción calórica con fósforo normal

Rictor: Componente de mTOR insensible a la rapamicina (del inglés, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RunX2: Factor de transcripción 2 de la familia Runx

SDH: Succinato deshidrogenasa

SDS-poliacrilamida: Poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SOCE: del inglés, *store-operated calcium entry*

SOL: Sólido

SRA: Sistema renina-angiotensina

STIM1: Molécula de interacción estromal 1

Tbp: Proteína de unión TATA (del inglés, *TATA binding protein*)

TC: Tibial craneal

TFG: Tasa de filtración glomerular

TMO-ERC: Trastorno mineral-óseo asociado a enfermedad renal crónica

TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa

TOR: Molécula diana de la rapamicina (del inglés, *target of rapamycin*)

TS: Tasa de supervivencia

TTBS: Buffer de solución salina Tris-Tween

VDR: Receptor de vitamina D

VDRE: Elementos respondedores de vitamina D

VSMC: Células del músculo liso vascular

Introducción

1. METABOLISMO ENERGÉTICO

1.1. Obesidad: situación actual e implicaciones para la salud pública

La obesidad es un problema de gran importancia sanitaria y de tendencia epidémica a nivel mundial. Actualmente, está reconocida como un factor de mortalidad prematura en la población. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), las enfermedades cardiovasculares, respiratorias y la diabetes mellitus se encuentran entre las 10 enfermedades que acumulan el mayor número de muertes en el mundo (WHO, 2020); y todas ellas comparten un mismo factor de riesgo: la obesidad (WHO, 2021).

En España, la prevalencia de la obesidad se encuentra en un 14,5% ascendiendo hasta un 38,5% en el caso de sobrepeso. Además, según el informe de 2019 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), la obesidad supone el 9,7% del gasto anual de la sanidad pública (OCDE, 2019), siendo un importante problema sanitario del siglo XXI en el país.

Aunque el origen de la obesidad es multifactorial, el elevado consumo de alimentos altamente calóricos unido al aumento del sedentarismo son los principales factores que influyen en el desarrollo de sobrepeso. La excesiva oferta en el mercado de productos de elevada densidad energética dificulta el control de los hábitos nutricionales. Además, muchos de estos productos carecen de un valor nutricional adecuado, lo que implica un desajuste del

balance metabólico general. Por otro lado, la necesidad de elaborar alimentos altamente palatables es un punto crítico en la industria alimentaria ya que de ello depende su aceptación en la población. Esto conduce al uso de aditivos en los productos elaborados, que persiguen alcanzar este objetivo. Aunque es bien conocido el uso de endulzantes con este fin y el riesgo que conlleva su consumo en el desarrollo de determinadas patologías como la diabetes mellitus tipo 2 (Carocho et al., 2017; Mejia y Pearlman, 2019), también el fósforo es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como aditivo, especialmente en productos elaborados de comida rápida (Takeda et al., 2014). Además, este se encuentra en forma de fósforo inorgánico, que es conocido que se absorbe más fácilmente que el fósforo contenido en los alimentos (Sarathy et al., 2008). Teniendo en cuenta que el fósforo, junto al calcio, es un mineral clave en el metabolismo mineral, la sobreingesta y el consecuente aumento de la carga tubular renal de fósforo repercute negativamente en los sistemas de regulación metabólicos, contribuyendo al progreso de la enfermedad renal (Gutiérrez, 2013; Santamaría et al., 2018).

1.2. Homeostasis del metabolismo energético

Según la definición recogida por el Instituto de Metabolismo Celular, “el metabolismo energético es la parte del metabolismo celular destinado a

almacenar y consumir combustibles para cubrir las necesidades energéticas del organismo” (Meléndez-Hevia, 2011).

Mantener un correcto balance energético es una labor que involucra a diferentes órganos, desde aquellos ampliamente reconocidos como participantes directos en el metabolismo energético (tubo digestivo, hígado, tejido adiposo) hasta el sistema nervioso central; pasando, también, por el sistema músculo-esquelético (Frontera y Ochala, 2015; Andermann y Lowell, 2017; Titchenell et al., 2017; Martin et al., 2019) (Figura 1).

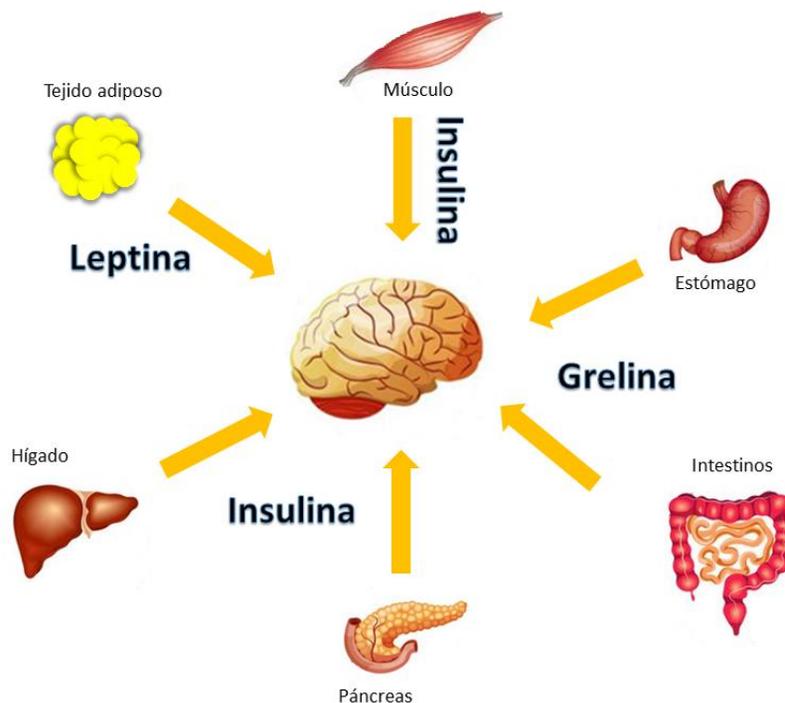


Figura 1. Representación esquemática de los órganos involucrados en el control de la homeostasis energética. Tanto órganos directamente relacionados con el proceso metabólico (estómago, intestinos, hígado) como aquellos que actúan como reservorios energéticos (músculo esquelético y tejido adiposo) o control endocrino (tejido adiposo y páncreas) forman un sistema hormonal de señalización informando al cerebro del estatus nutricional del organismo.

El organismo obtiene la energía necesaria para su funcionamiento, principalmente, a través de dos mecanismos esenciales: metabolismo glucídico y metabolismo lipídico. El metabolismo glucídico es el mayor soporte energético del organismo por su rapidez y menor necesidad de gasto durante la obtención de energía. La glucosa procedente de la dieta, tras absorberse en el tubo digestivo, se incorpora al hígado a través del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2), donde se almacena en forma de glucógeno sirviendo como fuente de reserva energética (Thorens, 2015; Mulukutla et al., 2016; Dimitriadis et al., 2021). Por otro lado, el músculo esquelético juega un papel fundamental en el metabolismo glucídico no sólo por la alta demanda energética para ejercer las funciones locomotoras, sino por ser también un importante reservorio de glucosa, que se almacena en forma de glucógeno por un mecanismo dependiente de insulina (Frontera y Ochala, 2015; Argilés et al., 2016).

El segundo pilar imprescindible en la homeostasis energética es el metabolismo lipídico. Los lípidos aportan 9,4 kcal por cada gramo de grasa ingerida, valor muy superior a las 4 kcal/g que aportan los carbohidratos y las proteínas. El tejido adiposo, tradicionalmente asociado con una función limitada al almacenamiento de reservas energéticas, es reconocido actualmente como órgano endocrino de importante papel en la regulación del balance energético. Se encuentra involucrado no sólo en funciones relativas al metabolismo de los lípidos sino también interviniendo en la captación de glucosa dependiente de insulina, en la modulación de la respuesta del sistema

inmune e incluso en el control de la presión arterial (Ahima y Flier, 2000; Halberg et al., 2008; Rodríguez et al., 2008).

El tejido adiposo produce sustancias de señalización conocidas como adipocinas. Entre estas sustancias se encuentra la leptina. La leptina fue descubierta en 1994 y definida como “hormona de la obesidad” por su papel en el control del peso corporal gracias a su acción de inhibición directa sobre el apetito (Obici y Rossetti, 2003). Desde su descubrimiento ha sido una hormona muy estudiada como posible terapia para el tratamiento de obesidad y resistencia a la insulina (Zhao, S. et al., 2019), pues, junto con la adiponectina, es una de las hormonas encargadas de modular la sensibilidad a la insulina.

Además, recientemente se ha descrito la existencia de una hormona perteneciente a la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) que se encuentra estrechamente involucrada en la regulación de la homeostasis energética participando en la modulación tanto del metabolismo de la glucosa como de los lípidos. Esta hormona es el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) y ha demostrado tener multitud de funciones metabólicas. Así, esta proteína participa en la regulación de la glucemia gracias a su expresión en el hígado; en la oxidación de los ácidos grasos, por encontrarse en tejido adiposo; o favoreciendo la funcionalidad pancreática, ejerciendo como factor antiinflamatorio en este órgano (Fisher y Maratos-Flier, 2019).

Cada una de las señales generadas por cada órgano implicado en la regulación del estatus energético del organismo es enviada al sistema nervioso central, concretamente al hipotálamo. El hipotálamo es una glándula endocrina situada entre los dos hemisferios cerebrales. Es el encargado de regular multitud de procesos fisiológicos, entre ellos el apetito y la ingesta (Denbow, 1989; Trimper y Brüning, 2017). Así, el control del apetito se consigue gracias a la interacción entre procesos físico-químicos e hipotálamo, siendo un mecanismo de regulación directamente ligado a la demanda celular y sujeto al aporte de nutrientes. El control de la ingesta es, por tanto, un mecanismo neuroendocrino por el cual se produce la activación/represión del centro del hambre y de la saciedad en el hipotálamo en respuesta a los diferentes estímulos procedentes: a) del tubo digestivo (barorreceptores y hormonas gástricas), b) de la concentración de nutrientes en el torrente sanguíneo (glucosa, lípidos y aminoácidos), y c) de las señales sensoriales procesadas en la corteza cerebral (Ritter, 2004; Maljaars et al., 2007; Blouet y Schwartz, 2010; Holsen et al., 2012; Dendy et al., 2019).

1.3. Vías de señalización celular de nutrientes

El control metabólico ha sido desde años atrás hasta la actualidad el gran objetivo para la corrección o estabilización de patologías crónicas que afectan a la sociedad moderna como la obesidad, el síndrome metabólico o la diabetes

mellitus, entre otras. Sin embargo, a pesar de su importancia, la información de la que disponemos acerca de la implicación de los mecanismos directos de regulación de nutrientes en la fisiopatología de las enfermedades es relativamente escasa.

La señalización celular de nutrientes es el mecanismo molecular más básico por el cual un organismo es capaz de mantener un correcto balance energético. Su fundamento se basa en la interacción sensor-nutriente con la finalidad de alertar sobre la abundancia o déficit de los recursos energéticos (glúcidos, lípidos y aminoácidos). Una molécula se considera sensor cuando es capaz de desencadenar la activación/inhibición de las diferentes vías reguladoras tras la interacción con un determinado nutriente u otra molécula (por ejemplo, hormonas) capaz de señalar el estatus energético celular (Efeyan et al., 2015).

Entre los mecanismos de señalización de nutrientes encontramos diferentes proteínas implicadas en la modulación energética de la célula. La más conocida por la población general es la insulina debido a las implicaciones que esta hormona tiene en la fisiopatología de la diabetes mellitus, una enfermedad ampliamente reconocida por la sociedad. La insulina es una hormona producida por las células beta-pancreáticas y que está relacionada con un estatus de repleción de nutrientes. Esto es, niveles de glucosa elevados en la circulación sistémica señalizan a la célula para promover la glucogenogénesis, almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, e inhibiendo además la glucogenólisis, liberación de glucosa a partir del glucógeno almacenado

(Dimitriadis et al., 2021). El mecanismo opuesto surge en una situación de depleción energética, en la que es la grelina, hormona comúnmente conocida como “hormona del hambre” y secretada por el estómago, la que toma el control glucídico, señalizando el déficit energético e incrementando los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo (Mani et al., 2019). Estas moléculas actúan como señalizadoras del metabolismo glucídico ejerciendo su acción sobre las vías de señalización de la insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).

Aunque son varios los sensores de nutrientes que se conocen, por ser objeto de estudio en esta tesis, nos centraremos en dos fundamentalmente: AMPK (del inglés, *AMP-activated protein kinase*) y mTOR (del inglés, *mechanistic target of rapamycin*).

Vía de señalización de la AMPK

AMPK, como su nombre indica, es una proteína quinasa activada por adenosín-monofosfato (AMP). Fue identificada como tal en la década de los 80, cuando se purificó por primera vez a partir del hígado de la rata (Munday et al., 1988). Es una proteína que se encuentra en todas las células eucariotas y su principal acción es la de regular el metabolismo energético señalizando la disponibilidad de nucleótidos de AMP y de adenosín-difosfato (ADP) relativos a la cantidad de adenosín-trifosfato (ATP). El aumento de la ratio AMP/ATP o

ADP/ATP estimula la actividad de AMPK, promoviendo la fosforilación de estas moléculas y dando como resultado la generación de nucleótidos trifosfato (Carling, 2017; Yan et al., 2018).

Cuando se descubrió la AMPK el principal hallazgo fue su papel fundamental en la regulación del metabolismo energético por protagonizar los mecanismos reguladores de la síntesis lipídica en el hígado de la rata (Munday et al., 1988) pero, actualmente, se sabe que esta proteína responde al estrés energético actuando como sensor de nutrientes en diferentes órganos y tejidos, siendo el principal sensor energético celular en los mamíferos (Xu, J. et al., 2012; Garcia y Shaw, 2017; Steinberg y Carling, 2019) (Figura 2). Así, la actividad de la AMPK no se restringe únicamente al control homeostático del metabolismo de los lípidos, sino que influye también sobre el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, colesterol, así como sobre crecimiento celular y autofagia (Herzig y Shaw, 2018; Li y Chen, 2019; Steinberg y Carling, 2019).

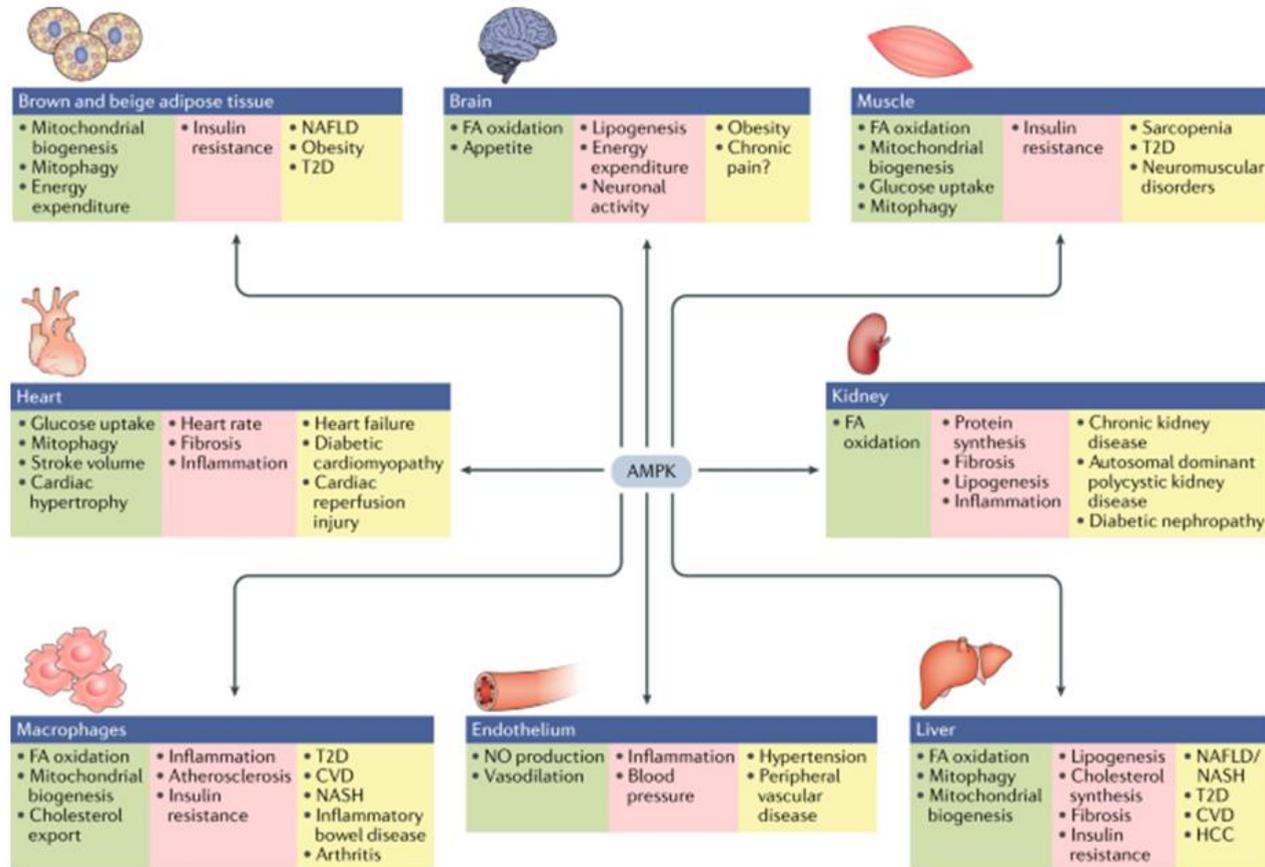


Figura 2. Representación esquemática de las funciones fisiológicas en las que se encuentra involucrada AMPK. Fuente: Steinberg y Carling, 2019.

Aunque se le atribuye a AMPK la inhibición de la síntesis proteica y el proceso de autofagia celular, esta actividad está mediada de forma indirecta por la inhibición del complejo 1 de mTOR (mTORC1) que acontece durante la estimulación de AMPK (Garcia y Shaw, 2017). El crecimiento celular también se encuentra co-regulado entre AMPK y mTOR. Esto es, en condiciones de baja disponibilidad energética, la activación de AMPK conlleva la inhibición de mTOR, lo que se traduce en la disminución del crecimiento celular, así como de la inhibición de la síntesis proteica (Hezig y Shaw, 2018).

Diversas son las situaciones en la que la vía de la AMPK puede ser activada o inhibida. Puesto que se trata de una quinasa dependiente de AMP, su principal vía de estímulo es el estatus energético celular. Así, se ha descrito que AMPK se activa en situaciones de alto consumo energético como es el caso del ejercicio, donde se han encontrado beneficios sobre el aprovechamiento del glucógeno y la sensibilidad a la insulina por parte del músculo esquelético (Hardie 2011; Friedrichsen et al., 2013; Janzen et al., 2018). No obstante, publicaciones recientes han evidenciado que esta proteína no sólo responde al déficit energético celular, sino que además es capaz de señalar la glucosa de forma independiente al estrés celular (Lin y Hardie, 2018). Esto es un punto importante a remarcar puesto que implica que la privación de energía encabezada por la disponibilidad de glucosa ejerce efectos directos sobre las vías de señalización de nutrientes y, consecuentemente, contribuye a intercambiar anabolismo por catabolismo celular, sin existir una necesidad

orgánica directa. Cabría pues pensar que AMPK podría activarse como señal de aviso ante situaciones susceptibles de provocar estrés energético celular.

Todo esto hace que AMPK se haya asentado como objetivo claro en los estudios sobre metabolismo energético convirtiéndose en una molécula que ha traspasado la barrera de la investigación para introducirse en la industria farmacéutica como diana para el control metabólico (Carling, 2017; Herzig y Shaw, 2018; Steinberg y Carling, 2019). De hecho, el conocimiento sobre el alcance de AMPK tiene especial interés por su aplicación terapéutica en patologías como la diabetes tipo 2, cáncer, inflamación y obesidad (Garcia y Shaw, 2017; Herzig y Shaw, 2018).

Vía de señalización de mTOR

Entre los mecanismos moleculares de regulación del metabolismo energético, y estrechamente relacionada con la vía de la AMPK, se encuentra mTOR. La proteína mTOR es una serina/treonina perteneciente a la familia de las fosfatidilinositol-3-quinazas (PI3K) (Laplante y Sabatini, 2012). mTOR fue descubierta en la década de los 90, cuando Sabers y colaboradores aislaron la proteína en células de mamíferos, nombrándola por primera vez como *mammalian target of rapamycin* (Sabers et al., 1995). No obstante, unos años antes a su identificación en mamíferos, ya diversos autores pusieron de manifiesto la existencia de la molécula TOR (*target of rapamycin*). Estos

autores la catalogaron como proteína responsable del efecto tóxico de la rapamicina en las levaduras (Hietman et al., 1991; Kunz et al., 1993). La rapamicina (también conocida como sirolimus) es un antibiótico macrólido con función inmunosupresora que inhibe la activación de las células T y se une al receptor citosólico FKBP12 (del inglés, *12 kDa FK binding protein*), inhibiendo la actividad de mTOR y ejerciendo un efecto antiproliferativo a nivel celular (Saunders et al., 2004).

mTOR no es una molécula simple, sino que interactúa con otras proteínas para formar complejos multiproteicos. Así, se diferencian dos complejos de mTOR. mTORC1 está formado por cinco proteínas y se caracteriza por ser sensible a la inhibición por rapamicina (Tokunaga et al., 2004; Chen y Zhou, 2020). Cumple funciones relacionadas con el metabolismo, crecimiento, proliferación y autofagia celular gracias a su actuación como sensor de nutrientes, concretamente de proteínas, lípidos y nucleótidos (Pena-Leon et al., 2020). El complejo 2 de mTOR, mTORC2, por su parte, está constituido por un total de seis proteínas, entre ellas *riCTOR* (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), que le confiere la característica de insensibilidad parcial a la rapamicina. Este complejo se encarga de la activación de otras proteínas involucradas en funciones metabólicas, así como en la apoptosis celular (Chen y Zhou, 2020; Huang, 2020) (Figura 3).

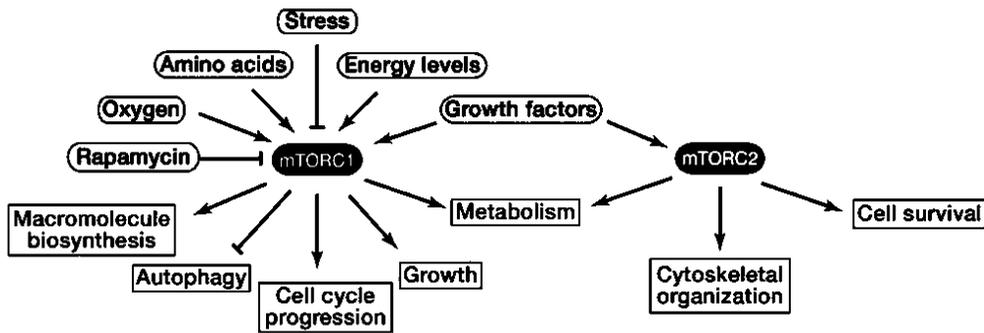


Figura 3. Representación esquemática de las funciones fisiológicas en las que se encuentra involucrada mTOR. Fuente: Laplante y Sabatini, 2012.

Dado lo expuesto, se hace evidente el importante papel que tiene mTOR en la regulación del metabolismo celular. Desde su descubrimiento hace más de 30 años, son múltiples y diversas las funciones metabólicas asignadas a esta proteína. Sin embargo, todas estas funciones pivotan en torno a la capacidad de mTOR para actuar como sensor celular de nutrientes (Pena-Leon et al., 2020), característica gracias a la cual consigue mantener un correcto balance entre catabolismo y anabolismo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. (Laplante et al., 2012).

La desregulación de mTOR ha demostrado estar involucrada en diferentes patologías, desde trastornos metabólicos como la obesidad o la diabetes, hasta el proceso natural del envejecimiento, pasando por el cáncer (Chen y Zhou, 2020; Huang, 2020). En este sentido, en la última década, ha crecido de forma incesante su estudio como posible diana terapéutica para combatir estos dos últimos procesos. Así, mientras algunos estudios apuestan por la capacidad

antiproliferativa resultante de la inhibición de mTOR como estrategia clave para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Gibbons et al., 2009; Huang, 2020). Otros se han centrado en el envejecimiento. Así, en el año 2015, Cavanagh y colaboradores publicaron una extensa revisión en la que recogieron la evidencia existente hasta el momento sobre la implicación de mTOR en el proceso del envejecimiento en sus diferentes facetas. En ella, los autores remarcan el poder mimético que tiene la inhibición de mTOR en relación a los efectos observados durante un régimen de restricción calórica (RC) en roedores (Cavanagh et al., 2015). Además, resulta interesante resaltar que la actividad de mTOR no se limita a regular el metabolismo celular localizado, sino que hay estudios que avalan la capacidad de esta proteína para intervenir en el control del apetito actuando como sensor directo del estatus energético para el hipotálamo (Cota et al., 2004).

En los últimos años se han publicado algunos estudios en los que se demuestran los beneficios de la inhibición de mTOR en diferentes patologías; desde aquellas puramente metabólicas como la obesidad (Makki et al., 2014) hasta el cáncer (Gibbons et al., 2009), las enfermedades cardiovasculares (Hamano, 2015; Zhao, Y. et al., 2015; Chiao et al., 2016; Maciejewski-Duval et al., 2018) y el envejecimiento en general. Sin embargo, aún no se sabe con certeza la implicación que la inhibición de mTOR pudiera tener en otros trastornos como la osteoporosis o en procesos músculo-esqueléticos (también propios del envejecimiento). Algunos estudios indican que la inhibición de

mTOR podría beneficiar a la salud ósea demostrando ser útil en la inhibición del crecimiento celular en osteosarcomas (Gobin et al., 2014). No obstante, es bien sabido que mTOR es un eslabón clave en la diferenciación celular de los osteoblastos y que interviene en el control de la resorción ósea, siendo imprescindible en el mantenimiento de la homeostasis del hueso (Bakker y Jaspers, 2015). En este contexto hay estudios con resultados contradictorios en cuanto a los efectos de mTOR sobre el hueso. Algunos autores defienden que la inhibición de mTOR tiene consecuencias negativas sobre el crecimiento mientras que otros reportan que la actividad de esta proteína está directamente relacionada con la pérdida de masa ósea (Shen et al., 2018).

Todo esto pone de manifiesto la importancia de mTOR en la homeostasis general del organismo, respaldando los argumentos que defienden la necesidad de investigar en profundidad sobre el alcance de su actividad y los posibles mecanismos que permitan intervenir en su ruta de regulación, posicionando a mTOR como diana estratégica en el control de enfermedades (Xu, T. et al., 2020).

1.4. Restricción calórica (RC)

La RC es un protocolo de actuación dietético ampliamente extendido en la nutrición médica como tratamiento directo de la obesidad. Así, la RC ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la adiposidad, interviniendo en la

conversión de tejido adiposo blanco en grasa parda, favoreciendo la termogénesis (Fabbiano et al., 2016).

Además de ser una herramienta útil en el control y pérdida de peso, la RC ha demostrado tener múltiples efectos beneficiosos sobre la salud de especies tan diversas como macacos (Colman et al., 2009), nematodos (Lee, G.D. et al., 2006), roedores (Almendáriz-Palacios et al., 2020) y también en humanos (Most et al., 2017). De hecho, más allá de los efectos directos de la RC sobre la adiposidad, se ha demostrado que la RC modula el metabolismo energético de tal forma que permite retardar el envejecimiento orgánico a diferentes niveles. En un estudio realizado en ratones, se observó que alimentar a los animales con un protocolo de RC durante 74 semanas favoreció la reprogramación hepática del metabolismo lipídico, disminuyendo la lipogénesis mediante la reducción de la expresión del receptor X hepático (LXR) y aumentando la lipólisis mediante el aumento de los niveles de FGF21 (Khula et al., 2014). También se ha demostrado que la RC mejora la salud cardiovascular ya que retrasa el envejecimiento vascular (Csiszar et al., 2009), protege la integridad endotelial y reduce la presión arterial (Daniele et al., 2021). Por otro lado, actualmente están emergiendo investigaciones encaminadas a estudiar los beneficios de la RC sobre la inmunidad en el cáncer (Eriau et al., 2021). El riñón es otro de los órganos que se beneficia de la disminución de la carga calórica de la dieta. Algunos autores exponen que la RC favorece la prevención del deterioro renal, reduciendo la gravedad de la nefropatía crónica desarrollada como

consecuencia del envejecimiento (Wang, S.Y. et al., 2018; Singh y Krishan, 2019).

El envejecimiento es objeto de estudio en muchos centros de investigación. La finalidad de estos trabajos es la de comprender la fisiología del envejecimiento a nivel celular y molecular en busca de estrategias que permitan retrasar el deterioro orgánico y mejorar la calidad de vida. En esta línea, en 2013, López-Otín y colaboradores publicaron una extensa revisión en la que recogen los puntos claves del envejecimiento. Entre ellos se encuentran no sólo las alteraciones producidas a nivel genómico sino también otros aspectos como la integridad proteica, la desregulación neuroendocrina o la alteración en la señalización celular de nutrientes (López-Otín et al., 2013).

Especialmente interesante resulta el papel de los sensores de nutrientes en todo este proceso. Diferentes publicaciones demuestran que un protocolo de RC aumenta la esperanza de vida en roedores de laboratorio hasta un 10% (Omodei y Fontana, 2011). Sin embargo, los efectos sobre el aumento de la esperanza de vida en humanos se antojan difíciles de explorar; aunque los beneficios de la RC sobre patologías de carácter crónico como obesidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares están bien reconocidos (Omodei y Fontana, 2011). Los mecanismos por los cuales la RC protege frente al envejecimiento son también foco de múltiples investigaciones. Hasta el momento se ha demostrado que los beneficios derivados de este protocolo dietético son consecuencia de la capacidad que tiene para disminuir la

inflamación y el estrés oxidativo, además de estimular de la autofagia (Wang, S.Y. et al., 2018). Aunque la información existente sobre los mecanismos moleculares que intervienen en estos procesos es aún escasa, en los últimos años ya se han establecido conexiones entre estos y los efectos de la RC. En la revisión de Cavanagh y colaboradores de 2015, los autores ya recogieron la relación entre el sistema renina-angiotensina (SRA), la RC y mTOR postulando que los efectos frente al envejecimientos se encuentran ligados a la reducción de mTOR mediados tanto el SRA como por la RC (Cavanagh et al., 2015). En esta misma línea, en un estudio *in vitro* publicado recientemente, los autores ponen de manifiesto la implicación directa de las vías de señalización de mTOR y AMPK como responsables, al menos parcialmente, de la estimulación de la autofagia inducida por la RC (Ferreira-Marques et al., 2021).

El conocimiento sobre la relación entre el deterioro orgánico (concretamente renal) y el consumo desorbitado de alimentos altamente procesados y calóricos, junto a la evidencia sobre los beneficios de la RC y sus miméticos ha sido clave en el planteamiento de la presente Tesis Doctoral. En ella, se pretende explorar los efectos de la reducción de la ingesta calórica en el contexto de la enfermedad renal poniendo el foco en las alteraciones del metabolismo mineral (responsables de la mortalidad asociada a esta enfermedad) así como profundizar en los mecanismos implicados.

2. METABOLISMO MINERAL

2.1. Homeostasis del calcio y el fósforo

A pesar de la complejidad funcional y estructural de los mamíferos, el hecho es que aproximadamente un 94% de la composición corporal se reduce únicamente a seis elementos básicos: oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, calcio y fósforo; mientras que otros 44 elementos se incluyen en el 2% restante en forma de trazas (Wang, Z.M. et al., 1992). Teniendo en cuenta que un tercio de nuestro cuerpo es agua, y, por tanto, oxígeno e hidrógeno, se hace evidente la importancia de los dos minerales, calcio y fósforo.

El calcio es el mineral más abundante del organismo y, junto con el fósforo, conforman la estructura ósea de este. Así, la mayor parte del calcio (90%) y el fósforo (85%) del organismo se encuentra en forma de hidroxiapatita, cristales formados por fosfato cálcico. El resto del calcio adquiere un rol funcional siendo necesario para acciones como la transmisión de los impulsos nerviosos, la contracción muscular o la formación de otros compuestos imprescindibles en multitud de procesos fisiológicos, como la coagulación (Peacock, 2010).

El calcio plasmático se encuentra en tres formas posibles en el siguiente orden de abundancia: calcio iónico (50%), calcio unido a proteínas (40%) o conformando otros compuestos (10%). La forma iónica es la que adquiere la mayor importancia ya que es la que participa directamente en los procesos

fisiológicos (Bushinsky y Monk, 1998). La concentración de calcio se mantiene en un estrecho rango de variación gracias a un complejo sistema de regulación liderado por hormonas como son la vitamina D, la hormona paratiroidea (PTH) o la calcitonina (Hall, 2016).

Por su parte, el fósforo es también un elemento esencial en la conformación de moléculas tan importantes como los ácidos nucleicos o el ATP y el AMP, moléculas necesarias para llevar a cabo las funciones metabólicas del organismo (Peacock, 2021). El fósforo también se puede encontrar en el organismo en diferentes formas: unido a lípidos, unido a proteínas o en forma de fosfatos constituidos por fósforo inorgánico, siendo esta la forma que se encuentra libre en el plasma (Hall, 2016). El mecanismo de regulación de la concentración de fosfatos se encuentra liderado por la acción del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), actuando este en consonancia con la vitamina D y la PTH (Sun et al., 2020; Peacock, 2021).

2.2. Mecanismos reguladores del metabolismo mineral

Vitamina D

La vitamina D, junto con el FGF23 y la PTH, es uno de los elementos principales involucrados en el metabolismo mineral y es esencial para el correcto funcionamiento del metabolismo óseo. Las acciones lideradas por la vitamina D en el metabolismo fosfocálcico se resumen en: 1) favorecer la

absorción intestinal de calcio y fósforo, 2) reducir la excreción renal de calcio y fosfatos, 3) estimular la resorción y remodelación ósea.

La vitamina D sufre un complejo proceso metabólico por el cual se convierte desde su forma inactiva (provitamina) a su forma activa involucrando en todo el proceso a diferentes órganos (piel, hígado y riñón). La vitamina D se obtiene bien por la ingesta directa en la dieta en forma de ergocalciferol (vitamina D₂) o colecalciferol (vitamina D₃), o mediante la síntesis en la piel con la intervención de la radiación solar. La principal forma inactiva de la vitamina D en los organismos superiores es la provitamina D₃. El colecalciferol se metaboliza en el hígado dando lugar al compuesto 25(OH)-colecalciferol, también conocido como 25(OH)-vitamina D₃ o calcidiol. El proceso enzimático final por el cual el calcidiol se transforma en el principal metabolito activo de la vitamina D es mediante una reacción de hidroxilación llevada a cabo en el riñón y dando como resultado la conversión a 1,25(OH)₂-vitamina D₃ (calcitriol) (Judd y Tangpricha, 2009; Zhang y Naughton, 2010).

La concentración de vitamina D está modulada por los niveles de calcio y fósforo en plasma. Así, concentraciones bajas de estos dos elementos actúan como estímulo para activar la cadena metabólica de la vitamina D. Además, al menos en parte, la vitamina D también se encuentra regulada por los niveles de FGF23, el cual actúa de forma directa sobre el metabolismo de la vitamina D reduciendo la enzima 1-alfa-hidroxilasa (Cyp27b1) y aumentando la 24-hidroxilasa (Cyp24a1). Esto tiene como resultado una disminución en la

producción renal de 1,25(OH)₂-vitamina D₃ (Shimada et al., 2004; Hasegawa et al., 2010). La secreción de la vitamina D también se ve influida por los niveles de PTH de tal forma que un aumento de esta hormona secundario a un descenso de calcio estimula la producción de calcitriol, que a su vez ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la PTH, disminuyendo su secreción (Greco y Stabenfeldt, 2017) (ver Figura 4).

Aunque la vitamina D se conoce tradicionalmente como “vitamina”, se sabe que sus funciones no se limitan al control del metabolismo fosfocálcico sino que abarcan un amplio espectro de acción participando en multitud de procesos fisiológicos haciendo funciones propias de una hormona (Christakos et al., 2013; Charoenngam y Holick, 2020; Saponaro et al., 2020). Así, se ha encontrado que la deficiencia de vitamina D repercute negativamente en la salud cardiovascular (Kaur et al., 2018; Disthabanchong y Srisuwarn, 2019), en procesos inflamatorios (Mansouri et al., 2017), en la función renal (Vilacuenca et al., 2018) o en la salud ósea (Schoor et al., 2008).

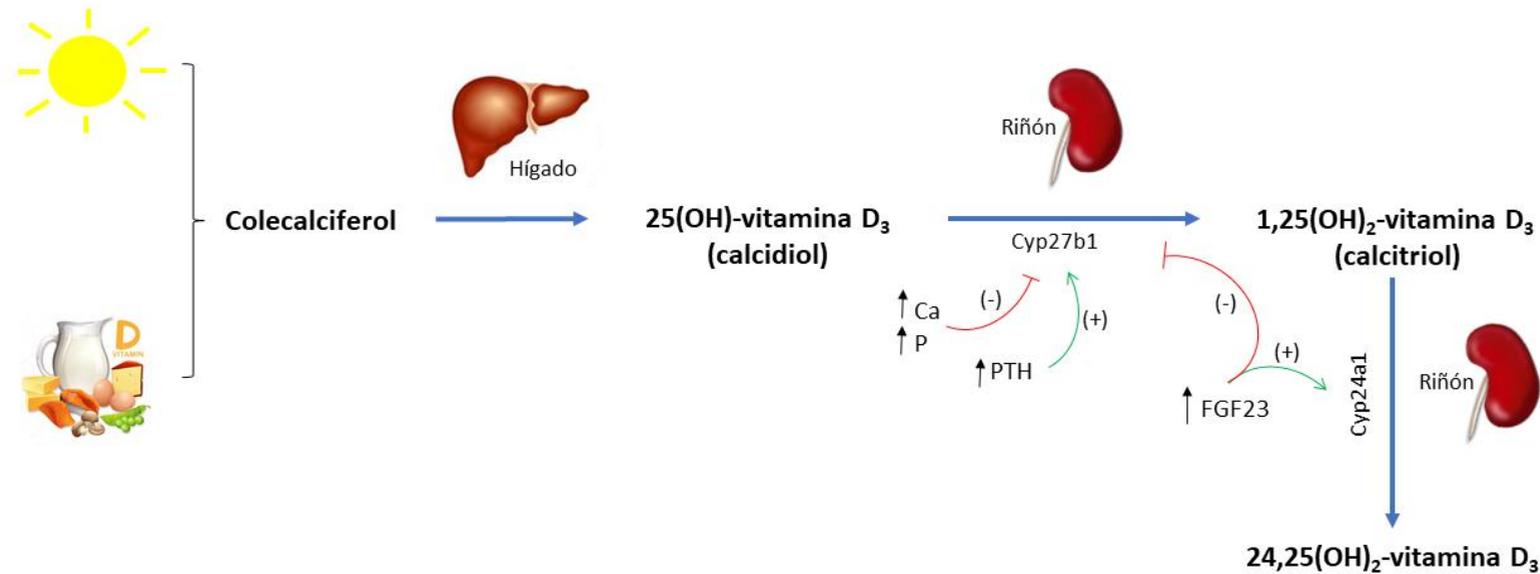


Figura 4. Resumen del proceso metabólico de la vitamina D. La vitamina D se obtiene bien por la ingestión directa en la dieta o mediante la síntesis en la piel con la intervención de la radiación solar que sintetiza la provitamina D₃ a colecalciferol. El colecalciferol se metaboliza en el hígado dando lugar a la forma inactiva de la vitamina D (25(OH)-vitamina D₃), que sufre un proceso de hidroxilación en el riñón mediante el cual se convierte en su forma activa (1,25(OH)₂-vitamina D₃). Este proceso metabólico se encuentra regulado por la actividad de las enzimas 1-alfa-hidroxilasa (Cyp27b1) y 24-hidroxilasa (Cyp24a1), que a su vez se modulan por la concentración de calcio (Ca), fósforo (P), factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) y hormona paratiroidea (PTH).

Hormona paratiroidea

Las glándulas paratiroides son uno de los grandes pilares de la regulación del metabolismo fosfocálcico. Se trata de pequeños órganos situados en las proximidades de la glándula tiroides y cuya función es la de participar en el control del metabolismo mineral mediante la secreción de PTH.

La PTH es una hormona de 84 aminoácidos cuya secreción se encuentra supeditada a los niveles de calcio plasmáticos, de forma que un estado de hipocalcemia estimula la actividad de las glándulas paratiroides incrementando la secreción de PTH, mientras que los niveles elevados de calcio la reducen (Felsenfeld et al., 2015). Aunque el principal estímulo en la secreción de PTH es el calcio, la PTH también responde a las fluctuaciones de fósforo, estimulándose su secreción en respuesta a un aumento de los valores plasmáticos de este (Almaden et al., 1996; Estepa et al., 1999; Blaine et al., 2015).

Al igual que sucede con la vitamina D, la PTH actúa a tres niveles para regular las concentraciones de calcio en plasma: intestinal, renal y óseo. A nivel intestinal, la PTH tiene un efecto indirecto de forma que ante un descenso de calcio iónico se estimula la secreción de PTH, la cual tiene un efecto activador sobre el metabolismo de la vitamina D, incrementándose los niveles de calcitriol y, consecuentemente, resultando en un aumento de la absorción tanto de calcio como de fosfatos (Sun et al., 2020). A nivel renal, la PTH

favorece la reabsorción de calcio, la cual se acompaña de un aumento en la excreción de fosfatos. El tercer nivel de acción de la PTH es el hueso. En este tejido, la hormona actúa favoreciendo la resorción ósea y, por tanto, liberando las sales de calcio y fósforo dando lugar a la descalcificación ósea (Blaine et al., 2015). En ausencia de respuesta de mecanismos compensadores, esta acción podría desencadenar un proceso osteoporótico, muy frecuente en enfermos renales crónicos, donde las alteraciones óseo-metabólicas se engloban dentro del conocido como Trastorno Mineral-Óseo asociado a Enfermedad Renal Crónica (TMO-ERC).

Factor de crecimiento fibroblástico 23

El FGF23, al igual que el FGF21, es una hormona, perteneciente a la familia de los FGFs compuesta por 251 aminoácidos e identificada por primera vez por Yamashita y colaboradores en el año 2000 (Yamashita et al., 2000). Si bien estos primeros autores localizaron su secreción en el núcleo talámico ventrolateral del cerebro, en estudios posteriores se ha podido comprobar que el FGF23 se secreta en diferentes órganos, entre ellos estómago, hígado, riñón, corazón, músculo esquelético o hueso. Del mismo modo que el FGF21 es una pieza clave en el control del metabolismo energético, el FGF23 tiene un papel central en la modulación del metabolismo mineral. A día de hoy está bien constatado y aceptado que se trata de una hormona de acción fosfatúrica

secretada principalmente por los osteocitos/osteoblastos (Vervloet, 2019) teniendo el resto de órganos un papel residual como órganos secretores de FGF23.

La síntesis y secreción del FGF23 está mediada por la ingesta de fósforo, de forma que un balance positivo de este mineral estimula su producción con el fin de estabilizar los niveles plasmáticos de fósforo en el organismo (Ferrari et al., 2005). Este efecto se consigue por la inducción de la internalización de los transportadores de fósforo sodio-dependientes tipo II (NaPi2a y NaPi2c) en el túbulo proximal del riñón. Para que esta acción sea efectiva es necesario que el FGF23 interaccione con un receptor de FGF, FGFR1, y un correceptor, alfa-Klotho, formando así el complejo FGF23/FGFR1/alfa-Klotho, responsable de la acción fosfatúrica del FGF23 (Shimada et al., 2004). Alfa-Klotho es una proteína producida y expresada por el riñón que puede encontrarse bien como proteína transmembrana o bien como forma soluble circulante (Lindberg et al., 2014), siendo el dominio transmembrana de alfa-Klotho el encargado de actuar como correceptor del FGF23 (Erben, 2018). Además de su papel en la regulación de la homeostasis mineral, también se ha demostrado que alfa-Klotho adquiere un rol importante en la protección frente al envejecimiento y patologías asociadas como la enfermedad renal crónica (ERC) (Buchanan et al., 2020).

El mecanismo por el cual el hueso es capaz de señalar los niveles de fósforo está aún en fases de investigación, aunque un estudio reciente postula

que la síntesis de FGF23 en respuesta al fósforo dietético está condicionada a una modificación post-traslacional del FGF23 con la participación del gen que codifica la enzima UDP-N-acetil-alfa-galactosamina-transferasa 3 (GALNT3), enzima necesaria durante el proceso de maduración final de la molécula de FGF23 intacto (Takashi y Fukumoto, 2020).

Además del fósforo, la producción de FGF23 también está supeditada a los niveles de calcitriol (Musuyama et al., 2006) y PTH (López et al., 2011), que estimulan su síntesis. Del mismo modo, el FGF23 actúa directamente sobre el metabolismo de la vitamina D reduciendo los niveles de calcitriol (Shimada et al., 2004). El FGF23 es, por tanto, un elemento esencial en la regulación del metabolismo mineral. Otros factores como la inflamación y la deficiencia de hierro también influyen en la producción de FGF23 (Bożentowicz-Wikarek et al., 2015; David et al., 2016).

A pesar de que en la medicina clínica la medición del FGF23 no está asentada, en el ámbito experimental esta hormona está bien reconocida por su utilidad como biomarcador para valorar la enfermedad renal (Mace et al., 2020) donde se identifica un incremento de los niveles de FGF23 incluso antes de producirse un aumento en el fósforo plasmático o en la PTH (Lang et al., 2018). El aumento de FGF23 como consecuencia del fallo renal ha sido relacionado con factores de riesgo de mortalidad cardiovascular en estos pacientes (Scialla et al., 2014). No obstante, algunos estudios han demostrado que el incremento de FGF23 en enfermedad renal puede ser necesario para

controlar los niveles plasmáticos de fósforo, de forma que una reducción excesiva de FGF23 podría incluso ser perjudicial (Shalhoub et al., 2012; Clinkenbeard et al., 2019). Por otro lado, el incremento de la mortalidad asociada a elevaciones de FGF23 también han sido identificada en estudios realizados en la población general (Kestenbaum et al., 2014; Panwar et al., 2015). Además, publicaciones recientes recalcan la importancia de esta hormona no sólo por su reconocido efecto en el contexto de la ERC sino por su impacto sobre otros órganos como corazón, hígado, sistema inmune o sistema músculo-esquelético (Takashi y Fukumoto, 2018; Rodelo-Haad et al., 2019).

Dado lo expuesto, el equilibrio homeostático del calcio y del fósforo es un complejo sistema de señales en el que participan diferentes órganos (riñón, intestino, hueso, glándulas paratiroides) y moléculas (vitamina D, FGF23, PTH) (Figura 5). El metabolismo fosfocálcico es, por tanto, el resultado de un conjunto de respuestas hormonales encargadas de regular la absorción intestinal, la excreción renal, así como la relación resorción/reabsorción ósea.

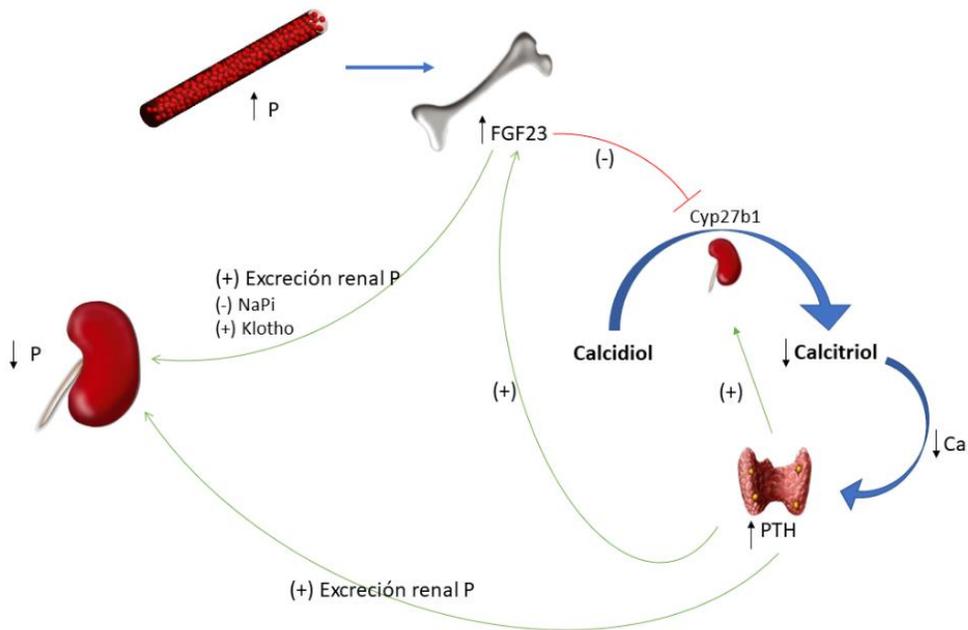


Figura 5. Representación del control hormonal de la homeostasis del fósforo. Ante un aumento de la concentración plasmática de fósforo (P), se estimula la producción del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) en el hueso. El FGF23 se une a su correceptor Klotho con el fin de estimular la excreción renal mediante la internalización de los transportadores de fósforo sodio-dependientes (NaPi), restableciendo así los niveles plasmáticos de fósforo. Por otro lado, el FGF23 y la hormona paratiroidea (PTH) se encuentran interconectados indirectamente por la modulación del metabolismo de la vitamina D, a través de la regulación de la enzima 1-alfa-hidroxilasa (Cyp27b1). Ca, calcio.

3. CONEXIÓN ENTRE METABOLISMO ENERGÉTICO Y MINERAL

3.1. Alteraciones del metabolismo mineral y enfermedades metabólicas.

Visión general

Metabolismo energético y mineral no son entidades independientes. Prueba de ello es que, en la última década, diversas publicaciones han puesto de manifiesto la conexión existente entre ellos.

La obesidad se ha relacionado con el desarrollo de osteoporosis (Migliaccio et al., 2011), hiperparatiroidismo (Cheng et al., 2011) y calcificación vascular (CV) (Peralta-Ramírez et al., 2014). Pacientes con síndrome metabólico o alguna de las patologías que lo definen (hiperinsulinemia, hiperglucemia) manifiestan alteraciones en los niveles plasmáticos de elementos como calcio, fósforo y magnesio; o las hormonas que los regulan: PTH, calcitriol o FGF23 (Guerrero-Romero et al., 2008; Tremblay y Gilbert, 2011; Wojcik et al., 2012). En un estudio de Kir y colaboradores, encontraron que la PTH ejerce efectos directos sobre el tejido adiposo, actuando en los mecanismos responsables del desarrollo de caquexia (Kir et al., 2016). En otros estudios realizados en roedores también se ha encontrado que la leptina incrementa las concentraciones de PTH sin influir en otros parámetros del metabolismo mineral (Lopez et al., 2017), y que estimula de forma directa la producción de FGF23 (Tsuji et al., 2010). Por otro lado, el LXR, molécula que participa en la regulación del flujo de colesterol a nivel hepático, se ha relacionado con el

metabolismo del fósforo. Se ha reportado que el tratamiento con agonistas de LXR en ratones reduce las concentraciones plasmáticas de fósforo por un mecanismo mediado por la reducción de la producción y actividad de los transportadores NaPi (Caldas et al., 2011). Además, en otro estudio experimental publicado en 2018, Pineda y colaboradores demostraron que disminuir la carga calórica en la dieta de ratas sanas previene el efecto deletéreo que la ingesta elevada de fósforo tiene sobre FGF21, molécula clave en la regulación de la homeostasis energética (Pineda et al., 2018).

3.2. Relación entre ingesta calórica y FGF23

La interacción entre las alteraciones del metabolismo energético y mineral tiene importantes implicaciones en el sistema sanitario, por ser características propias de la ERC, una de las patologías de mayor prevalencia en la población envejecida. En este contexto, tanto el fósforo plasmático como el FGF23 son elementos de gran importancia en la evaluación de la funcionalidad renal; ambos tienden al alza de forma paralela al grado de disfunción.

Se ha demostrado que la obesidad y el síndrome metabólico influyen directamente sobre el desarrollo y progresión de la enfermedad renal produciendo alteraciones en los podocitos (Wickman y Kramer, 2013). Además, actúan como factor agravante de hipertensión arterial, causa y

consecuencia del detrimento de la función de este órgano (Hamrahan y Falkner, 2017).

Diferentes estudios sugieren que el FGF23 pudiera estar regulado por la ingesta calórica; de hecho, ya en 2009, en un estudio de cohorte realizado con 3014 pacientes, Marsell y colaboradores demostraron una asociación positiva entre el FGF23 y el peso corporal (Marsell et al., 2009). En 2015, Giuseppe y colaboradores identificaron el incremento de la ingesta calórica como un elemento de predicción de las concentraciones plasmáticas de FGF23 (Giuseppe et al., 2015). Además, recientes estudios experimentales realizados en ratas ponen de manifiesto que la alimentación con dietas hipercalóricas resulta en un aumento tanto de los valores plasmáticos de FGF23 (Rios et al., 2018) como de su expresión en el hueso (Raya et al., 2016), incluso en animales con la función renal intacta. En el mismo estudio de Raya y colaboradores, los autores encontraron que alimentar ratas urémicas con una dieta alta en grasa no sólo resultó en un incremento del FGF23, sino que además condujo al agravamiento de la CV de estos animales (Raya et al., 2016), principal complicación en enfermos renales (Scialla et al., 2014). A pesar de estos datos, la relación entre ingesta energética y FGF23 no está clara. Es bien sabido que la ingesta de dieta altamente calórica induce un estado de inflamación en el organismo (Poret et al., 2018) además de ser nociva para la funcionalidad renal (Wickman y Kramer, 2013; Boini et al., 2014) y ambos factores están directamente relacionados con el aumento de FGF23 (Kanbay et

al., 2017; Rodríguez-Ortiz et al., 2020), por lo que la existencia de una relación directa entre calorías y FGF23 está aún por dilucidar. No obstante, en el estudio experimental de Rios y colaboradores, en el que se alimentó a ratas sanas con dieta alta en grasa, los autores observaron un aumento de FGF23 por una vía independiente al desarrollo de un proceso inflamatorio (Rios et al., 2018).

3.3. Relación entre ingesta calórica y Trastorno Mineral-Óseo

La ingesta calórica también tiene una profunda influencia en los parámetros óseos, un efecto que se ha relacionado estrechamente con el peso corporal. De hecho, tradicionalmente se ha pensado que la obesidad tenía efectos protectores sobre el esqueleto.

Aunque la información existente respalda que la ingesta de dietas de alta densidad energética resulta en un aumento de la masa ósea y que la ingesta baja en calorías la disminuye, los beneficios de la obesidad sobre la salud ósea es un tema cuestionado en la actualidad. Estudios recientes demuestran que la obesidad está asociada con un menor riesgo de sufrir ciertas fracturas (por ejemplo, tobillo) pero con un mayor riesgo de padecer otras (por ejemplo, muñeca) (Gnudi et al., 2009; Compston et al., 2011). De igual modo, influye la edad del individuo. Así, el sobrepeso en niños ha demostrado ser factor de riesgo para las fracturas, mientras que puede actuar como factor protector en personas adultas (Dimitri et al., 2012). No obstante, la evidencia sobre los

beneficios o perjuicios de la acumulación de grasa sobre la salud ósea en poblaciones más ancianas es aún escasa y controvertida (Hasegawa et al., 2010). Si bien hay artículos que defienden que el aumento de la carga mecánica en la obesidad es la responsable de la mayor densidad mineral ósea (DMO) observada en estos pacientes, otros apuntan al exceso de grasa corporal como factor perjudicial para la misma (Shapses y Sukumar, 2012). Los efectos nocivos estarían relacionados directamente con mecanismos metabólicos como el aumento de la adipogénesis de la médula ósea (Sheu y Cauley, 2011) o la desregulación de adipocinas (Cao, 2011). Además, el aumento de adiposidad también se ha relacionado con la secreción de citocinas proinflamatorias, las cuales pueden influir sobre la remodelación y, por tanto, ser perjudiciales para la salud ósea (Greco et al., 2015; Cao, 2018).

Los datos experimentales también demuestran los efectos negativos de las dietas altas en grasas sobre el metabolismo óseo (Savvidis et al., 2018). Distintos autores reportan que incrementar el contenido de grasa en la dieta de ratas y ratones modifica la estructura ósea, influye sobre el contenido mineral óseo (CMO) y la DMO y promueve la infiltración de adipocitos en la médula ósea (Demigné et al., 2006; Xu, F. et al., 2013; Malvi et al., 2014; Fujita y Maki, 2016; Wong et al., 2018). Sin embargo, no todos los datos apuntan en la misma dirección. Se sabe que la alteración del perfil lipídico tras una alimentación de alto contenido en grasas afecta a la homeostasis del hueso (Yin et al., 2019), lo que podría reducir el contenido mineral óseo y modificar la

estructura del hueso (Graham et al., 2010; Pelton et al., 2012). Sin embargo, los datos existentes sobre el CMO y la DMO en modelos animales de síndrome metabólico no encuentran consenso. Algunos autores reportan la ausencia de cambio en estos parámetros (Wong et al., 2018) mientras que otros reportan incremento (Malvi et al., 2014) o reducción (Demigné et al., 2006) de los mismos.

En la situación opuesta, la pérdida de peso inducida por la RC se asocia con una reducción de la DMO sin afectar negativamente a la microarquitectura del hueso (Shapses et al., 2006; Villareal et al., 2006; Villareal et al., 2011; Villareal et al., 2016) aunque la falta de consenso vuelve de nuevo a ser un problema en este campo. De hecho, hay estudios que demuestran que la pérdida de peso en pacientes obesos no sólo disminuye la DMO, sino que también afecta a la funcionalidad y resistencia ósea (Ensrud et al., 2018; Schoell et al., 2018). Sin embargo, está demostrado que la RC reduce la inflamación, mejora la sensibilidad a la insulina y puede tener beneficios en enfermedades cardiovasculares, todos ellos elementos claves en el desarrollo de osteoporosis y fracturas (Dennison et al., 2004; Ding et al., 2008; Barbour et al., 2014; Veronese et al., 2017).

A pesar de los datos que arrojan los estudios, todos ellos se han realizado en un contexto de función renal normal. Teniendo en cuenta la importancia de la salud ósea en la ERC, serían necesarios más estudios para investigar el efecto de la RC sobre el desarrollo y progresión del TMO-ERC (Figura 6).

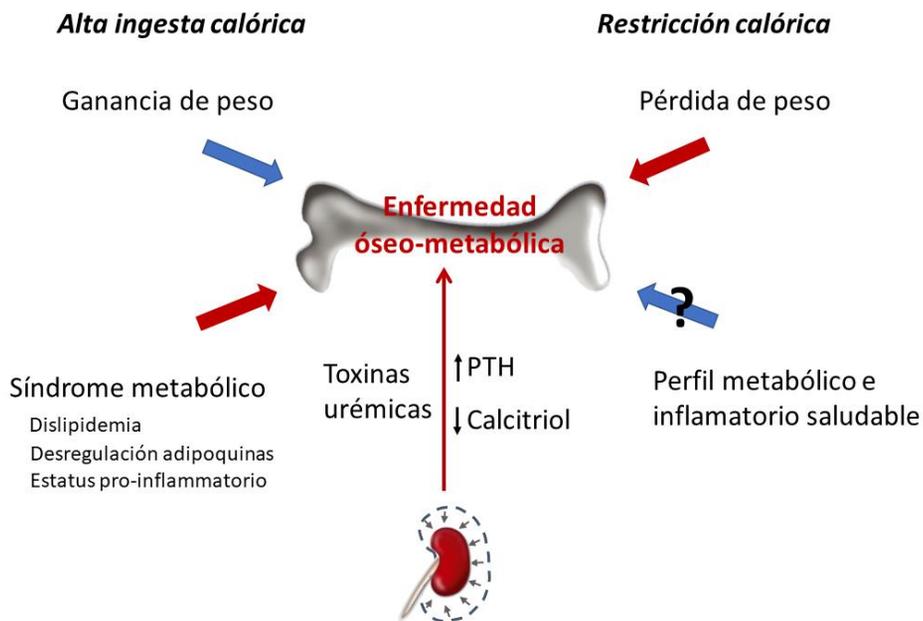


Figura 6. Factores que influyen en el desarrollo de enfermedad óseo-metabólica. La enfermedad renal crónica conduce a enfermedad óseo-metabólica debido a la acción directa de las toxinas urémicas sobre el hueso y a los cambios asociados en el metabolismo mineral. La ingesta calórica puede influir sobre la salud ósea mediante dos mecanismos: estrés mecánico asociado al peso corporal y cambios metabólicos/inflamatorios. El aumento de peso corporal asociado a la ingesta alta de calorías promueve el anabolismo óseo por un aumento del estrés mecánico y al contrario con la pérdida de peso corporal tras la restricción calórica. Sin embargo, los cambios metabólicos e inflamatorios asociados a la elevada ingesta calórica son perjudiciales para los huesos, mientras que el perfil metabólico e inflamatorio más saludable observado después de la restricción calórica ayuda a preservar la masa ósea. PTH, hormona paratiroidea.

3.4. Vías de señalización de nutrientes y metabolismo mineral

Saber cuál es el alcance de la acción de los mecanismos moleculares implicados en la regulación del metabolismo energético y mineral es una buena forma de tomar conciencia del grado de complejidad de la fisiología del organismo y de la fisiopatología de las enfermedades.

En este contexto, se ha demostrado que uno de los mecanismos asociados con la regulación de la síntesis de FGF23 en el hueso es el complejo SOCE

(por sus siglas en inglés, *store-operated calcium entry*) con la intervención del canal de calcio Orai1 (*calcium release-activated calcium channel protein 1*) (Zhang et al., 2016). Estos complejos están regulados, al menos parcialmente, con la intervención de las vías de señalización celular de nutrientes. AMPK, por su parte, actúa inhibiendo Orai1 y, por tanto, alterando el flujo celular de calcio (Bhavsar et al., 2013). En un estudio reciente, Glosse y colaboradores, investigaron la implicación de AMPK en la producción de FGF23 reportando que la activación de AMPK resulta en una disminución de FGF23 mediada por la inhibición de la ruta Orai1-SOCE (Glosse et al., 2016). En este punto, es interesante mencionar que la evidencia sobre la relación entre señalización nutrientes y la producción de FGF23 es aún escasa y los mecanismos por los cuales se produce una regulación de esta hormona mediada por la disponibilidad energética está aún por esclarecer. Esto se hace evidente si analizamos dos artículos recientes que reportan una disminución de FGF23 tras la activación tanto de la ruta AMPK (Glosse et al., 2016) como de la insulina (Bär et al., 2018). Teniendo en cuenta que la AMPK se activa en respuesta a un estatus de depleción energética y que la insulina es un indicador de repleción energética, estos datos se antojan contradictorios.

Al igual que sucede con Orai1, la molécula de interacción estromal 1 (STIM1) es una proteína necesaria en la activación de SOCE (Prakriya y Lewis, 2015). Se ha demostrado que la rapamicina modula la acción de STIM1 (Peng et al., 2013); sin embargo, y en la línea de la relación anteriormente

expuesta entre AMPK y FGF23, la conexión entre la vía de señalización mTOR (inhibida por rapamicina) y la producción de FGF23 no ha sido investigada en profundidad hasta el momento. Los estudios que encontramos en la bibliografía al respecto, aunque persiguen objetivos diferentes al estudio de esta asociación, reportan datos controvertidos en relación al FGF23. En un ensayo clínico realizado en pacientes de trasplante renal, los investigadores no encontraron cambios en el FGF23 sérico seguido de un tratamiento con rapamicina, a pesar de que los pacientes presentaron hipofosfatemia (Tatarami et al., 2011). Sin embargo, en otro estudio *in vivo* llevado a cabo en ratones, se encontró una tendencia a la reducción de FGF23 en animales tratados con rapamicina, postulando que la vía mTOR pudiera estar involucrada en la regulación de FGF23 (Kempe et al., 2016).

La vía mTOR ha demostrado ser no sólo una ruta de señalización energética, sino que además es una molécula que interviene en la regulación de otros órganos directamente relacionados con alteraciones del metabolismo mineral. Así, mTOR juega un papel importante en la regulación del metabolismo óseo (Wang, S. et al., 2020), siendo un elemento clave en el desarrollo de TMO-ERC (Machuca-Gayet et al., 2020). También se ha demostrado que la inhibición de mTOR con rapamicina induce fosfaturia en ratones con función renal normal al favorecer la exposición de los transportadores de fósforo NaPi2a (Kempe et al., 2010) y, a su vez, los niveles elevados de fósforo activan mTOR a nivel renal (Kawai et al., 2016). Las

implicaciones de mTOR en el riñón resultan especialmente interesantes puesto que la rapamicina, inhibidor directo de mTOR, es un compuesto utilizado en medicina humana por su efecto inmunomodulador en los procedimientos de trasplante renal. Aunque la rapamicina ha demostrado tener un efecto protector sobre el riñón (Chen, G. et al., 2012), el estudio realizado por Kempe y colaboradores de 2016 demuestra que la carga tubular de fósforo aumenta en roedores tratados con rapamicina (Kempe et al., 2016). Esto refleja la controversia existente hasta el momento en cuanto al papel de mTOR sobre el metabolismo mineral, pues es bien sabido que la carga tubular de fósforo es un factor determinante en la progresión de la enfermedad renal.

Con todo lo expuesto, se hace evidente que los mecanismos por los cuales el metabolismo energético afecta a parámetros del metabolismo mineral, y al FGF23 como integrante del mismo, son aún controvertidos. La falta de consenso entre las publicaciones y la inexistencia previa de estudios *in vitro* encaminados a estudiar el papel que pudiera ejercer mTOR en la modulación de FGF23, nos llevó a realizar los experimentos que se desarrollarán a lo largo de la presente Tesis Doctoral con el fin de investigar el papel que ejerce el metabolismo energético (liderado por mTOR) sobre el metabolismo mineral y, concretamente, sobre el FGF23.

4. ENFERMEDAD RENAL Y CALCIFICACIÓN VASCULAR

4.1. Contexto actual de la enfermedad renal

La enfermedad renal es un importante problema de salud pública. Actualmente ocupa el octavo puesto en el listado de enfermedades de mayor mortalidad en países desarrollados (WHO, 2020). Según los datos de la Sociedad Española de Nefrología, la incidencia de enfermedad renal en España ha crecido a un ritmo acelerado en la última década. Los últimos estudios muestran un creciente aumento de la prevalencia de ERC augurando que llegará a establecerse en los próximos años como la segunda causa de mortalidad en la población española más anciana (Ortiz et al., 2019). Por otra parte, los eventos cardiovasculares, frecuentemente asociados a enfermedad renal, son la primera causa de mortalidad en el mundo (WHO, 2021). Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), sólo en el periodo comprendido entre los meses de enero a mayo de 2020 murieron casi 30 mil personas en España a causa de alguna enfermedad de origen cardiovascular (INE, 2020).

4.2. Fisiopatología de la enfermedad renal y la calcificación vascular

Se define enfermedad renal como aquella patología que cursa con la pérdida gradual de la funcionalidad renal. El tiempo de instauración, la causa de aparición y el grado de lesión renal nos permite diferenciar entre

enfermedad renal aguda o crónica. Así, mientras que la primera consiste en una lesión renal de instauración rápida y reversible, la segunda se caracteriza por un daño progresivo e irreversible de las nefronas. La ERC se clasifica en 5 estadios en función de la reducción de la tasa de filtración glomerular (TFG): estadio 1 (TFG > 90 ml/min), estadio 2 (TFG = 60-89 ml/min), estadio 3 (TFG = 30-59 ml/min), estadio 4 (TFG = 15-29 ml/min) y estadio 5 (TFG < 15 ml / min) (KDIGO, 2017).

Durante el progreso de la ERC son frecuentes las anomalías óseas, siendo, en gran parte, las responsables del detrimento en la calidad de vida de los pacientes debido al riesgo de sufrir fracturas (KDIGO, 2009; Salam et al., 2014). Estos trastornos óseos son consecuencia de las alteraciones en los parámetros del metabolismo mineral, que desencadenan el complejo síndrome conocido como TMO-ERC, dentro del cual se incluye el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario, alteraciones en la arquitectura ósea y la formación de depósitos minerales en forma de calcificaciones extraesqueléticas (Moe et al., 2006; Kazama et al., 2013; Ureña-Torres et al., 2019). Por tanto, el TMO-ERC es un trastorno metabólico desencadenado en un intento del organismo de compensar los cambios en las hormonas calciotrópicas como consecuencia del deterioro renal.

El incremento en la secreción de FGF23 y PTH en las primeras fases de la enfermedad renal responde a la necesidad de prevenir la acumulación de fósforo y la hipocalcemia. Además, la pérdida de la masa renal funcionante da

como resultado una reducción de la producción de calcitriol (Rodríguez et al., 2012). La disminución de la vitamina D tiene una influencia importante en el desarrollo de trastornos esqueléticos, pues favorece la aparición de fracturas y reduce la supervivencia (Ambrus et al., 2011; Molina et al., 2017). A medida que la enfermedad avanza, los riñones no son capaces de manejar una carga normal de fósforo, saturándose los mecanismos de compensación liderados por FGF23 y PTH. La reducción de la TFG a causa de la pérdida de nefronas, unido a la incapacidad del FGF23 de ejercer su acción fosfatúrica (causado por la disminución de alfa-Klotho), y la activación de la resorción ósea por acción de la PTH, resulta en un acúmulo de calcio y fósforo en la circulación sanguínea que termina depositándose en la pared vascular dando como resultado la CV propia de la ERC (Villa-Bellosta et al., 2011; Zununi et al., 2020) (Figura 7).

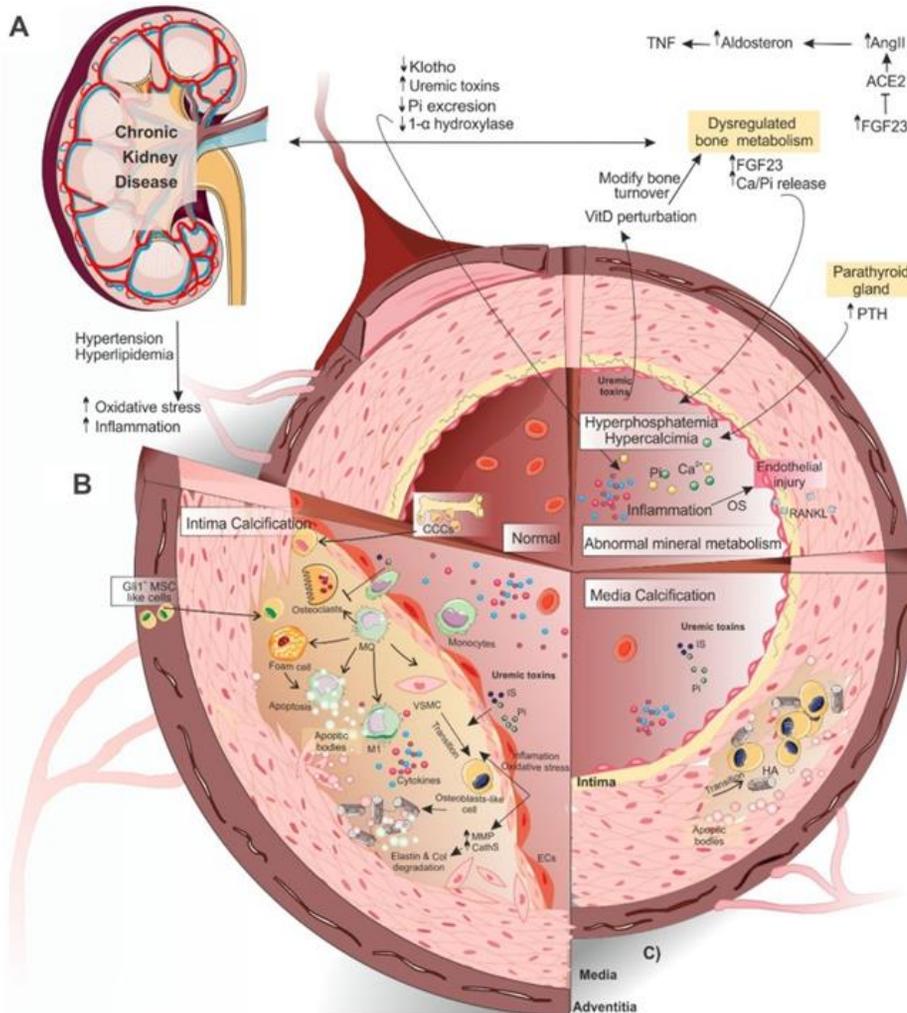


Figura 7. Representación de la fisiopatología de la calcificación vascular durante la enfermedad renal crónica. A medida que avanza la pérdida de función renal, los mecanismos de compensación de la homeostasis del calcio y el fósforo (PTH, FGF23, Klotho) se saturan dando lugar al desequilibrio del sistema de regulación hormonal y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Se produce un incremento de FGF23 y una disminución en la actividad de 1-alfa-hidroxilasa, desencadenando el descenso de $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 (calcitriol). La pérdida de Klotho a consecuencia del daño renal se traduce en el detrimento de la capacidad fosfatúrica del FGF23. El incremento del calcio y fósforo promueve la deposición de estos en las células del músculo liso vascular, en la capa media de las arterias, causando la calcificación vascular. Fuente: Zununi et al., 2020.

La CV se encuentra presente en el 70-80% de los pacientes con ERC (Chen y Bushinsky, 2017) y es uno de los principales factores que contribuyen al incremento de la mortalidad en pacientes renales (Wu et al., 2013; Lee, S.J. et

al., 2020). En un estudio reciente realizado por el servicio de nefrología de Hospital Central de Asturias, los autores encontraron que el desarrollo de CV previo al trasplante en pacientes con ERC supuso una reducción de la esperanza de vida de más de 20 meses (García Castro et al., 2020).

Entre los mecanismos implicados en el desarrollo de la CV se encuentra el aumento del producto calcio-fósforo (CaxP), lo que conlleva la formación de sales que precipitan en la pared vascular, disminuyendo la elasticidad vascular y aumentando la presión sanguínea (Giachelli, 2009; Villa-Bellosta et al., 2011; Lee, S.J. et al., 2020; Zununi et al., 2020). La instauración de la uremia incapacita al riñón para eliminar el fósforo, resultando en un incremento de los niveles plasmáticos de este mineral; es por ello que la hiperfosfatemia se ha identificado como agente promotor de CV de pacientes urémicos (Cozzolino et al., 2019), y está considerada como un importante factor de mortalidad cardiovascular en pacientes con ERC (Block et al., 2004). No obstante, el aumento de fosfatos también se ha asociado a CV en sujetos con función renal normal (Lee, S.J. et al., 2020). Por otro lado, las células del músculo liso vascular (VSMC) también presentan un mecanismo sodio-dependiente para el transporte de fosfatos (Villa-Bellosta et al., 2007). Se ha postulado que la acumulación de fosfatos a consecuencia de la uremia activa los cotransportadores involucrados en dicho canal (Pit-1 y Pit-2), lo que podría inducir el cambio fenotípico de VSMC hacia células osteogénicas (Giachelli, 2009). Esto es, el incremento de los niveles séricos de fósforo conduce a la

disminución de los inhibidores de la calcificación, promoviendo la remodelación de la matriz vascular y favoreciendo la transdiferenciación celular y la formación de calcificaciones ectópicas (Schoell et al., 2018; Lee, S.J. et al., 2020). Además, la conversión de VSMC a células osteogénicas se ve favorecida por otros factores como son la inflamación, el estrés oxidativo celular o los niveles inadecuados de vitamina D (Disthabanchong y Srisuwarn, 2019).

4.3. Importancia de la dieta en pacientes renales

En las últimas décadas la nutrición ha ido adquiriendo cada vez más importancia en el contexto de la prevención y control de diversas patologías, entre ellas enfermedades crónicas como la enfermedad renal.

El progreso de la enfermedad renal se manifiesta como una disfunción metabólica en la que se identifican procesos de diferente naturaleza; desde aquellos de tipo hormonal, encargados del control del metabolismo energético y mineral (factor de crecimiento insulínico o IGF-1, leptina, vitamina D), hasta aquellos de componente inflamatorio (factor de necrosis tumoral alfa o TNF-alfa, interleuquinas), o factores nutricionales, encargados de asegurar el metabolismo proteico y responsables del desarrollo de caquexia renal (Slee, 2012).

La interrelación existente entre el estatus nutricional y varias de las alteraciones encontradas en el desarrollo de la enfermedad renal, hace que la nutrición adquiera gran importancia en el control de esta enfermedad; no sólo con el fin de controlar el desarrollo de trastornos minerales sino también para retrasar el detrimento funcional de los riñones asociados a la edad, así como asegurar una condición corporal adecuada (sobre todo en estadios avanzados donde el aporte nutricional se ve especialmente comprometido).

Entre los factores que influyen en el deterioro de la funcionalidad renal está bien aceptado que la alta carga de fósforo (Santamaria et al., 2018) o el exceso calórico de la dieta (Wickman et al., 2013) tienen efectos nocivos sobre la progresión de la enfermedad renal. Además, la ingesta calórica elevada también afecta negativamente de una forma indirecta, pues facilita la instauración de patologías asociadas como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (Ting et al., 2009).

Efecto del fósforo

El fósforo es un elemento controvertido desde el punto de vista nutricional, pues las consecuencias de su consumo van a variar entre beneficiosas y nocivas en función del estatus de salud. Se ha demostrado que una alta carga de fósforo en la dieta ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo energético en animales sanos: mejora el perfil lipídico, incrementa la sensibilidad a la

insulina y reduce la adiposidad (Abuduli et al., 2016). En cambio, aunque los efectos de la ingesta de fósforo sobre el metabolismo energético en el contexto de enfermedad renal están aún por dilucidar, existe consenso en que el exceso de fósforo en la dieta de pacientes renales es factor de riesgo para la progresión de la enfermedad.

El establecimiento de la enfermedad renal conlleva una sobrecarga de fósforo, consecuencia de la disminución de la capacidad de filtración glomerular de los riñones. Este aumento en la carga de fósforo tiene efectos nocivos en diferentes direcciones: en primer lugar, el incremento de fósforo plasmático es el principal desencadenante del hiperparatiroidismo secundario (Rodríguez-Ortiz et al., 2020); en segundo lugar, contribuye al aumento de la carga ácida en los túbulos renales (Hau et al., 1980; Kraut y Madias, 2016); y en tercer lugar, actúa como desencadenante de estrés oxidativo favoreciendo la progresión de la enfermedad renal disminuyendo la expresión de alfa-Klotho (Santamaria et al., 2018), correceptor esencial en la función fosfatúrica encabezada por el FGF23.

Una de las estrategias más importantes de lucha contra la progresión de la ERC se centra en el control de los niveles plasmáticos de fósforo, ya que su excreción se encuentra limitada en pacientes renales. En este sentido está extendida la recomendación de reducir la ingesta de fósforo, especialmente en pacientes en estadios 4 y 5 de ERC, en los que se desarrolla TMO-ERC (Santamaría et al., 2018; Nemoto et al., 2019). Además, resulta interesante

puntualizar que esta retención de fósforo parece agravarse cuando se asocia a la ingesta de una dieta altamente calórica (Esquinas et al., 2020). En un estudio realizado en roedores, se demostró que reducir la carga de fósforo en la dieta no evita el aumento de FGF23 cuando las ratas se alimentan con una dieta alta en grasa (Rios et al., 2018). Por otro lado, a pesar de que las actuales estrategias de lucha contra la sobrecarga de fósforo en pacientes urémicos consisten en disminuir la absorción intestinal del mismo, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que se regula el transporte intestinal de fósforo. Aunque se sabe que el contenido de fósforo de la dieta juega un papel importante en la expresión de los transportadores NaPi (Ferrari et al., 2005), se desconoce si el contenido calórico también influye en su regulación.

Efecto de la ingesta calórica

Como ya se ha adelantado en líneas anteriores, el contenido calórico de la dieta parece tener un importante papel en la progresión de la enfermedad renal. Hay estudios que demuestran los efectos nocivos que tienen las dietas altamente calóricas sobre el riñón (Wickman et al., 2013), efectos que se acentúan cuando se acompañan de un alto contenido de fósforo (Esquinas et al., 2020). También se ha demostrado que el metabolismo de los fosfatos tiene una alta relación con la obesidad. Un estudio realizado en roedores ha demostrado que ratas Zucker de fenotipo obeso desarrollan un grado de CV

más acentuado que ratas Zucker de fenotipo delgado (Peralta-Ramírez et al., 2004). Además, la ingesta calórica aumentada, en ausencia de obesidad, también agravó la CV en animales con función renal disminuida, según un estudio realizado en ratas Wistar (Rios et al., 2017), efecto que parece estar mediado por la disminución de Klotho renal, unido a la retención de fósforo y el aumento de FGF23 observado en los animales alimentados con dietas altas en grasas (Raya et al., 2016). En la situación contraria, la RC ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la reducción de la inflamación crónica y del estrés oxidativo (Weiss y Fontana, 2011; Wang, S.Y. et al., 2018), parámetros característicos en la obesidad que juegan un papel importante en el desarrollo de CV (Peralta-Ramírez et al., 2014; Raya et al., 2016; Rios et al., 2017). Además, en una revisión reciente se recogen diversos los efectos protectores de un protocolo de RC sobre el riñón tanto en modelos animales como en estudios clínicos (Wang, S.Y. et al., 2018). Los estudios clínicos indican que la RC mejora la TFG (Giordani et al., 2014), disminuye la proteinuria (Friedman et al., 2013) y reduce la creatinina sérica (Morales et al., 2003) en poblaciones de pacientes obesos con diabetes. Por otro lado, los estudios en roedores demuestran que la RC contribuye a la disminución de la proteinuria, reduce los parámetros séricos renales (creatinina, urea) o retrasa el inicio del deterioro renal previniendo la glomerulopatía asociada al envejecimiento (Xu, X. et al., 2015; Wang, S.Y. et al., 2018).

Los datos sobre los efectos de la RC en un contexto de enfermedad renal son escasos y la implementación de esta aún arroja muchas incógnitas. Es más, uno de los aspectos que cuestiona el uso de la RC es su efecto en la salud ósea, ya que se ha demostrado que la RC se encuentra involucrada en la pérdida de DMO (Villareal et al., 2006; Villareal et al., 2016), lo que podría aumentar el riesgo de osteoporosis y fracturas en pacientes con TMO-ERC. A pesar de esto, los estudios experimentales están, en su mayoría, realizados en modelos animales inicialmente sanos; en muchos casos, con el objetivo de investigar el efecto de la RC sobre la función renal en un contexto de nefropatía asociada a la edad. A esto se le suma la dificultad de los estudios en humanos, en los que los ensayos clínicos son complejos de realizar y es necesario reclutar a un número suficiente de voluntarios para obtener conclusiones sólidas que se puedan extrapolar a la población general. Por tanto, el uso de la RC en el contexto de ERC requiere aún de estudios específicos para aclarar el impacto de la misma en todos los escenarios contemplados en esta patología (Afsar et al., 2020).

5. MÚSCULO ESQUELÉTICO

5.1. Biología muscular. Estructura y función del músculo esquelético

El sistema musculoesquelético es el órgano de mayor peso del cuerpo suponiendo alrededor 50% del peso corporal total. Está formado por el conjunto de la masa ósea (~10% del peso corporal) y la musculatura esquelética (40% del peso corporal) (Wang, Z.M. et al., 1992).

Estructura del músculo esquelético

El cuerpo tiene alrededor de 600 músculos, de los que más de 400 se clasifican como músculos esqueléticos. El músculo se constituye por una red de fibras (miofibras) dispuestas de forma organizada y cuyo objetivo principal es el de permitir la contracción muscular dando lugar al movimiento o estabilización del cuerpo.

La composición fibrilar fundamental del músculo esquelético se basa en dos tipos de fibras musculares: de contracción lenta (tipo I) y de contracción rápida (tipo IIA, IIX y IIB). Cada una de estas fibras se definen en función de la expresión de la isoforma de miosina de cadena pesada (MHC) que expresa. Así, en la rata, se diferencian cuatro tipos de MHCs principalmente, uno por cada tipo de fibra muscular mencionado anteriormente (Schiaffino, 2011) y cada uno de ellos tendrá unas características físicas, metabólicas y funcionales

propias (Gordon et al., 2013) (Tabla 1). Aunque en menor número, también se diferencian fibras híbridas, que presentan características intermedias de aquellas fibras de las que proceden (Hamalainen, 1995). Es importante aclarar que el tipo de isoforma MHC que se puede identificar en el músculo esquelético tiene un componente especie-específico (Hamalainen, 1995; Schiaffino, 2018). En el humano, por ejemplo, a diferencia de los roedores, encontramos sólo tres tipos de fibras musculares principales (Schiaffino, 2018). Además, el tipo de fibra está estrechamente relacionado con la función a desempeñar por el músculo en cuestión (Hamalainen, 1995). Un ejemplo de ello es la diferencia entre los músculos definidos como fásicos, los cuales garantizan el movimiento y están compuestos mayormente de fibras rápidas, y los músculos antigravitatorios, que participan en el mantenimiento de la postura componiéndose casi en su totalidad por fibras de contracción lenta. Obsérvese en la Tabla 1 un cuadro resumen de las características que definen cada tipo de fibra muscular.

	Rojas	Intermedias	Blancas
Características físicas			
Tipo de fibra	I	IIA	IIIX y IIB
Tamaño	Pequeño	Intermedio	Grande
Nº mitocondrias	Alto	Alto	Bajo
Nº capilares	Alto	Moderado	Moderado-Bajo
Características metabólicas			
Perfil	Oxidativo	Oxidativo	Glucolítico
Respiración	Aerobia	Aerobia	Anaerobia
Generación de ATP	Elevada	Elevada	Baja
Recurso energético	Grasa	Glucógeno	Glucógeno
Características funcionales			
Contracción	Lenta	Moderada	Rápida
Resistencia a la fatiga	Muy buena	Buena	Baja
Tiempo en acción	Prolongado	Intermedio	Corto
Grado de tensión	Bajo	Moderado	Alto
Utilidad	Postura y estabilización	Locomoción	Locomoción y fuerza
Tipo de ejercicio	Resistencia	Caminar	Velocidad y fuerza

Tabla 1. Clasificación y características de los tipos de fibras musculares.

Cabe mencionar que el músculo esquelético tiene una gran plasticidad, es capaz de modificar su composición fibrilar, tamaño, capacidad de contracción o actividad metabólica para adaptarse a una nueva situación (Schiaffino y Reggiani, 2011). Sirva de ejemplo la adaptación más estudiada: el ejercicio, donde se evidencia la diferente distribución de las fibras musculares y la adaptación metabólica de la musculatura en función del tipo de actividad desempeñada por el atleta (Cartee et al., 2016; Hearn et al., 2018).

Función de la musculatura esquelética

El músculo cumple con diferentes funciones, desde aquellas puramente mecánicas hasta funciones metabólicas. En este sentido, es bien conocida la función locomotora de la musculatura esquelética, la cual se encarga de generar el movimiento o hacer soporte postural. No obstante, la participación en actividades de tipo metabólico de este órgano tiene un importante papel para el correcto funcionamiento del organismo. Así, el músculo esquelético contribuye en la regulación del metabolismo energético por diferentes vías. En primer lugar, cumple un importante papel como reservorio de sustratos energéticos necesarios para garantizar funciones motoras; pero, además, participa en el control de funciones tan básicas como el mantenimiento de la temperatura corporal (Zierath y Hawley., 2004; Frontera, 2015).

5.2. Masa muscular: aspectos generales

El envejecimiento es uno de los desafíos de salud que más preocupa a la sociedad actual, cobrando especial importancia el inexorable deterioro del sistema musculoesquelético. Así, la pérdida de masa muscular es un proceso tradicionalmente asociado al envejecimiento y reconocido como un problema de gran importancia en la sociedad actual (Beudart et al., 2014; Frontera, 2017;).

El “Grupo de Trabajo de Sarcopenia en Personas Ancianas” (EWGSOP, del inglés: *European Working Group on Sarcopenia in Older People*) define sarcopenia como un “trastorno progresivo y generalizado del músculo esquelético asociado a una mayor probabilidad de sufrir caída, fracturas, discapacidad física, incluso, mortalidad”. En contraste con las definiciones anteriormente aceptadas en las que se consideraba sarcopenia únicamente a la pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento, el EWGSOP, en el consenso actualizado, incluye en la definición de sarcopenia no sólo la pérdida física sino también funcional del músculo esquelético (Cruz-Jentoft et al., 2019).

El inicio de la sarcopenia se da en todos los individuos a partir de la edad adulta y se acelera considerablemente durante la senectud (Holloszy, 2000; Roubenof y Castaneda, 2001). Junto con las tendinopatías y la artritis, la sarcopenia conforma la triada de trastornos musculoesqueléticos más

prevalentes en la población adulta y condiciona de forma directa la calidad de vida de las personas afectadas (Minetto et al., 2020).

El deterioro físico y funcional del músculo esquelético no se limita al proceso degenerativo generalizado de los órganos a consecuencia del envejecimiento, sino que tiene un origen multifactorial. La pérdida de masa muscular está asociada a patologías que cursan con caquexia, como son el cáncer (Morley et al., 2006; Martin y Freyssenet, 2021) o la ERC avanzada (Fahal et al., 2014; Noce et al., 2021), trastornos hormonales (Roy et al., 2002; Garnham et al., 2020), malnutrición o inactividad (Denison et al., 2015; Granic et al., 2019). El avance de la medicina ha permitido cronificar patologías retrasando/reduciendo la mortalidad, por lo que el impacto de la salud muscular en una sociedad más longeva, pero a su vez con alta incidencia de enfermedad crónica, es aún mayor.

Todo esto hace que la pérdida de masa muscular sea motivo de estudio de multitud de investigaciones cuyo objetivo común se centra en encontrar los mecanismos sobre los que actuar para conseguir el retraso y prevención de este proceso. Las evidencias encontradas hasta el momento son esclarecedoras, apuntando a una misma dirección: el mantenimiento y recuperación de la masa muscular es un pilar fundamental para garantizar un buen estado de salud. En esta línea, Merz y colaboradores exponen en un artículo reciente los beneficios del ejercicio para mantener un estatus muscular saludable mejorando la respuesta a la insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Merz et al.,

2021). Otros estudios demuestran que la suplementación nutricional previene la pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento (Dupont et al., 2019; Liao et al., 2019). Además, diferentes publicaciones respaldan que la prevención de la pérdida de masa muscular disminuye el tiempo de hospitalización en pacientes con diferentes patologías (Hamasaki et al., 2017).

5.3. Efecto del estatus nutricional en la masa muscular

La nutrición es una rama de la salud que está tomando cada vez más importancia por ser una estrategia efectiva en el tratamiento, la prevención o el manejo de diferentes trastornos; desde la obesidad o las alteraciones digestivas a las patologías crónicas como la enfermedad renal, el cáncer o, incluso, el retraso del envejecimiento. Es importante recordar que el músculo esquelético tiene un papel fundamental en el control metabólico, actuando como fuente de reserva energética, pero, a su vez, suponiendo para el organismo una demanda importante de energía. Esta energía la obtiene en forma de ATP procedente, principalmente, de la vía glucolítica. No obstante, durante el ejercicio y estrés muscular, el tejido adiposo actúa de sensor energético para el músculo activando la ruta lipolítica. Esto permite que, en situaciones de fatiga muscular, se produzca la liberación de ácidos grasos que se convertirán en ATP para proporcionar al músculo el aporte energético necesario (Wolfe et al., 1990).

El efecto de la nutrición sobre la masa muscular es un tema aún en debate, aunque hay artículos que demuestran que la suplementación con productos como el Omega-3 tiene efectos beneficiosos para prevenir la sarcopenia (Dupont et al., 2019) o que el aumento de la ingesta proteica podría aumentar la masa muscular en pacientes de edad avanzada (Liao et al., 2019). Por otro lado, el efecto de la ingesta calórica sobre el músculo esquelético es otro de los aspectos estudiados y con resultados también controvertidos. Hay estudios que relacionan una disminución de la ingesta calórica con la pérdida de masa muscular (Lee y Goldberg, 2013; Park, B.S. et al., 2013). Según estos mismos autores, la pérdida muscular puede ser consecuencia de un cambio en el metabolismo proteico en dirección anabolismo a catabolismo, con una mayor utilización de las proteínas como recurso energético con el fin de compensar el déficit causado por la RC.

La RC tiene múltiples beneficios sobre la funcionalidad del músculo esquelético, por ejemplo, retrasa el deterioro neuromuscular (Stockinger et al., 2017) o disminuye la disfunción de los músculos lentos (Yoshida et al., 2018). También se ha demostrado que la RC impacta directamente sobre el metabolismo de la musculatura esquelética mediante la modificación de la ultraestructura mitocondrial (Gutiérrez-Casado et al., 2019) y la disminución del daño oxidativo (Chen, Y. et al., 2014). Otros autores, en oposición a los expuesto anteriormente, reportan un efecto preventivo de la RC sobre la

pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento (Aspnes et al., 1997; Phillips y Leeuwenburgh, 2005; Hepple et al., 2008; McKiernan et al., 2011).

También una correcta ingesta de micronutrientes tiene repercusiones sobre el sistema musculoesquelético. En esta línea, la suplementación de antioxidantes como el selenio o el magnesio se han postulado en algunos estudios como posibles tratamientos para mejorar la salud muscular (Robinson et al., 2018; Ganapathy y Nieves, 2020). También la vitamina D juega un papel importante en el desarrollo y funcionalidad de la musculatura esquelética (Arima et al., 2020), demostrándose en diferentes estudios que el déficit de vitamina D tiene efectos nocivos sobre el músculo. Un ejemplo de ello es la asociación reportada entre la deficiencia de vitamina D y el desarrollo de miopatía y debilidad muscular (Ceglia, 2009; Chiang et al., 2017; Puente Yagüe et al., 2020). Además, entre las enfermedades que cursan sarcopenia se encuentran la ERC, la obesidad, el síndrome metabólico o el envejecimiento (Holick, 2017; Wimalawansa, 2018), procesos que cursan con déficit de vitamina D (Jean et al., 2017; Savastano et al., 2017) y en los que la suplementación con esta hormona ha demostrado tener efectos beneficiosos para la reversión de la sarcopenia y prevención de la pérdida de masa muscular (Bruyère et al., 2017; Chang et al., 2017).

A pesar de la existencia de estudios que avalan los beneficios del control de la nutrición para el manejo de la masa muscular, muchos de los datos de los que se disponen proceden de estudios observacionales. Es por ello que las

recomendaciones nutricionales que deberían adoptarse para la restauración o prevención de la sarcopenia requieren aún de investigación.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

La hipótesis general de esta Tesis Doctoral es que existe una estrecha interrelación entre metabolismo energético y mineral. De forma más específica se plantea la hipótesis de que la restricción calórica influye sobre el metabolismo del fósforo, modificando el balance de fósforo y las hormonas implicadas en la regulación de este mineral, particularmente FGF23. La influencia de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral puede tener acciones a distintos niveles: renal, óseo, cardiovascular y muscular, principalmente; y puede resultar especialmente relevante en individuos urémicos que sufren calcificación vascular.

OBJETIVOS

Objetivo 1. Estudiar el efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo mineral en ratas con función renal normal, focalizando el estudio a tres niveles:

- 1.1.** Influencia de la restricción calórica sobre el balance de fósforo.
- 1.2.** Influencia de la restricción calórica sobre el FGF23.
- 1.3.** Influencia de la restricción calórica sobre el metabolismo de la vitamina D.

Objetivo 2. Evaluar el efecto de la disponibilidad energética del medio de cultivo sobre la producción de FGF23 por células osteogénicas cultivadas *in vitro*.

Objetivo 3. Estudiar los mecanismos moleculares que pueden participar en la regulación de FGF23 por disponibilidad energética, centrándose en la vía mTOR.

Objetivo 4. Investigar los efectos de la restricción calórica en el contexto de insuficiencia renal, a tres niveles:

- 4.1** Evaluar el efecto de la restricción calórica sobre la inducción de calcificación vascular en animales urémicos.
- 4.2** Estudiar el efecto de la restricción calórica sobre la regresión de calcificación vascular en animales urémicos.
- 4.3** Investigar el efecto de la restricción calórica sobre supervivencia en animales urémicos.

Objetivo 5. Estudiar la influencia de la restricción calórica sobre el fenotipo muscular en ratas con función renal normal.

Materiales y Métodos

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Aspectos éticos

Todos los protocolos experimentales para los cuales fue necesario el uso de animales de laboratorio durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba, así como por el Comité Ético de la Junta de Andalucía bajo el código de aprobación número 30/10/2017/148.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo el principio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España siguiéndose las pautas recogidas en las guías de bienestar animal y las recomendaciones incluidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, y la legislación europea vigente en el momento (Art. 41.1, Real Decreto 53/2013).

Animales

Los experimentos *in vivo* recogidos en el presente trabajo se realizaron utilizando como modelo experimental a la rata de la cepa Wistar, eligiéndose hembras como sexo preferente para la realización de todos los estudios y con una edad al inicio de los experimentos de 2 meses.

Todos los animales fueron facilitados por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, donde se desarrollaron en su totalidad los experimentos.

Condiciones de alojamiento

Los animales estuvieron estabulados en jaulas individuales de acuerdo con las condiciones mínimas necesarias legalmente establecidas para asegurar el bienestar animal y satisfacer las necesidades fisiológicas y comportamentales. Las condiciones ambientales fueron constantes durante los experimentos, manteniéndose un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y una temperatura media de 22°C.

Dietas

Atendiendo a los objetivos perseguidos en cada estudio, los animales se alimentaron con dietas de formulación específica ya sea por el contenido calórico, el contenido de fósforo, o ambos. Véase a continuación, en la Tabla 2, las características de las diferentes dietas utilizadas durante el desarrollo de los experimentos:

Dieta	Calcio (%)	Fósforo (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	EM (kcal/kg)
NC-NP	0,6	0,6				
RC-NP*	0,9	0,9	20,7	4	3,1	3.518
NC1,2	0,6	1,2				Normocalórica
NC1,8	0,9	1,8				
HC-NP	0,6	0,6	21	35	4,7	5.241
						Hipercalórica
hC-NP	0,6	0,6	17,1	2	44	1.314
						Hipocalórica

Tabla 2. Características de las dietas utilizadas durante los experimentos *in vivo*. EM, energía metabolizable. NC-NP, dieta normocalórica y contenido normal de fósforo (pauta sin restricción calórica); RC-NP, dieta normocalórica y contenido normal de fósforo (pauta con restricción calórica); NC1,2, dieta normocalórica y 1,2% de fósforo; NC1,8, dieta normocalórica y 1,8% de fósforo; HC-NP, dieta hipercalórica y contenido normal de fósforo; hC-NP, dieta hipocalórica y contenido normal de fósforo. *Para igualar el consumo mineral entre animales sometidos a restricción calórica y animales con una ingesta normal de calorías, se ajustó proporcionalmente el contenido de calcio y fósforo de las dietas utilizadas para alimentar a los animales con una pauta dietética de restricción en la ingesta de alimento.

Todas las dietas utilizadas para la realización de los estudios fueron elaboradas y suministradas por la empresa alemana Altromin (Altromin Specialfutter), formulando cada una de ellas con una concentración de vitamina D, en forma de colecalciferol, de 500 UI/kg.

Procedimientos quirúrgicos

Para la valoración del efecto de la RC sobre los parámetros del metabolismo mineral y enfermedad renal, se utilizó un modelo animal de CV

en el que se indujo fallo renal, equivalente a un estadio 4-5, mediante la ablación quirúrgica de 5/6 de la masa renal funcionante (Nx 5/6).

Para llevar a cabo este procedimiento, se siguió un protocolo de nefrectomía en dos pasos: nefrectomía parcial del riñón izquierdo (Nx 2/3) y nefrectomía unilateral derecha (Nx 1/2). Ambas intervenciones se realizaron bajo anestesia general inhalatoria con isofluorano (Isovet, Braun) y utilizando fentanilo intraperitoneal como analgésico intraoperatorio (0,2 mg/kg, Fentanest). Además, se estableció un periodo de recuperación de 7 días entre intervenciones y de 5 días una vez finalizado el procedimiento quirúrgico completo. Se administró buprenorfina subcutánea (50 µg/kg, Buprex) como analgésico durante los 2 días posteriores a la cirugía.

Nefrectomía parcial izquierda

El primer paso de la nefrectomía consistió en la ablación de los dos polos del riñón izquierdo. Se eligió este riñón por ser más accesible, permitiendo así una mejor técnica durante el procedimiento quirúrgico requerido. Tras ser anestesiadas, las ratas se posicionaron en decúbito lateral derecho. Se realizó una incisión de aproximadamente 5-8 mm de longitud en la superficie mediolateral izquierda del abdomen. Posteriormente, se expuso el riñón izquierdo, al que se le disecó la grasa perirrenal para continuar con la ligadura de ambos polos del órgano. Finalmente, se procedió a la escisión de los polos,

dejando la porción equivalente a 1/3 del riñón, correspondiente a la parte central de la corteza y médula, así como la pelvis renal. Tras inspeccionar el riñón, este se retornó a su posición anatómica dentro del abdomen y se procedió al cierre de pared abdominal y piel.

Nefrectomía unilateral derecha

Pasado el periodo de recuperación, los animales sometidos a la primera nefrectomía (Nx 2/3), fueron anestesiados de nuevo para llevar a cabo el segundo procedimiento quirúrgico, nefrectomía unilateral del riñón derecho. Para ello, los animales se posicionaron en decúbito lateral izquierdo y se realizó una incisión de 5-8 mm en la pared abdominal derecha, inmediatamente caudal a la última costilla. Se expuso el riñón derecho, el cual fue decapsulado y se procedió a la ligadura conjunta del pedículo renal. El riñón fue extirpado y el pedículo, tras ser inspeccionado, fue posicionado de nuevo en la cavidad abdominal. Finalmente se procedió al cierre de la pared muscular del abdomen y la piel mediante suturas quirúrgicas.

Diseño experimental

El protocolo experimental de la presente tesis doctoral se ha estructurado en cuatro estudios diferenciados según el tiempo de duración del tratamiento

dietético (4, 7 o 28 semanas) y el objetivo del estudio (metabolismo mineral, enfermedad renal, composición muscular). Es por ello que se abordará el diseño experimental de cada una de cada uno de ellos de forma independiente.

Estudio 1. Efecto de la ingesta calórica sobre el metabolismo energético y mineral: protocolo de dieta hipocalórica (hC)

Un total de 27 ratas fueron distribuidas en diferentes grupos (n=9 ratas/grupo) en función de la alimentación que siguieron durante los 30 días que duró el experimento (Figura 8, superior). Así se dispusieron 3 grupos alimentados con contenido calórico normal (NC-NP, grupo control), alto (HC-NP, grupo HC) o bajo (hC-NP, grupo hC); todas ellas con el mismo contenido mineral (0,6% calcio y 0,6% fósforo).

Tanto el grupo control como el grupo HC fueron alimentados *ad libitum*. En cambio, para los animales del grupo hC, por observarse un comportamiento de sobrealimentación por déficit calórico, se fijó una cantidad máxima de 30 gramos, ofrecida diariamente y con la cual se conseguía un objetivo de reducción de ingesta calórica de un 35% respecto a la ingesta del grupo control.

Finalizados los 30 días de alimentación con cada una de las dietas todos los animales fueron sacrificados.

Estudio 2. Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo energético y mineral: protocolo de dieta normocalórica restringida (NCR)

Este estudio se llevó a cabo en dos grupos de ratas con diferente protocolo dietético, con el objetivo de investigar el efecto de la RC sobre el metabolismo energético y mineral en animales con función renal normal.

Se incluyeron un total de 21 ratas Wistar distribuidas en dos grupos, en función de si los animales siguieron una alimentación *ad libitum* (grupo control, n=10) o se sometieron a una reducción de la ingesta calórica (grupo NCR, n=11).

A diferencia del primer estudio, el protocolo de RC se basó en la disminución de la ración diaria de alimento y no en la densidad energética del mismo (Figura 8, inferior). De esta forma, cada uno de los grupos fue alimentado con una dieta normocalórica (NC) de idéntica composición de macronutrientes. Según nuestra experiencia previa, se estimaron 15 gramos como la ingesta de alimento diario para una rata de 2 meses de edad con las dietas utilizadas en este estudio, considerándose esta cantidad como alimentación *ad libitum*. De esta forma, a los animales de grupo control se les ofreció esta cantidad diariamente, reduciéndose a 10 gramos en el grupo NCR; lo que supone una reducción del 33% de EM respecto al grupo control. Atendiendo a los requisitos del protocolo dietético y con el fin de igualar la ingesta mineral en todos los animales, al grupo NCR se le ofreció una dieta con

el contenido de calcio y fósforo ajustado a la ingesta de alimento, RC-NP, mientras que al grupo control se le ofreció la dieta estándar, NC-NP (ver características de las dietas en Tabla 2).

El experimento tuvo una duración total de 50 días, periodo tras el cual todos los animales fueron sacrificados.

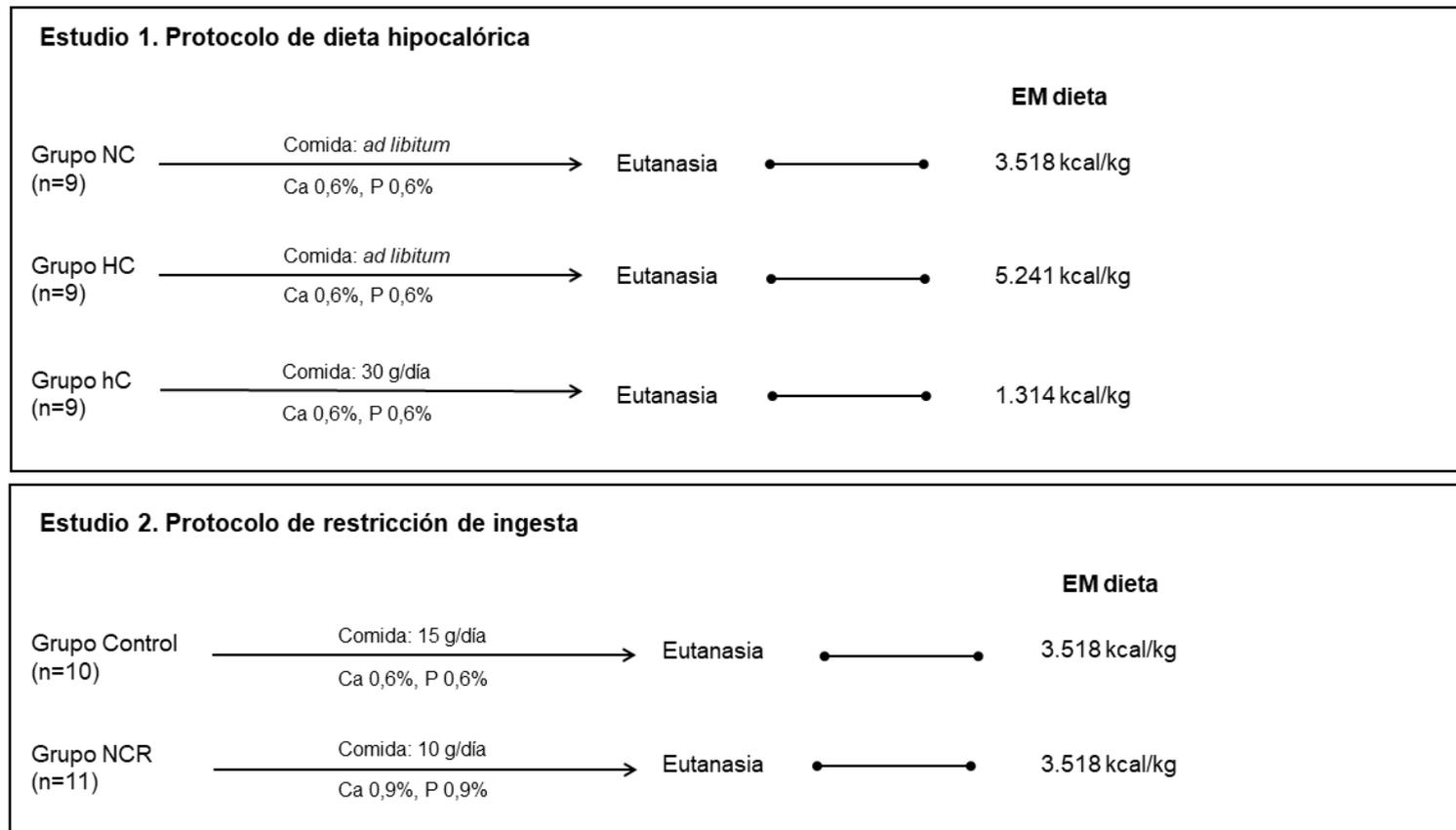


Figura 8. Diseño experimental de los estudios de metabolismo energético y mineral. Ca, calcio; EM, energía metabolizable; P, fósforo. HC, hipercalórico; hC, hipocalórico; NC, normocalórico; NCR, normocalórico con ingesta restringida.

Estudio 3. Efecto de la restricción calórica sobre la enfermedad renal y la calcificación vascular

El diseño de este estudio se centró en la valoración de los cambios tanto clínicos como histológicos derivados de la aplicación de un protocolo de RC en animales urémicos sometidos a un tratamiento de inducción de CV.

Los animales se distribuyeron en 6 grupos de estudio, según el diseño indicado en la Figura 9.

En los grupos 1 a 4 el objetivo era de estudiar el efecto de la RC sobre la progresión de la enfermedad renal y desarrollo de CV. Para ello, se establecieron diferentes fases en el experimento. Durante la fase previa a la inducción de CV, los animales de los grupos 1 y 3 recibieron 15 gramos diarios de la dieta NC-NP, mientras que a los grupos 2 y 4 se les restringió el consumo de alimento a 10 g/día de la dieta RC-NP. Según experimentos previos, se calcularon 15 g/día como la cantidad diaria suficiente para el crecimiento normal de animales de 2 meses de edad, considerándose esta cantidad como régimen *ad libitum*.

Tras 7 semanas con esta pauta dietética, todos los animales se sometieron a un procedimiento quirúrgico de reducción de la masa renal (Nx 5/6, ver apartado anterior) con el fin de inducir un estado de uremia en estos animales. Además, para inducir el desarrollo de calcificaciones extraesqueléticas, a todos los animales se les administró calcitriol (KernPharma) vía intraperitoneal a una

dosis de 80 ng/kg en días alternos, durante 14 días. En esta fase de CV, todos los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta alta en fósforo; NC1,2 para los grupos 1 y 2, y NC1,8 para los grupos 3 y 4. Finalizado el periodo de calcificación, los animales fueron sacrificados o reagrupados para continuar con el estudio de regresión de CV (grupos 5 y 6).

Finalmente, se dispusieron otros dos grupos con el fin de estudiar el efecto de la RC sobre la capacidad de regresión de la CV inducida. Para ello, algunos de los animales pertenecientes al grupo 1 se reagruparon tras el periodo de calcificación. Durante esta fase de regresión, se suspendió la administración de calcitriol de todos los animales y se mantuvo una pauta de alimentación con una dieta control, *ad libitum* (grupo 5, NC-NP) o en régimen de RC (grupo 6, RC-NP). Los animales se sacrificaron tras 4 semanas.

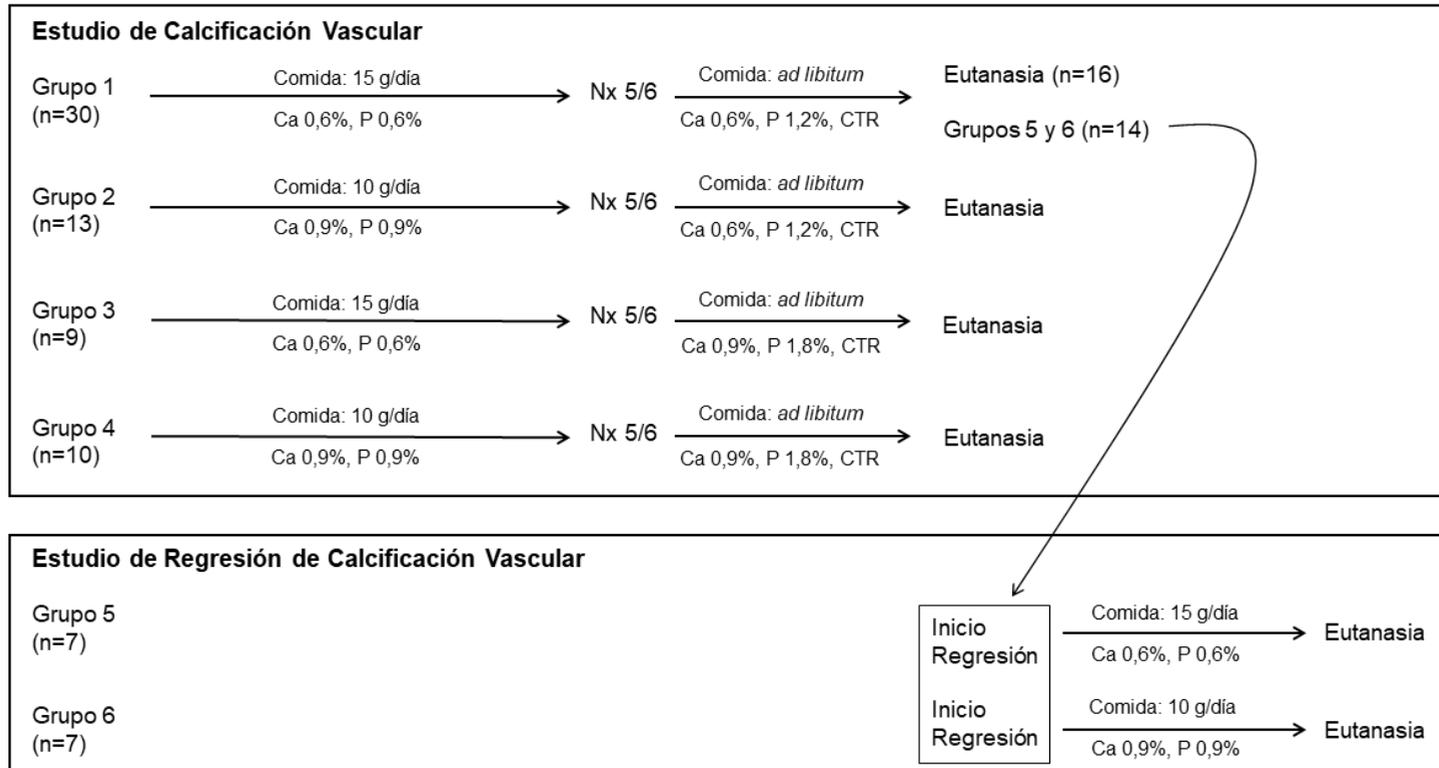


Figura 9. Diseño experimental de los estudios de calcificación vascular y regresión de calcificación vascular. Ca, calcio; CTR, calcitriol; Nx, nefrectomía; P, fósforo.

Estudio 4. Efecto de la dieta hipocalórica sobre el metabolismo de la vitamina D y la composición muscular

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la RC sobre la composición fibrilar de la musculatura esquelética y la implicación de la modulación de la vitamina D en este proceso. Un total de 34 ratas Wistar fueron alimentadas con una dieta NC-NP (grupo control) o hC-NP (grupo hC) durante 28 semanas. Durante todo el experimento, los animales del grupo control fueron alimentados *ad libitum*. En el grupo hC, en cambio, se estableció una pauta de alimentación diaria (30 gramos/rata) para evitar sobrealimentación, fijándose así un objetivo de reducción de ingesta calórica de un 35% respecto a la ingesta del grupo control. Tras 28 semanas sometidas a este régimen de alimentación, todos los animales fueron sacrificados para realizar el estudio histomorfométrico muscular.

Eutanasia y toma de muestras

En la última semana de los experimentos, todos los animales se alojaron en jaulas metabólicas durante las 72 horas previas al sacrificio y se hizo un control diario de ingesta de agua y comida, así como recolección de orina y heces.

Tras los 3 días de muestreo, todas las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia general con isoflurano, mediante exanguinación por punción en la aorta abdominal. En el momento del sacrificio, se tomaron muestras de los

tejidos objeto de estudio: riñón, aorta torácica y músculo esquelético. Además, se obtuvo el dato de adiposidad abdominal de las ratas mediante la recolección y pesado, *postmortem*, de la grasa visceral de los animales.

Bioquímica sanguínea

Como se ha comentado anteriormente en este mismo apartado, en el momento del sacrificio se llevó a cabo la toma de muestra de sangre, bajo anestesia general, por punción de la aorta abdominal. Las muestras se recogieron en colectores de extracción impregnados con heparina de litio como anticoagulante. Tras el sacrificio, todas las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos, a 3500 rpm y 4°C de temperatura para la separación del plasma, el cual fue almacenado en congelación a -20°C hasta su uso.

En plasma se realizaron mediciones de parámetros del metabolismo mineral y función renal, así como las hormonas implicadas. El fósforo, calcio, creatinina y urea se midieron por espectrofotometría (BioSystems). Se utilizó el test ELISA para medición de FGF23 intacto (Kainos Laboratories). Las mediciones de 25(OH)-vitamina D₃ (calcidiol) y de 1,25(OH)₂-vitamina D₃ (calcitriol) se realizaron mediante radioinmunoensayo (Immunodiagnostic Systems).

También se realizaron mediciones de parámetros relacionados con el metabolismo energético. Se utilizó la espectrofotometría (BioSystems) como

método de elección para la cuantificación de colesterol, triglicéridos y albúmina, y el test ELISA para la medición de leptina y adiponectina (EMD Millipore). Todos los parámetros se obtuvieron a partir de muestras de plasma.

La medición de glucosa se realizó de forma inmediata en el momento del sacrificio, en sangre fresca y utilizando un glucómetro portátil (Bayer).

Balance de fósforo

Se realizaron estudios sobre el balance de fósforo como parte de los experimentos encaminados a investigar el efecto de la RC sobre el metabolismo mineral. Para ello, la absorción intestinal neta de fósforo y el balance de fósforo fueron calculados mediante la aplicación de las siguientes fórmulas (valores expresados en mg/día):

Absorción neta de fósforo = ingesta de fósforo – excreción fecal de fósforo

Balance de fósforo = absorción neta de fósforo – excreción urinaria de fósforo

Bioquímica urinaria

Las orinas, recogidas cada 24 horas durante los 3 días de muestreo, fueron centrifugadas durante 5 minutos, a 1500 rpm y 4°C de temperatura. Tras retirar el sedimento, las alícuotas fueron congeladas a -20°C hasta su medición. Se

utilizó la espectrofotometría cuantitativa (Biosystems) como método de medición de la concentración de fósforo en orina

Análisis fecal

Las heces, también pesadas y recogidas cada 24 horas, se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su procesado.

Para la medición de la excreción de fósforo, las heces recogidas durante las 72 horas de muestreo previas al sacrificio fueron sometidas a un proceso de desmineralización con una solución de HNO₃ a concentración de 0,6 mmol/l. Posteriormente, fueron secadas ($\leq 125^{\circ}\text{C}$, 2 horas) y calcinadas ($\leq 125^{\circ}\text{C}$, 3 horas). Finalmente, el fósforo fecal se midió por espectrofotometría de masas (ICP-MS, Espectrofotometría de Masas por Plasma Acoplado Inductivamente).

Estudio de calcificación vascular

El estudio de CV se realizó mediante la evaluación histológica de la aorta torácica y la medición del contenido de calcio tisular.

Para el estudio histológico, la aorta torácica fue diseccionada en el momento del sacrificio y conservada en formol al 10% para su fijación e inclusión en parafina. Se utilizó el método Von Kossa como tinción

histoquímica de las secciones de aorta para la evaluación de las zonas de calcificación.

Otra porción de la aorta torácica fue conservada en congelación a -80°C para la posterior medición de calcio. Para ello, las muestras se pesaron en seco y se sumergieron en ácido fórmico al 10% durante 48 horas para su desmineralización. Previamente, los anillos de aorta fueron sometidas a un proceso de lavado durante 72 horas, realizando cambios diarios de la solución de lavado (100 mmol/l de CaCl_2 ; 20 mmol/l HEPES [pH 7,4]; 0,15 mol/l de NaCl; 0,02% de azida sódica). Se utilizó el sobrenadante del tejido desmineralizado para la medición de calcio mediante espectrofotometría (Biosystems).

Estudio de histomorfometría muscular

Toma de muestras

Para el estudio histomorfométrico se eligieron el músculo tibial craneal y el sóleo por ser representativos de los fenotipos de contracción rápida (fibras rojas) y contracción lenta (fibras blancas), respectivamente. Ambos músculos fueron disecados y pesados en el momento del sacrificio. Se calculó el peso relativo de cada músculo, obteniéndose así el índice somático muscular (ISM), marcador utilizado para valorar el desarrollo de sarcopenia. Para ello se aplicó la fórmula:

$$\text{ISM} = \text{peso muscular (g)} / \text{peso del animal (g)}$$

Para garantizar la conservación de las fibras musculares, se llevó a cabo un protocolo de congelación anteriormente reportado y específico para tal fin (Acevedo et al., 2016). Se realizó un corte transversal de cada músculo y cada mitad se adhirió a un bloque de corcho utilizando el medio OCT (del inglés, *optimal cutting temperature*) (Tissue-Tek, Miles Laboratories) de forma que las fibras quedasen orientadas en un plano transversal. Posteriormente, las muestras fueron congeladas bajo un protocolo controlado de inmersión durante 30 segundos en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Esto permitió la congelación gradual del espécimen evitando la rotura fibrilar por choque térmico. Tras su congelación, las muestras se conservaron a una temperatura de -80°C hasta su procesado.

Histomorfometría muscular

Para la evaluación histológica, en las muestras de tibial craneal y sóleo se realizaron cortes seriados de $10\ \mu\text{m}$ de grosor con ayuda de un criostato (Frigocut, Reichert Jung), trabajando a una temperatura de -20°C .

Para llevar a cabo la identificación fibrilar y el estudio morfométrico, estas secciones fueron teñidas utilizando dos técnicas histoquímicas previamente validadas para su uso en ratas (Rivero et al., 1999): ATPasa ácida y succinato deshidrogenasa (SDH). La primera técnica tiene utilidad para la identificación

de miofibrillas en función de su actividad contráctil, mientras que la SDH permite estudiar la actividad enzimática oxidativa.

Las secciones teñidas fueron digitalizadas con el software de imagen Pinnacle Studio (Pinnacle Systems, versión 24.0). Se eligió un área de aproximadamente 150 fibras, sobre la que se realizó el estudio morfológico de cada una ellas utilizando el programa Scion Image versión 4.0. Para ello, en primer lugar, las fibras fueron identificadas en función de su actividad contráctil. Posteriormente, se procedió al análisis morfológico, el cual se realizó en imágenes procesadas en escala de grises a partir de las secciones teñidas con la técnica de la SDH. Sobre estas imágenes, se llevaron a cabo mediciones de tamaño y actividad oxidativa.

La clasificación de los tipos de miofibrillas se realizó siguiendo la identificación de los cuatro tipos principales de fibras musculares: tipo I, tipo IIA, tipo IIX y tipo IIB. Cuando se identificaron fibras de fenotipos híbridos, estas fueron escasas (<5% del total) y se distribuyeron de forma equitativa entre los tipos fibrilares más próximos.

El tamaño fibrilar se determinó mediante la medición de dos parámetros: área total y diámetro menor. Este protocolo se fundamenta en el hecho de que la disposición oblicua que puede ocurrir durante el procesado de la muestra y la obtención de la sección, altera la medición del área por no encontrarse completamente expuesta. Así, el diámetro menor, que se define como el

diámetro máximo registrado en la región en la cual las fibras muestran su menor tamaño, persigue el objetivo de evitar la distorsión sucedida cuando no se obtiene una sección transversal del músculo en cuestión.

Como ya se ha comentado, la actividad oxidativa se analizó a partir de una imagen en escala de grises, con un rango de píxeles de 0 a 255, obtenida a partir de la tinción de SDH. La unidad de medida fue la densidad óptica (DO), con una escala de medición de 0 a 0,8. Puesto que la medición de DO se obtiene a partir del conteo de píxeles, la variabilidad de las mediciones en secciones procesadas mediante histoquímica pone en cuestión la fiabilidad de las mismas. Es por ello que se realizaron tres mediciones consecutivas de DO, aceptándose coeficientes de variación no superiores al 5%. De esta forma, se consiguió una alta precisión analítica reforzando así la fiabilidad de las mediciones de la actividad enzimática.

Estudios de biología molecular

Extracción de ARN tisular

Se realizaron estudios de biología molecular a partir de tejido renal. Para ello se procedió a la extracción de ARN total del riñón de animales sanos, así como de la masa renal remanente en ratas nefrectomizadas.

Para este procedimiento, una porción de riñón (en la que todas sus partes se encontraban representadas) fue macerada utilizando un mortero de mano; proceso realizado manteniendo en todo momento el estado de congelación del tejido mediante el uso de nitrógeno líquido. El macerado renal se utilizó para la extracción del ARN total mediante el método de precipitación estándar, utilizando Trizol (Sigma-Aldrich), seguido de solventes como cloroformo (Sigma-Aldrich), isopropanol (Panreac), y, finalmente, se lavó el espécimen con etanol (Panreac). El ARN total fue cuantificado por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y posteriormente tratado con DNasa (DNase I amplification Grade, Sigma-Aldrich), asegurando su estabilidad.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Se utilizaron 50 µg del ARN tisular tratado con DNasa y 1 µl de *primer* para analizar la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real. El agente marcador empleado para la reacción de amplificación fue SYBR Green (QuantiTect, Qiagen).

Como parte del estudio de la funcionalidad renal se cuantificó la expresión génica de alfa-Klotho renal. Además, se midió la expresión de las enzimas Cyp27b1 y Cyp24a1 como parte del estudio del metabolismo de la vitamina D. Los resultados fueron tratados como expresión relativa frente al gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La expresión

de ARN mensajero (ARNm) fue calculada mediante la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (donde Ct corresponde al ciclo umbral). Las secuencias de las parejas de los *primers* utilizados en los estudios se encuentran reflejadas en la Tabla 3.

Gen	<i>Primer forward (5'-3')</i>	<i>Primer reverse (5'-3')</i>
alfa-Klotho	CTCTGAAAGCCTACGTGTTGG	TAGAAACGAGATGAAGGCCAG
Cyp27b1	AAGAGTGATGACTACTGGG	ATAGTATCAAATAGCCGGGG
Cyp24a1	AAGTGTGCCATTTACAACCTC	GTTAACACTGTTTCCTTTGGG
GAPDH	AGGGCTGCCTTCTCTTGTGAC	TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG

Tabla 3. Secuencias de las parejas de *primers* utilizados para cada gen estudiado en tejido renal. Cyp27b1, Citocromo P450 de la enzima 1-alfa-hidroxilasa; Cyp24a1, Citocromo P450 de la enzima 24-hidroxilasa; GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Las parejas de *primers* fueron fabricados y suministrados por ThermoFisher (alfa-Klotho y GAPDH) o Sigma Aldrich (Cyp27b1 y Cyp24a1).

Extracción de proteína tisular

La extracción de proteína renal se realizó a partir del macerado renal (previamente descrito), el cual fue incluido en un buffer de lisis ajustado a pH 7,9. Los componentes del buffer fueron: HEPES (10 mmol/l), KCl (10 mmol/l), EDTA (0.1 mmol/l), EGTA (0.1 mmol/l), DTT (1 mmol/l), PMSF (0.5 mmol/l), cóctel inhibidor de proteasas (70 µg/mL) e I-Gepal CA-630 (0.6%) (Sigma-Aldrich). La concentración de proteína se cuantificó utilizando el método Bradford.

Western blot

Se utilizaron entre 50 y 100 µg de proteína tisular para cuantificar la producción de proteína tisular mediante la técnica de Western blot. Se utilizó un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-poliacrilamida) al 10% (Invitrogen) para la electroforesis. Para la transferencia electroforética (Transfer Systems, Bio-Rad) de la proteína, se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Invitrogen).

Las membranas fueron incubadas en agitación continua a temperatura ambiente durante una hora con un buffer de solución salina Tris-Tween 20 (TTBS). Esta solución se preparó a base de 20 mM Tris·HCl (pH 7.6), 0.2% Tween 20, and 150 mM NaCl, (Sigma-Aldrich) y 5% de leche en polvo desgrasada (Bio-Rad). Posteriormente, las membranas fueron lavadas con

TTBS sin leche en polvo e incubadas con anticuerpo anti-Klotho (0.5 mg/mL, Transgenic); proceso que se mantuvo durante la noche a una temperatura de 4°C y agitación. Tras el lavado de las membranas con TTBS, se procedió al marcaje con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). La concentración del anticuerpo secundario fue de 1:5000. Finalmente, se procedió al revelado autorradiográfico de las membranas utilizando el equipo ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare).

El cálculo de los resultados se realizó mediante la normalización a la proteína GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health) para su cuantificación.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Se realizaron experimentos en cultivos celulares de células osteogénicas con el fin de explorar el efecto del aporte energético sobre la expresión de genes osteogénicos; y, más concretamente, sobre el FGF23.

Línea celular

Los experimentos celulares se llevaron a cabo utilizando la línea celular UMR106 (ATCC). Se trata de una línea celular clonal, desarrollada por el doctor T.J. Martin, conformada por osteoblastos procedentes de osteosarcoma inducido de rata de la cepa Sprague-Dawley.

Cultivo celular

Las células UMR106 se cultivaron en el medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM, del inglés: *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Biowest). La contaminación bacteriana se evitó mediante la adición al medio de 100 mg/l de estreptomycin (Normon) y 100 UI/ml de penicilina (ERN); y el control fúngico se realizó adicionando fungizona a una concentración de 0,29 mg/l (Lonza). También se complementó el medio con 1 mM de piruvato sódico

(Lonza) y 2 mM de ultra-glutamina (Lonza), asegurando así las condiciones para un óptimo crecimiento celular.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos en una densidad de 10.000 células/cm² y se mantuvieron con el medio de cultivo DMEM hasta llegar a una confluencia del 90%. Debido a la baja producción de FGF23 observada en esta línea celular, en este punto de los experimentos, todos los grupos fueron sometidos a un tratamiento con 10 nM de calcitriol (Kern Pharma) durante las 24 horas previas a la lisis celular, procedimiento previamente descrito por Bär y colaboradores para estimular la producción de FGF23 (Bär et al., 2018).

Los cultivos celulares se mantuvieron durante todo el experimento en unas condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y saturación atmosférica de agua. El cambio del medio de cultivo durante el experimento se realizó con una frecuencia de 48 horas.

Diseño experimental

Efecto de la disponibilidad energética sobre el FGF23

Para estudiar el efecto de la disponibilidad energética sobre el FGF23, se incubaron células UMR106 en medio de cultivo DMEM con diferentes concentraciones de glucosa: alta (HG; 4,5 g/l), media (MG; 2 g/l) y baja (LG; 1 g/l). Se diseñaron diferentes protocolos atendiendo al tiempo de exposición a la

glucosa, realizándose estudios en los que las células se expusieron a baja glucosa durante 6 días, 96 horas o 24 horas.

Efecto de la osmolaridad sobre el FGF23

La glucosa, entre otras, es una molécula que afecta directamente a la osmolaridad del medio. Esto es, el aumento de glucosa en el líquido extracelular incrementa la osmolaridad del mismo; y viceversa, la disminución de glucosa, reduce la tonicidad del medio. Estos cambios de osmolaridad conllevan el intercambio de agua entre el medio intra y extracelular y, con ello, el desajuste electrolítico. Este fundamento aplicado a nuestros experimentos supondría que reducir la concentración de glucosa en el medio de cultivo reduciría la osmolaridad del mismo respecto al medio con mayor concentración, pudiendo traducirse en una dificultad añadida para las células para obtener los nutrientes del medio (debido a la hipertonicidad celular). Con el fin de valorar los posibles efectos adversos derivados de los cambios de tonicidad del medio debido a las diferentes concentraciones de glucosa, se realizaron experimentos en los que se estudió el efecto de la osmolaridad sobre el FGF23.

Para estos estudios, se incubaron células en medio HG o LG, y se incluyó un grupo de células incubadas en DMEM LG al que se añadió manitol (Fresenius Kabi) a una concentración de 19,42 mOsmol/l para igualar la

osmolaridad al medio del grupo control (HG). Estas células se mantuvieron durante 6 días, después de los cuales se lisaron para su posterior extracción de ARN y estudio de expresión génica de FGF23.

Efecto de la concentración de fósforo sobre el FGF23

Para estudiar el efecto del fósforo sobre el FGF23 en función de la disponibilidad energética, se incubaron células en medio HG o LG con diferentes concentraciones de fósforo: normal (NP, 1 mM) o alta (HP, 4 mM). Para incrementar la concentración de fósforo en el medio, se preparó un buffer *stock* 1:2 de $\text{PO}_4\text{HNa}_2/\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (Sigma-Aldrich), a partir del cual se suplementó el medio NP para elevar la concentración de 1 mM a 4 mM. Todos los grupos se mantuvieron hasta llegar al 90% de confluencia con las concentraciones de glucosa y fósforo correspondientes, momento en el cual se administró calcitriol 10 nM para estimular la producción de FGF23 durante 24 horas. La duración total del experimento fue de 6 días.

Implicación de la vía mTOR en la modulación del FGF23

Debido a la evidencia sobre la conexión de rutas las metabólicas de AMPK e insulina con el FGF23, se llevaron a cabo estudios *in vitro* sobre la

implicación de mTOR como mecanismo involucrado en la regulación de FGF23 por parte del metabolismo energético.

Para evaluar la implicación de mTOR, se eligieron dos agentes inhibidores de esta ruta de señalización: rapamicina (Calbiochem) y everolimus (Sigma-Aldrich). Estos fármacos se utilizaron para el tratamiento de células incubadas en el medio de cultivo control (HG) de forma que se incluyeron grupos de células tratadas con una concentración de 10 nM de rapamicina o everolimus durante 6 días (con el fin de simular un efecto de restricción energética crónica). Es conocido el efecto inhibitorio de la rapamicina sobre el crecimiento celular, por lo que, para asegurar la viabilidad, los tratamientos con ambos inhibidores se renovaron a días alternos.

Se llevaron a cabo estudios de dosis-dependencia y tiempo-dependencia utilizando la rapamicina como inhibidor de elección. Para ello, las células cultivadas en medio HG fueron tratadas a concentraciones de 0 nM, 5 nM o 10 nM, de rapamicina con una duración total del tratamiento de 6 días, 96 horas o 24 horas.

Estudios de expresión génica

Extracción de ARN celular

Para la cuantificación génica, finalizado el tiempo del experimento, se procedió a la lisis celular y extracción de ARN total. Para ello se utilizó Trizol (Sigma-Aldrich) y se siguió el protocolo estándar de extracción de ARN de Invitrogen. Obtenido el espécimen de ARN total, se procedió a su cuantificación (ND-1000, Nanodrop Technologies) y posterior tratamiento con DNasa (*DNase I amplification Grade*, Sigma-Aldrich), eliminando con ello la posible contaminación y asegurando su estabilidad.

RT-PCR en tiempo real

La expresión génica se estudió mediante la amplificación de ARNm con la técnica de RT-PCR en tiempo real, utilizando el kit QuantiTect SYBR Green (Qiagen). Para ello se utilizó una concentración de 50 µg de ARN y 1 µl de *primer*, analizándose la expresión génica con el uso de un termociclador (LighCycler, Roche Diagnostic) y tratándose los resultados como expresión relativa al gen Tbp (proteína de unión TATA; del inglés, *TATA binding protein*). La normalización de la amplificación se realizó mediante la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Se estudió la expresión tanto de FGF23, gen principal objeto de estudio, como de otros genes osteogénicos, RunX2 (factor de transcripción 2 de la familia Runx) y Osterix, utilizados como indicadores de maduración celular. También se estudió la expresión de STIM1 por su implicación en la vía de señalización de mTOR y como parte del estudio mecanístico de la modulación de FGF23. En la Tabla 4 se indican las secuencias de los genes utilizados en los estudios *in vitro*.

Gen	<i>Primer forward (5'-3')</i>	<i>Primer reverse (5'-3')</i>
FGF23	TGGCCATGTAGACGGAACAC	GGCCCCTATTATCACTACGGAG
RunX2	CGGGAATGATGAGAACTACTC	GCGGTCAGAGAACAACACTAGGT
Osterix	GTACGGCAAGGCTTCGCATCTGA	TCAAGTGGTCGCTTCGGGTAAAG
STIM1	CAGTACTACAACATCAAGAAGC	TTTTTATTTTCTCAGCCCCC
Tbp	ACTCCTGCCACACCAGCC	GGTCAAGTTTACAGCCAAGATTCA

Tabla 4. Secuencias de las parejas de *primers* utilizados para cada gen estudiado en cultivos celulares. FGF23, factor de crecimiento fibroblástico 23; RunX2, factor de transcripción 2 de la familia Runx; STIM1, molécula de interacción estromal 1; Tbp, proteína de unión TATA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El software utilizado para el análisis estadístico fue GraphPad Prism, versión 6.01. Todos los datos reflejados en la presente Tesis Doctoral están expresados como media \pm error estándar de la media, considerándose significancia estadística para un valor de $p < 0,05$.

La diferencia entre medias de dos grupos ha sido determinada mediante el análisis t-test; mientras que la diferencia entre medias de tres o más grupos ha sido determinada mediante un estudio ANOVA utilizando el procedimiento post-hoc Fisher LSD.

Los análisis de correlación se llevaron a cabo mediante el estudio de regresión lineal utilizando el test de Pearson.

Los análisis de supervivencia se realizaron con el método de la curva de Kaplan-Meier y el uso del test Long-Rank para el estudio de diferencias entre curvas.

Resultados

SECCIÓN 1. METABOLISMO ENERGÉTICO Y MINERAL

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Estudio 1. Efecto de la ingesta calórica sobre el metabolismo energético y mineral: protocolo de dieta hipocalórica

En el primer lugar, se abordarán los resultados obtenidos durante los estudios llevados a cabo en animales alimentados *ad libitum* con dietas de diferente densidad energética, conseguida mediante la modificación porcentual del contenido de grasa.

A. Ingesta calórica y peso corporal

Como cabía esperar, la ingesta calórica de cada uno de los tres grupos de ratas incluidos en este experimento arrojó diferencias significativas. Así, el grupo HC ingirió $63,0 \pm 1,7$ kcal/día, lo que supone un 20% más que el grupo control, $52,6 \pm 0,3$ kcal/día ($p < 0,001$; Figura 10a). Resulta interesante matizar que la ingesta calórica de las ratas HC, aun siendo mayor que en el grupo control, no se correspondió con el incremento estimado. Esto es así porque los animales de dicho grupo, debido al aumento de la densidad energética de su dieta, redujeron espontáneamente el consumo de alimento, $12,0 \pm 0,3$ g/día, respecto a aquellas que tuvieron una alimentación con dieta NC, $14,9 \pm 0,1$ g/día, lo que además se reflejó en el peso corporal al final del estudio de forma que las ratas HC tuvieron una ganancia de peso similar a los animales del

grupo control, $51,7 \pm 2,7$ g vs $51,3 \pm 3,1$ g. Por otro lado, el grupo hC tuvo una ingesta calórica significativamente inferior al grupo control, $32,4 \pm 0,3$ kcal/día ($p < 0,0001$), con un consumo diario de alimento de $24,7 \pm 0,3$ g/día, suponiendo una reducción energética de un 40% respecto al grupo control. Esta reducción energética se tradujo en una pérdida significativa del peso corporal total del grupo hC, $-44,5 \pm 2,8$ g ($p < 0,0001$).

B. Parámetros bioquímicos

A pesar de las diferencias de ingesta calórica, no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosa en sangre, registrándose valores de $124,6 \pm 5,7$ mg/dl, $113,0 \pm 8,3$ mg/dl y $126,9 \pm 4,7$ mg/dl, en el grupo control, HC y hC, respectivamente. Se observó disminución significativa en los valores de triglicéridos, $22,3 \pm 1,7$ mg/dl vs $41,6 \pm 4,0$ mg/dl ($p = 0,002$) y colesterol total, $35,9 \pm 3,3$ mg/dl vs $56,2 \pm 4,0$ ($p = 0,002$), así como una reducción de leptina, $0,64 \pm 0,2$ ng/ml vs $1,6 \pm 0,2$ ng/ml ($p = 0,005$) en ratas alimentadas con una dieta hC en comparación con aquellas que tuvieron una ingesta calórica normal. Además, estos cambios se acompañaron de un incremento en los niveles de adiponectina plasmática, $10,5 \pm 0,6$ en hC vs $7,0 \pm 0,5$ en NC ($p < 0,001$). Sin embargo, a pesar del incremento calórico, el grupo HC mostró un perfil lipídico similar al grupo control, con un aumento significativo únicamente en los niveles de leptina, $2,5 \pm 0,5$ ng/ml ($p = 0,026$), el

cual se acompañó de una ligera disminución de adiponectina, $6,0 \pm 0,6$ ng/ml vs $7,0 \pm 0,5$ ng/ml.

C. Parámetros del metabolismo mineral

Todas las dietas utilizadas durante el experimento tenían el mismo contenido mineral, de forma que la diferencia en el consumo de alimento se vio reflejado en la ingesta de fósforo. Esto resultó en una ingesta de $89,7 \pm 0,6$ mg/día en las ratas del grupo control, mientras que las ratas HC ingirieron una cantidad ligeramente inferior, $72,2 \pm 2,0$ mg/día, y las ratas hC tuvieron una ingesta muy superior a la de los otros dos grupos, $148,3 \pm 1,5$ mg/día ($p < 0,0001$). No obstante, esto no se reflejó en una diferencia en la concentración plasmática de fósforo, obteniéndose valores ligeramente inferiores tanto en ratas HC, $4,7 \pm 0,2$ mg/dl, como hC, $4,7 \pm 0,3$ mg/dl respecto al grupo control, $5,0 \pm 0,2$ mg/dl (Figura 10b).

Para valorar el efecto de la ingesta calórica sobre el metabolismo del fósforo, se estudió la absorción de este mineral en los tres grupos de estudio. Se observó que, a pesar de la diferente ingesta de fósforo, su absorción no varió significativamente en ninguno de los tres grupos: Control, $44,0 \pm 3,6$ mg/día; HC, $47,0 \pm 4,0$ mg/día; y hC, $49,0 \pm 3,0$ mg/día (Figura 10c).

La ingesta calórica influyó sobre los niveles de FGF23, el cual aumentó de forma significativa en ratas HC, 496 ± 60 pg/ml ($p=0,001$), y disminuyó en ratas hC, 127 ± 17 pg/ml ($p=0,009$), en comparación con los niveles de FGF23 de las ratas del grupo control, 289 ± 28 pg/ml (Figura 10d).

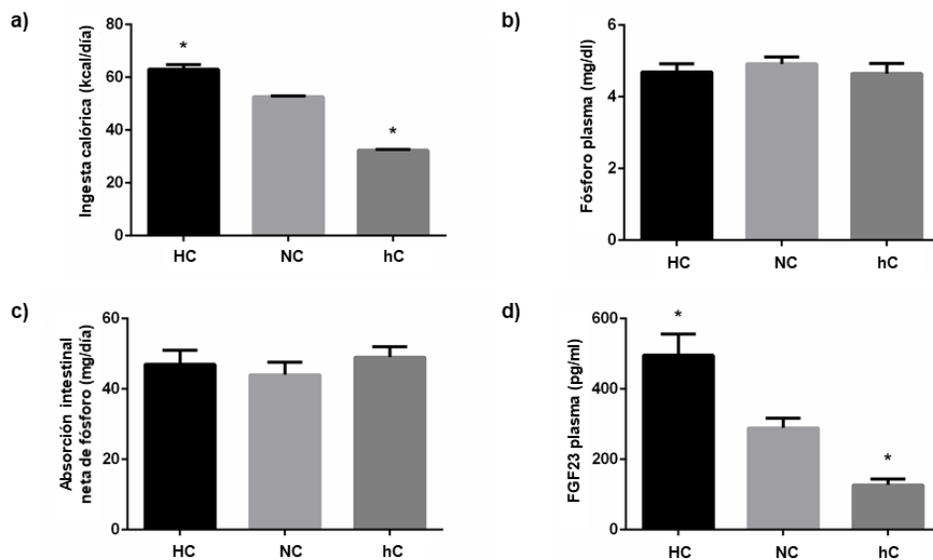


Figura 10. Ingesta calórica (a), concentración plasmática de fósforo (b), absorción neta de fósforo (c) y concentración plasmática de FGF23 (d) en ratas alimentadas con una dieta con un contenido calórico alto (HC), normal (NC) o bajo (hC). * $p<0,05$ vs NC.

También el calcitriol se modificó según la ingesta calórica, reduciéndose en ratas HC, $22,4 \pm 8,2$ pg/ml ($p<0,0001$), e incrementándose en ratas hC, $185,6 \pm 7,7$ pg/ml ($p<0,0001$), respecto al grupo control, $98,4 \pm 17,8$ pg/ml (Figura 11a). En los estudios de correlación se encontró una fuerte correlación inversa entre calcitriol y FGF23 ($r=-0,803$; $p<0,0001$) (Figura 11b).

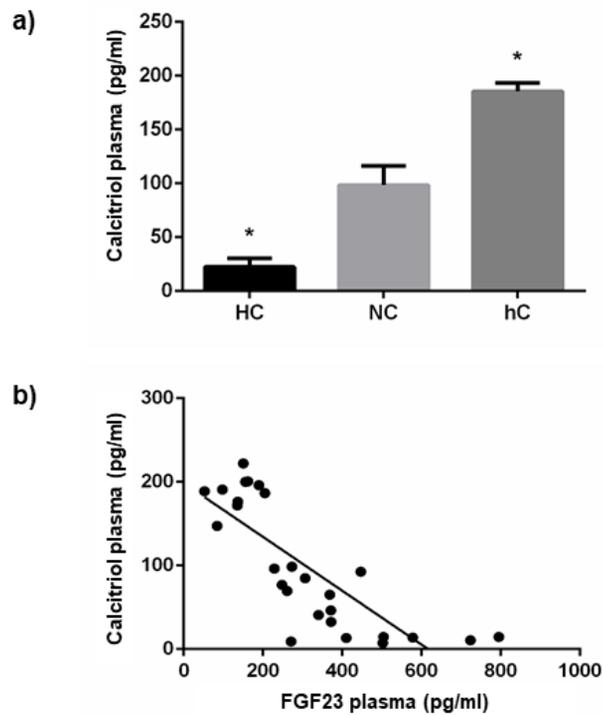


Figura 11. (a) Concentración plasmática de calcitriol en ratas alimentadas con una dieta con un contenido calórico alto (HC), normal (NC) o bajo (hC). * $p < 0,05$ vs NC. (b) Correlación entre FGF23 y calcitriol en plasma ($r = -0,803$, $p < 0,001$) en el conjunto de las ratas de estudio.

Además, el FGF23 plasmático mostró correlación positiva con la ingesta calórica ($r = 0,705$; $p < 0,0001$), pero no así con el fósforo plasmático ($r = -0,154$; $p = 0,493$) o la absorción intestinal de fósforo ($r = -0,125$; $p = 0,535$) (Figura 12).

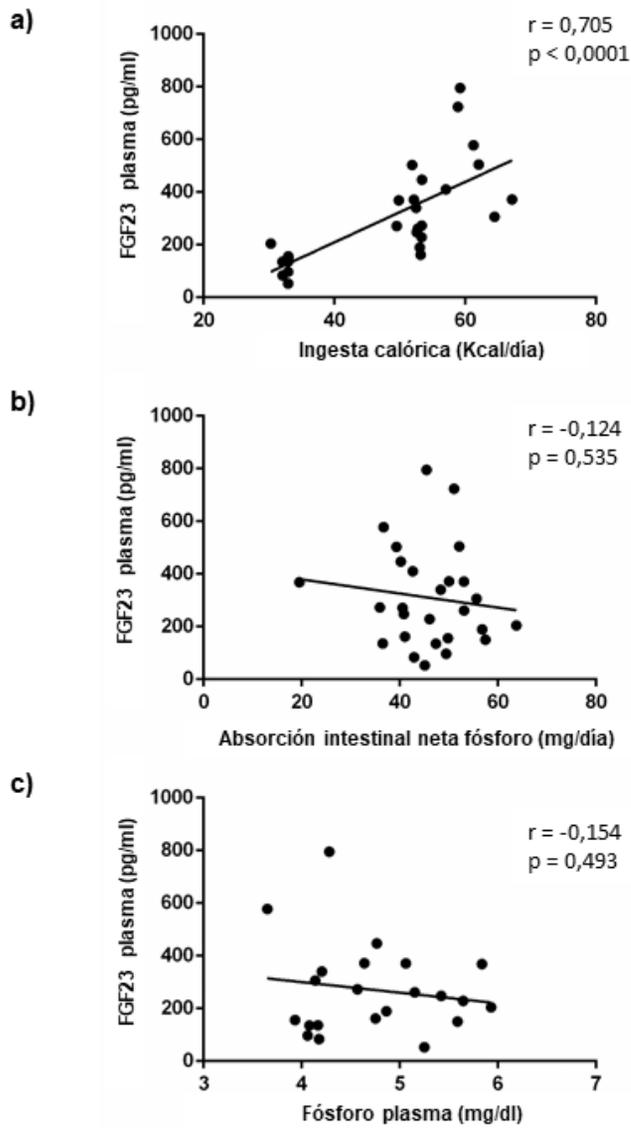


Figura 12. Correlación entre FGF23 y (a) ingesta calórica, (b) absorción intestinal de fósforo y (c) fósforo en plasma en ratas alimentadas con una dieta de un contenido calórico alto, normal o bajo. * $p < 0,05$ vs NC.

Estudio 2. Efecto de la restricción calórica sobre el metabolismo energético y mineral: protocolo de dieta normocalórica restringida

En este apartado se abordarán los resultados obtenidos en experimentos realizados *in vivo* en el cual el protocolo de RC se basó en la reducción de la cantidad total de alimento ofrecido a los animales, sin modificación de la composición de macronutrientes de la dieta.

A. Ingesta calórica y peso corporal

De acuerdo con las estimaciones en las que se basó el diseño experimental, los animales sometidos a RC tuvieron una ingesta calórica al final de estudio un 33% menor que los animales del grupo control. Así la ingesta energética del grupo NCR resultó en una media de $35,1 \pm 0,2$ kcal/día, frente a $52,6 \pm 0,3$ kcal/día del grupo control ($p < 0,001$). Esta disminución en la ingesta calórica tuvo consecuencias directas sobre la ganancia de peso corporal total durante el estudio con un aumento al final del estudio de $51,3 \pm 3,1$ g en las ratas del grupo control, mientras que las ratas del grupo NCR perdieron un total de $19,5 \pm 4,6$ g ($p < 0,001$; Figura 13). Además, la pérdida de peso corporal del grupo NCR se vio acompañada de una evidente disminución de la grasa visceral total, $0,6 \pm 0,2$ g, en comparación con la grasa visceral del grupo control, $8,5 \pm 1,0$ g ($p < 0,001$).

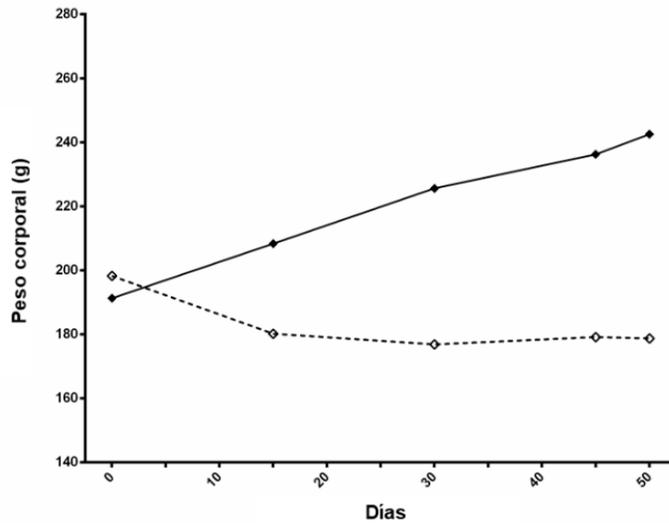


Figura 13. Evolución del peso corporal en ratas alimentadas ad libitum (línea continua) o con un protocolo de restricción calórica (línea discontinua) durante el tiempo de experimento.

B. *Parámetros bioquímicos*

Como se muestra en la Tabla 5, se encontraron diferencias significativas en parámetros relacionados con el metabolismo energético. Se observó una disminución de los valores de glucosa y triglicéridos, así como una reducción significativa de leptina acompañada de un incremento de la adiponectina plasmática en los animales del grupo NCR en comparación con el grupo control. A pesar de la reducción en la ingesta de alimento, todos los animales mantuvieron los valores de urea y albúmina dentro de los rangos fisiológicos, sin observarse diferencias entre grupos.

	Control	NCR
Glucosa (mg/dl)	124,6 ± 5,7	100,0 ± 6,9 ^a
Triglicéridos (mg/dl)	41,6 ± 4,0	29,6 ± 1,7 ^a
Colesterol (mg/dl)	70,4 ± 6,1	66,0 ± 6,2
Leptina (ng/ml)	1,9 ± 0,3	0,5 ± 0,1 ^a
Adiponectina (ng/ml)	7,0 ± 0,5	11,7 ± 0,7 ^a
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,03	0,7 ± 0,02
Urea (mg/dl)	34,7 ± 1,5	33,2 ± 1,4
Albúmina (g/dl)	2,1 ± 0,05	2,1 ± 0,03

Tabla 5. Parámetros bioquímicos relacionados con metabolismo energético y función renal. ^a p<0.05 vs Control. NCR, normocalórico con ingesta restringida.

C. Metabolismo mineral y balance de fósforo

Puesto que la concentración mineral se ajustó en la formulación de la dieta en función del régimen de alimentación de cada uno de los grupos, todos los animales tuvieron una ingesta de fósforo similar durante el experimento, 90,8 ± 0,1 mg/día y 91,6 ± 0,2 mg/día, grupo control y NCR respectivamente.

A pesar de que la ingesta de fósforo no varió, los valores plasmáticos de fósforo disminuyeron ligeramente, aunque de forma significativa, en el grupo NCR (Tabla 6). En el estudio sobre el balance de fósforo se observó que la RC redujo la absorción intestinal neta de este mineral resultando en un balance negativo evidente (Tabla 6), aunque no significativo debido a la dispersión de los datos consecuencia de las diferencias intragrupo.

	Control	NCR
Ingesta fósforo (mg/día)	89,4 ± 0,5	90,1 ± 1,5
Excreción fecal (mg/día)	46,8 ± 3,7	60,0 ± 5,3
Absorción neta (mg/día)	42,6 ± 3,3	30,1 ± 4,6
Excreción urinaria (mg/día)	44,3 ± 3,4	44,7 ± 5,5
Balance (mg/día)	-1,7 ± 6,2	-14,6 ± 6,8
Fósforo plasmático (mg/dl)	5,1 ± 0,1	4,6 ± 0,1 ^a

Tabla 6. Parámetros relativos al balance de fósforo. Datos procedentes de los tres días de muestreo previos al sacrificio de ratas alimentadas con una dieta normocalórica con ingesta normal (Control) o restringida (NCR). ^a p<0.05 vs Control.

También se observó una reducción significativa ($p=0,04$) en la concentración de FGF23 plasmático, $217,4 \pm 17,9$ pg/ml vs $289,0 \pm 28,5$ (Figura 14a) y un incremento de calcitriol, $73,4 \pm 7,8$ pg/ml vs $99,1 \pm 10,5$. Los cambios de FGF23 observados en plasma correlacionaron de forma significativa con los cambios en la expresión génica y proteica de alfa-Klotho renal. Así se encontró un aumento de ARNm de alfa-Klotho en el grupo NCR, de $1,01 \pm 0,08$ a $1,44 \pm 0,15$ (Figura 14b), y un incremento en la proteína renal, de $0,99 \pm 0,11$ a $1,34 \pm 0,12$ (Figura 14c).

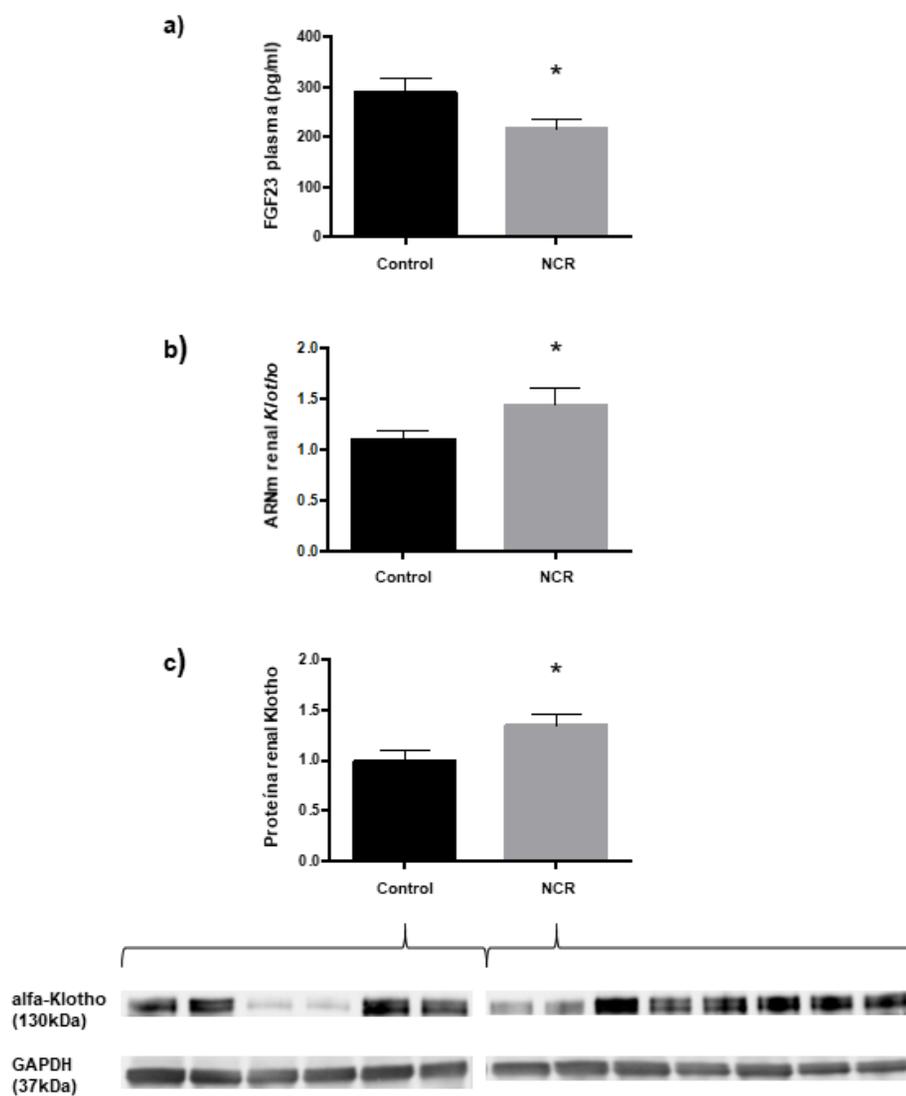


Figura 14. (a) Concentración plasmática de FGF23, (b) expresión de ARNm de alfa-Klotho en el riñón y (c) proteína renal de alfa-Klotho en ratas alimentadas con una ingesta calórica normal (control) o restringida (NCR). * $p < 0,05$ vs Control.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el FGF23 en cultivos celulares

Los estudios realizados *in vitro* fueron diseñados con el fin de investigar el efecto de la disponibilidad energética, en forma de glucosa, sobre la producción de FGF23 por las células osteogénicas, así como estudiar la implicación de mTOR como mecanismo involucrado en estos efectos. Es por ello que se presentarán los resultados de todos experimentos de forma conjunta, por ser complementarios entre ellos. Todos los resultados presentados a continuación proceden de experimentos que han sido realizados por triplicado.

Reducir la concentración de glucosa durante el cultivo de células UMR106 resultó en la disminución de la expresión de FGF23, $0,59 \pm 0,03$ en LH vs $1,01 \pm 0,09$ en HG ($p < 0,0001$; Figura 15).

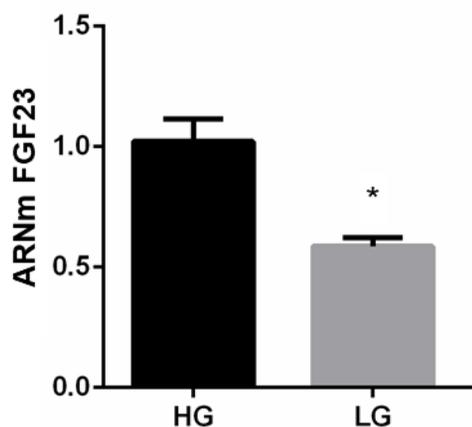


Figura 15. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG) o baja (LG) durante 6 días. * $p < 0,05$ vs HG.

No obstante, una reducción moderada (55%) de la concentración de glucosa no redujo la expresión de ARNm; del mismo modo que una exposición menos prolongada tampoco indujo cambios en la expresión FGF23 (Figura 16).

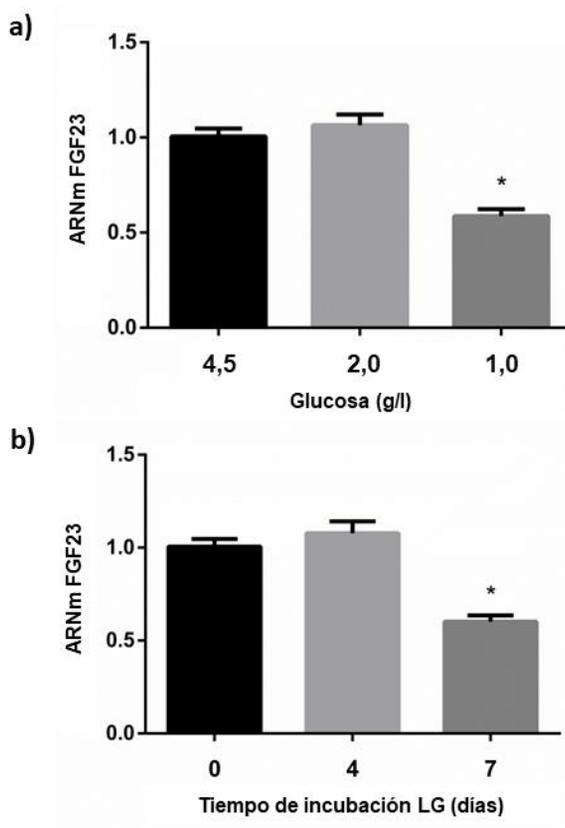


Figura 16. Respuesta de expresión de ARNm de FGF23 en un estudio de (a) dosis-dependencia en células UMR 106 incubadas durante 6 días con diferentes concentraciones de glucosa, * $p < 0,05$ vs 4,5 g/L y (b) tiempo-dependencia en células UMR 106 incubadas con un medio de cultivo con una concentración baja de glucosa (LG), * $p < 0,05$ vs 0 días.

Además del FGF23, se evaluó el efecto de la disponibilidad energética en otros genes osteogénicos, en los que no se observaron cambios derivados de la exposición de glucosa, ni en la expresión de RunX2, $1,03 \pm 0,12$ vs $0,92 \pm 0,06$, ni en Osterix, $1,00 \pm 0,04$ vs $0,96 \pm 0,04$ (Figura 17).

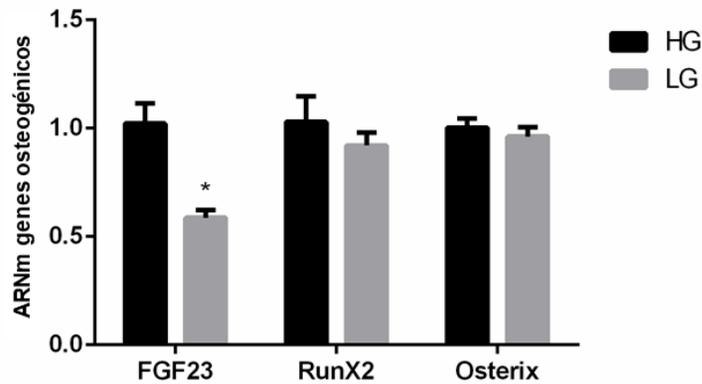


Figura 17. Expresión de ARNm de FGF23, RunX2 y Osterix en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG, barras negras) o baja (LG, barras grises) durante 6 días. * $p < 0,05$ vs HG.

Cuando la osmolaridad del medio LG se igualó a la del medio HG mediante la adición de manitol, los efectos de la concentración de glucosa sobre la expresión de FGF23 no se vieron alterados, manteniéndose niveles de expresión de ARNm inferiores en las células cultivadas en baja glucosa con manitol (LG+Man), $0,56 \pm 0,11$, respecto a aquellas cultivadas con HG, $1,02 \pm 0,09$ ($p=0,002$; Figura 18).

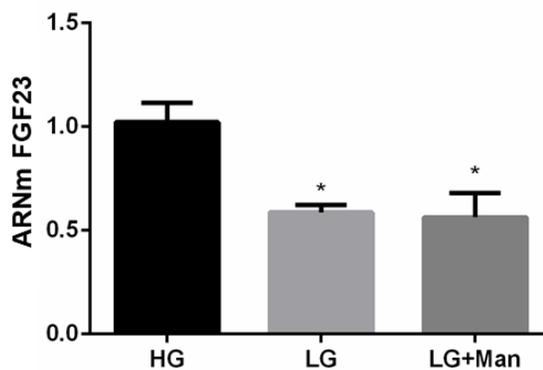


Figura 18. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG) o baja (LG) y baja con adición de manitol (LG+Man) durante 6 días. * $p < 0,05$ vs HG.

Como cabía esperar, la expresión de FGF23 aumentó con el incremento de fósforo en el medio. Sin embargo, este estímulo sólo se produjo en condiciones de HG, $1,66 \pm 0,18$ vs $1,02 \pm 0,09$ ($p < 0,0001$). Cuando las células fueron incubadas con LG, la concentración del fósforo no modificó la expresión de FGF23, $0,50 \pm 0,02$ en HP vs $0,59 \pm 0,03$ en NP (Figura 19).

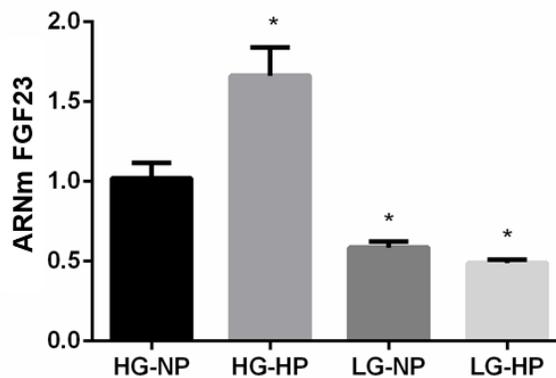


Figura 19. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta y fósforo normal (HG-NP), glucosa alta y fósforo alto (HG-HP), glucosa baja y fósforo normal (LG-NP) o glucosa baja y fósforo alto (LG-HP) durante 6 días. * $p < 0,05$ vs HG-NP.

Finalmente, los estudios sobre la implicación de mTOR en la modulación de la expresión de FGF23 revelaron una reducción significativa en la cuantificación del ARNm en las células tratadas con cualquiera de los dos inhibidores utilizados en el experimento. La exposición a rapamicina 10 nM disminuyó el FGF23 de valores de $1,05 \pm 0,14$, en células tratadas con el vehículo dimetilsulfóxido (HG+DMSO), a $0,45 \pm 0,03$ ($p = 0,001$), en células tratadas con rapamicina (HG+Rap). Un resultado similar se observó cuando las

células fueron expuestas a everolimus (HG+Eve), reduciéndose la expresión de FGF23 a $0,62 \pm 0,04$ ($p=0,005$; Figura 20).

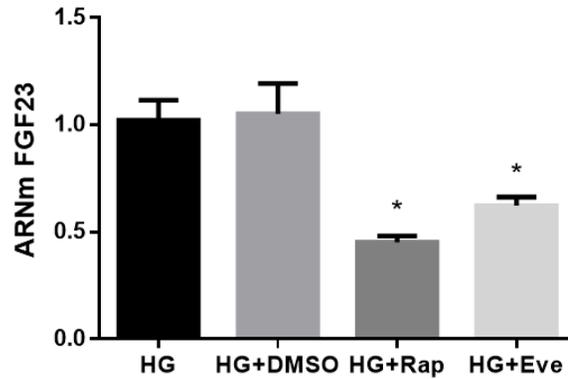


Figura 20. Expresión de ARNm de FGF23 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta (HG), glucosa alta y DMSO (HG+DMSO), glucosa alta y rapamicina 10 nM (HG+Rap) o glucosa alta y everolimus 10 nM (HG+Eve) durante 6 días. * $p<0,05$ vs HG.

Además, la inhibición de mTOR en células UMR106 también disminuyó significativamente la expresión de STIM1 en células tratadas con rapamicina, $0,79 \pm 0,05$ ($p=0,004$) o everolimus, $0,82 \pm 0,06$ ($p=0,02$), respecto a aquellas células no tratadas, $1,01 \pm 0,05$ (Figura 21).

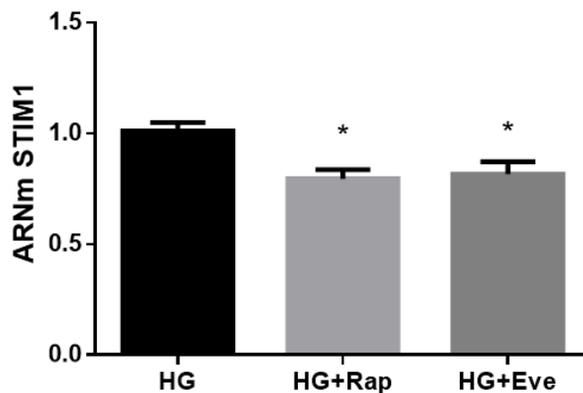


Figura 21. Expresión de ARNm de STIM1 en células UMR106 cultivadas en un medio con una concentración de glucosa alta sin inhibidor (HG), con rapamicina 10 nM (HG+Rap) o con everolimus 10 nM (HG+Eve) durante 6 días. * $p<0,05$ vs HG.

Estudios adicionales revelaron un comportamiento de dosis-dependencia en respuesta al tratamiento con rapamicina (Figura 22a). También encontramos que una exposición reducida a rapamicina no resultó en una disminución de FGF23 (Figura 22b), efecto equiparable al encontrado en los experimentos de tiempo-dependencia a la glucosa.

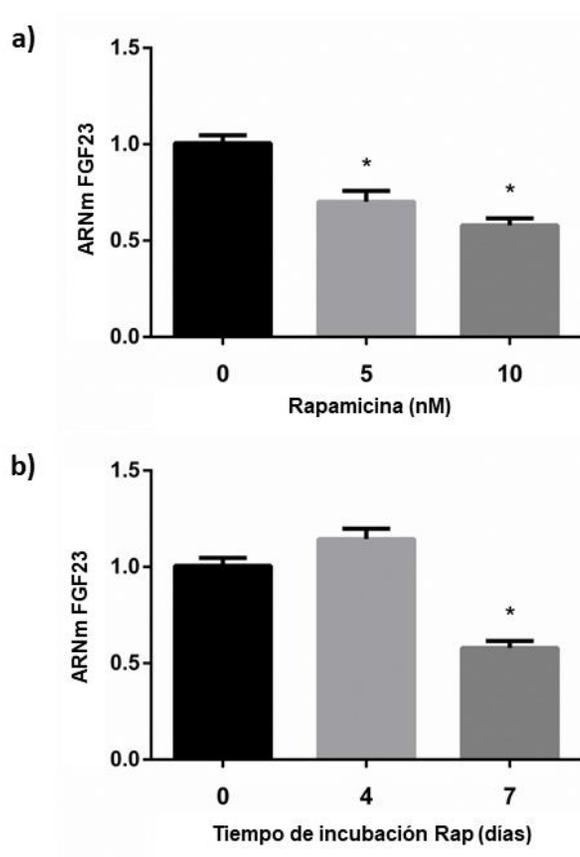


Figura 22. Respuesta de expresión de ARNm de FGF23 en un estudio de (a) dosis-dependencia en células UMR 106 incubadas durante 6 días con diferentes concentraciones de rapamicina, * $p < 0,05$ vs 0 nM; y (b) tiempo-dependencia en células UMR 106 incubadas con rapamicina a 10 nM, * $p < 0,05$ vs 0 días.

SECCIÓN 2. ENFERMEDAD RENAL Y CALCIFICACIÓN VASCULAR

Estudio 3. Efecto de la restricción calórica sobre la enfermedad renal y la calcificación vascular

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos en los experimentos dedicados a explorar el efecto de la RC en el contexto de la enfermedad renal y CV.

A. Estudio de calcificación vascular

En la Tabla 7, se muestra la ingesta calórica y de fósforo de los 4 grupos de estudio incluidos en el experimento de CV, pre- y post- tratamiento de inducción de calcificación (pre-CV y post-CV, respectivamente). De acuerdo con el diseño experimental, durante la fase pre-CV, los grupos 2 y 4, los cuales se mantuvieron durante este periodo con un régimen de alimentación de RC, tuvieron una ingesta energética inferior a los grupos 1 y 3. En cambio, durante la fase de calcificación, en la cual se siguió una alimentación *ad libitum* en todos los grupos, los animales redujeron voluntariamente el consumo de alimento. Ese hecho se vio reflejado como una disminución en la ingesta calórica de todos los animales (Tabla 7) así como en una reducción del peso corporal al final de este periodo (Figura 23).

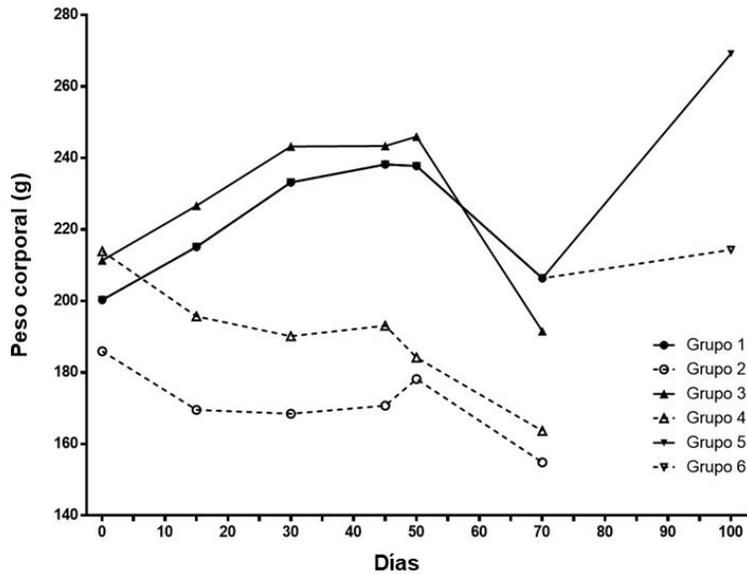


Figura 23. Evolución del peso corporal en los diferentes grupos de ratas incluidas en el estudio de calcificación vascular. Líneas continuas: ratas con ingesta calórica normal en la fase previa a la calcificación vascular (Grupos 1 y 3) o durante la fase de regresión (Grupo 5). Líneas discontinuas: ratas sometidas a restricción calórica en la fase previa a la calcificación vascular (Grupos 2 y 4) o durante la fase de regresión (Grupo 6).

Los datos de la ingesta de fósforo tuvieron un comportamiento inverso. En la fase pre-CV, en la cual los animales recibieron dietas con la misma concentración de fósforo, no se observaron diferencias entre grupos. En cambio, post-CV, los grupos 1 y 2 recibieron una dieta con un contenido de fósforo inferior a la los grupos 3 y 4, resultado en un incremento de la ingesta total de fósforo en estos animales. Es interesante remarcar que, aunque los animales pertenecientes a los grupos 1 y 2 consumieron una dieta alta en fósforo durante el periodo de calcificación, la reducción drástica en el consumo de alimento observada en todos los animales del estudio tras la nefrectomía impidió el incremento en la ingesta de fósforo en comparación con la fase previa (Tabla 7).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
pre-CV	NC-NP	RC-NP	NC-NP	RC-NP
Ingesta calórica (kcal/día)	52,7 ± 0,1 ^a	35,4 ± 0,1 ^b	52,8 ± 0,2 ^a	35,8 ± 0,1 ^b
Ingesta fósforo (mg/día)	89,8 ± 0,2 ^a	90,6 ± 0,2 ^a	90,0 ± 0,3 ^a	91,6 ± 0,3 ^a
post-CV	NC1,2	NC1,2	NC1,8	NC1,8
Ingesta calórica (kcal/día)	27,8 ± 1,7 ^{a*}	18,9 ± 1,0 ^{b*}	23,6 ± 0,9 ^{a*}	23,9 ± 1,2 ^{a*}
Ingesta fósforo (mg/día)	94,7 ± 5,8 ^a	64,4 ± 3,4 ^{b*}	120,9 ± 4,6 ^{c*}	122,2 ± 6,2 ^{c*}

Tabla 7. Ingesta calórica e ingesta de fósforo pre y post inducción de calcificación vascular. CV, calcificación vascular. Diferentes letras en el superíndice indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) intragrupo en comparación con la fase pre-CV. NC-NP, dieta normocalórica y contenido normal de fósforo (pauta sin restricción calórica); RC-NP, dieta normocalórica y contenido normal de fósforo (pauta de restricción calórica); NC1,2, dieta normocalórica y 1,2% de fósforo (pauta *ad libitum*); NC1,8, dieta normocalórica y 1,8% de fósforo (pauta *ad libitum*).

Todos los animales incluidos en este estudio se sometieron a Nx 5/6. Era, pues, esperable encontrar concentraciones plasmáticas de creatinina, urea y fósforo elevadas en todos los grupos, aunque no alcanzaron diferencias significativas entre grupos ni atendiendo a la ingesta calórica ni en función de la ingesta de fósforo (Tabla 8).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Calcio (mg/dl)	7,8 ± 1,2	7,7 ± 1,2	7,8 ± 1,0	6,8 ± 1,1
Fósforo (mg/dl)	20,7 ± 3,6	20,5 ± 2,0	24,8 ± 4,7	30,9 ± 2,4
Creatinina (mg/dl)	2,3 ± 0,12	2,8 ± 0,24	2,7 ± 0,24	2,6 ± 0,43
Urea (mg/dl)	325,7 ± 60,8	370,7 ± 47,3	398,8 ± 82,4	490,0 ± 43,2

Tabla 8. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal en ratas urémicas en fase de calcificación vascular. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. Grupo 1, ratas alimentadas con una ingesta calórica normal antes de la nefrectomía y 1,2% de fósforo después de la nefrectomía. Grupo 2, ratas alimentadas con restricción calórica antes de la nefrectomía y 1,2% de fósforo después de la nefrectomía. Grupo 3, ratas alimentadas con una ingesta calórica normal antes de la nefrectomía y 1,8% de fósforo después de la nefrectomía. Grupo 4, ratas alimentadas con restricción calórica antes de la nefrectomía y 1,8% de fósforo después de la nefrectomía.

Como se puede observar en la Figura 24a, todos los animales alcanzaron niveles de FGF23 plasmáticos muy elevados. La concentración de fósforo en la dieta durante el tratamiento de calcificación se evidenció por el mayor incremento de FGF23 en los animales alimentados con NC1,8 (Grupo 3: 22.958 ± 683 pg/ml y Grupo 4: 15.985 ± 2367 pg/ml) en comparación con aquellos alimentados con NC1,2 (Grupo 1: 8.260 ± 322 pg/ml y Grupo 2: 7.123 ± 345 pg/ml). Además, la RC pre-CV resultó en una disminución del FGF23 independientemente de la ingesta de fósforo post-CV, aunque sólo alcanzó significancia estadística en aquellos animales alimentados con NC1,8.

La expresión renal de alfa-Klotho se encontró reducida en todos los grupos como consecuencia de la uremia, especialmente en aquellos con dieta NC1,8 (Figura 24b). No se encontraron diferencias significativas derivadas de la RC pre-CV ni en animales con dieta NC1,2, $0,15 \pm 0,04$ en Grupo 2 vs $0,12 \pm 0,02$ en Grupo 1, ni en aquellos con dieta NC1,8, $0,05 \pm 0,02$ en Grupo 4 vs $0,05 \pm 0,01$ en Grupo 3 (Figura 24b).

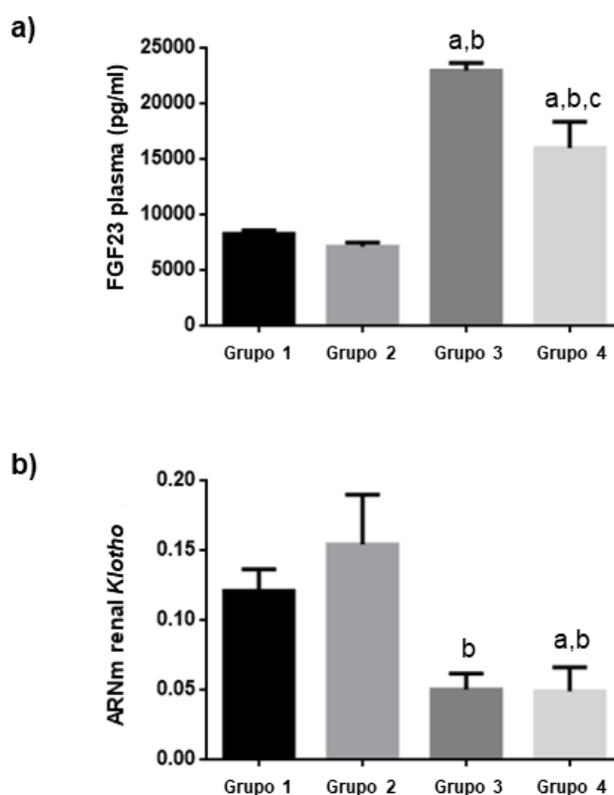


Figura 24. (a) Concentración plasmática de FGF23 y (b) expresión renal de ARNm de *Klotho* en los grupos de ratas incluidos en el estudio de calcificación de vascular (CV). Grupos 1 y 3, ratas alimentadas con una ingesta calórica normal en la fase previa a la CV. Grupos 2 y 4, ratas con restricción calórica en la fase previa a la CV. La concentración de fósforo en la dieta durante la calcificación vascular fue de 1,2% (grupos 1 y 2) o 1,8% (grupos 3 y 4). ^ap<0.05 vs Grupo 1; ^bp<0.05 vs Grupo 2; ^cp<0.05 vs Grupo 3.

El análisis histológico del tejido aórtico demostró abundancia de depósito mineral en todos los grupos de estudio, aunque no se observaron diferencias significativas en el contenido del calcio aórtico; ni en función de la ingesta calórica durante la fase pre-CV, $10,9 \pm 2,1$ mg/g en Grupo 2 vs $11,5 \pm 1,7$ mg/g en Grupo 1, y $12,0 \pm 1,9$ mg/g en Grupo 4 vs $12,5 \pm 2,3$ mg/g en Grupo 3, ni tampoco entre animales alimentados con diferentes concentraciones de fósforo durante la fase post-CV (Grupo 3 vs 1 y Grupo 4 vs 2) (Figura 25).

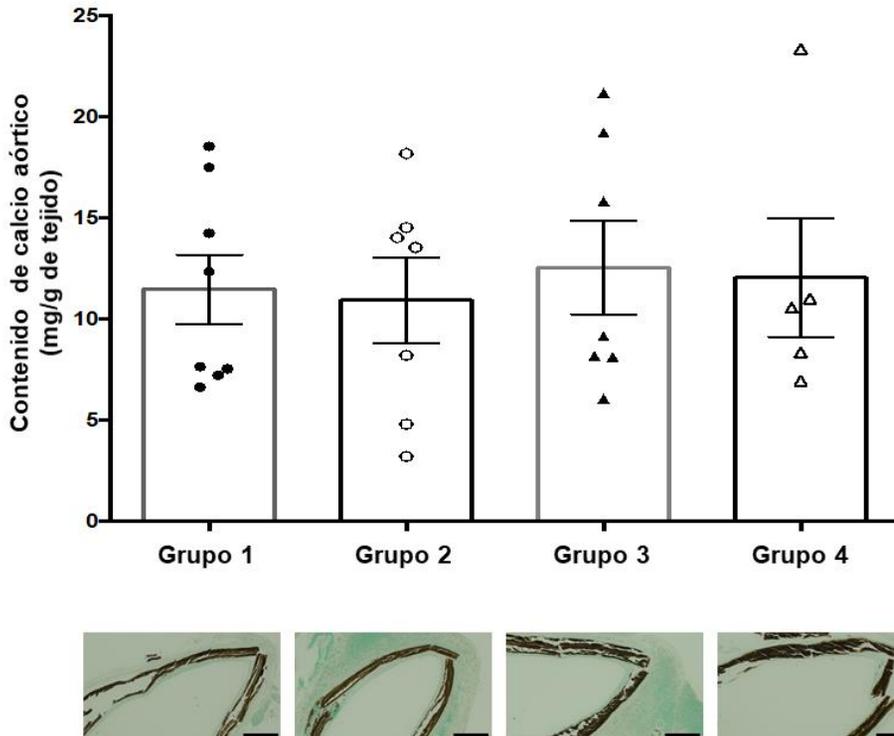


Figura 25. Concentración de calcio contenido en tejido aórtico (superior) y secciones representativas de aorta teñida con Von Kossa (inferior) de los animales incluidos en el estudio de calcificación vascular (CV). Grupos 1 y 3, ratas alimentadas con una ingesta calórica normal en la fase previa a la CV. Grupos 2 y 4, ratas con restricción calórica en la fase previa a la CV. La concentración de fósforo en la dieta durante la calcificación vascular fue de 1,2% (grupos 1 y 2) o 1,8% (grupos 3 y 4). Escala 100 μm .

B. Estudio de supervivencia

Durante los 14 días que duró el tratamiento de CV, algunas ratas murieron de forma natural y otras fueron sacrificadas por razones humanitarias antes de la finalización del estudio. Se establecieron como criterios de punto final la aparición de anorexia, dificultad respiratoria o estado estuporoso. De acuerdo a estos criterios, los animales sacrificados fueron, inicialmente, considerados como fallecidos en el estudio de supervivencia puesto que aún sin eutanasia se habría producido de forma inexorable la muerte natural.

Obsérvese en la Figura 26a el aumento de mortalidad en los grupos sometidos a RC en la fase pre-CV, independientemente de si recibieron posteriormente una dieta NC1,2 (tasa de supervivencia, TS, Grupo 1: 75% vs Grupo 2: 25%) o NC1,8 (TS, Grupo 3: 50% vs Grupo 4: 0%; $p < 0,001$). De forma adicional, y con el fin de evitar sesgos debido a los criterios de sacrificio adelantado, la TS también fue analizada excluyendo del estudio a los animales sacrificados antes de la finalización del experimento (Figura 26b).

La TS de los animales durante el curso del experimento presentó buena correlación con peso corporal al inicio de la fase de calcificación ($r = 0,5627$; $p < 0,0001$) (Figura 26c).

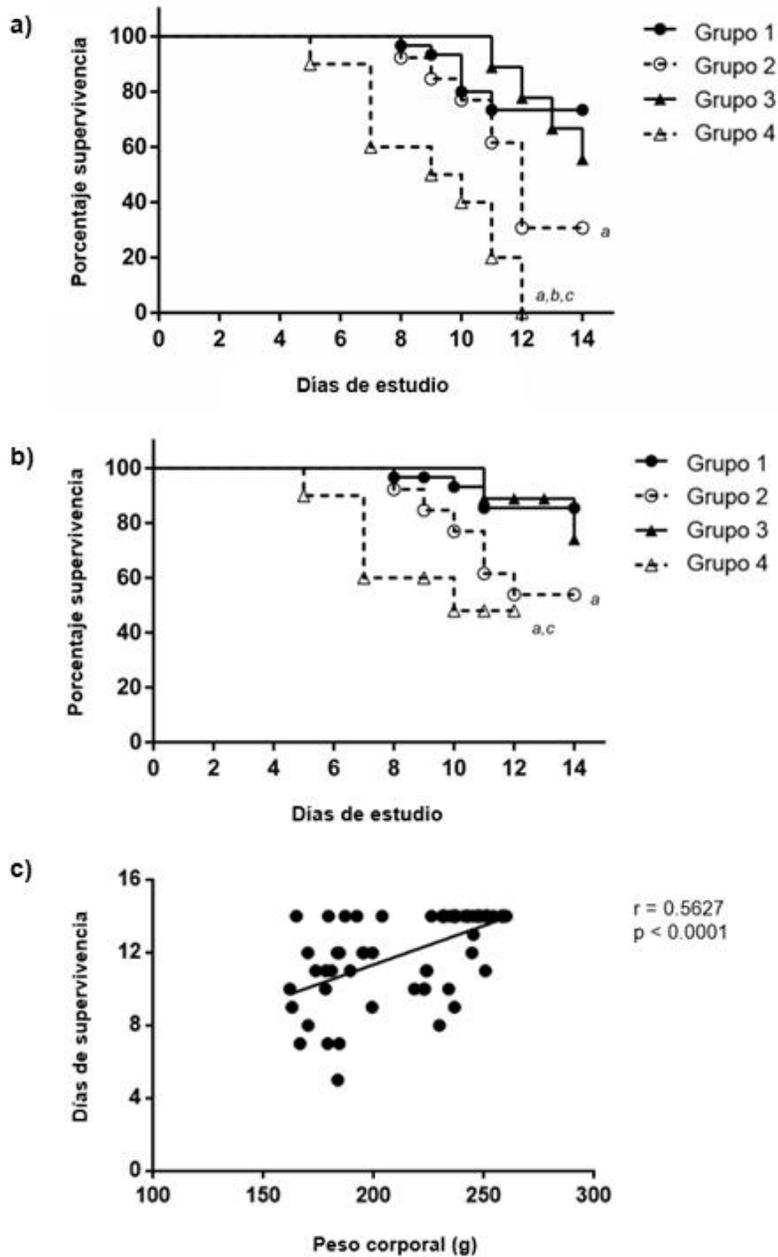


Figura 26. Curva de supervivencia Kaplan-Meier en ratas urémicas durante la fase de calcificación vascular (a) incluyendo todos los animales del estudio y (b) excluyendo a los animales sacrificados anticipadamente. (c) Correlación entre el peso corporal al inicio del periodo de calcificación y el tiempo de supervivencia. Grupos 1 y 3, ratas alimentadas con una ingesta calórica normal en la fase previa a la calcificación vascular (CV). Grupos 2 y 4, ratas con restricción calórica en la fase previa a la CV. La concentración de fósforo en la dieta durante la calcificación vascular fue de 1,2% (grupos 1 y 2) o 1,8% (grupos 3 y 4). ^a $p < 0.05$ vs Grupo 1; ^b $p < 0.05$ vs Grupo 2; ^c $p < 0.05$ vs Grupo 3.

C. Estudio de regresión de calcificación vascular

Para simplificar el seguimiento de los resultados del experimento de regresión de la CV, se presentarán los datos obtenidos tanto en los grupos de estudio (grupos 5 y 6) como del control interno (grupo 1), no sometido a fase de regresión.

Durante la fase de regresión los animales recuperaron la ingesta de alimento situándose en cantidades próximas a las registradas durante la fase previa a la CV. Como se observa en la Tabla 9, tras los 30 días que duró la fase de regresión, los animales del grupo 6 (RC) tuvieron una ingesta energética menor que el grupo 5, aunque sin cambios significativos en la ingesta final de fósforo.

A pesar de que durante el periodo de regresión los animales continuaron urémicos, los valores plasmáticos de creatinina y urea se redujeron de forma significativa tras cesar la pauta de tratamiento con calcitriol y retornar a una alimentación con una concentración estándar de fósforo. También se observó una disminución de los valores de fósforo en plasma en comparación con el grupo 1; no así el calcio, el cual se incrementó considerablemente en ambos grupos (Tabla 10).

	Grupo 1	Grupo 5	Grupo 6
pre-CV	NC-NP		
Ingesta calórica (kcal/día)	52,7 ± 0,1 ^a	-----	-----
Ingesta fósforo (mg/día)	89,8 ± 0,2 ^a	-----	-----
post-CV	NC1,2		
Ingesta calórica (kcal/día)	27,8 ± 1,7 ^{a*}	-----	-----
Ingesta fósforo (mg/día)	94,7 ± 5,8 ^a	-----	-----
Regresión		NC-NP	RC-NP
Ingesta calórica (kcal/día)	-----	51,7 ± 1,8 ^a	35,8 ± 0,2 ^b
Ingesta fósforo (mg/día)	-----	88,1 ± 3,1 ^a	91,4 ± 0,4 ^a

Tabla 9. Ingesta calórica e ingesta de fósforo en las distintas fases del experimento de los grupos incluidos en el estudio de regresión. CV, calcificación vascular. Diferentes letras en el superíndice indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) intragrupo en comparación con la fase pre-CV. NC-NP, dieta normocalórica y contenido normal de fósforo (pauta sin restricción calórica); RC-NP, dieta normocalórica y contenido normal de fósforo (pauta de restricción calórica); NC1,2, dieta normocalórica y 1,2% de fósforo (pauta *ad libitum*).

	Grupo 1	Grupo 5	Grupo 6
Calcio (mg/dl)	7,8 ± 1,2 ^a	11,7 ± 0,2 ^b	11,3 ± 0,1 ^b
Fósforo (mg/dl)	20,7 ± 3,6 ^a	5,5 ± 0,3 ^b	5,1 ± 0,3 ^b
Creatinina (mg/dl)	2,3 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,07 ^b	1,4 ± 0,1 ^b
Urea (mg/dl)	325,7 ± 60,8 ^a	76,4 ± 12,2 ^b	92,0 ± 11,2 ^b

Tabla 10. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal en ratas urémicas en fase de regresión de calcificación vascular. Diferentes letras en el superíndice indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Grupos 1, 5 y 6 tuvieron una ingesta calórica normal antes de la nefrectomía y 1,2% de fósforo después de la nefrectomía. Grupo 5, ratas alimentadas con una ingesta calórica normal durante la fase de regresión. Grupo 6, ratas alimentadas con restricción calórica durante la fase de regresión.

También se produjeron cambios en la concentración de FGF23 en plasma. Así, aunque no se observaron diferencias significativas entre el Grupo 5, 5.050 ± 597 pg/ml, y el Grupo 6, 4.703 ± 704 pg/ml, cuando estos datos se compararon con el Grupo 1, 8.260 ± 322 pg/ml, sí se observó una disminución significativa del FGF23 tras la fase de regresión (Figura 27a). Estos cambios se acompañaron de un aumento en la expresión de ARNm de alfa-Klotho renal, $0,22 \pm 0,04$ y $0,24 \pm 0,08$ vs $0,12 \pm 0,02$ del Grupo 1 (Figura 27b).

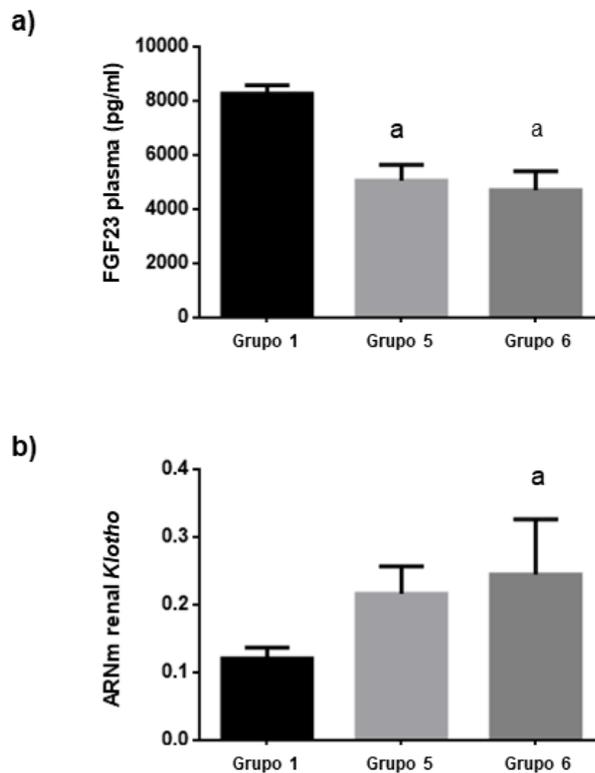


Figura 27. (a) Concentración plasmática de FGF23 y (b) Expresión renal de ARNm de *Klotho* en los grupos de ratas alimentadas con una ingesta calórica normal (Grupo 5) o reducida (Grupo 6) durante la fase de regresión de la calcificación vascular. ^ap<0.05 vs Grupo 1.

El estudio de calcificación del tejido aórtico reveló un descenso significativo en el contenido de calcio, $5,7 \pm 2,7$ mg/g en el Grupo 5 y $5,2 \pm 1,5$ mg/g en el Grupo 6, cuando se comparó con el Grupo 1, $11,5 \pm 1,7$ mg/g, aunque no se encontraron diferencias significativas entre alimentación *ad libitum* o RC (Figura 28).

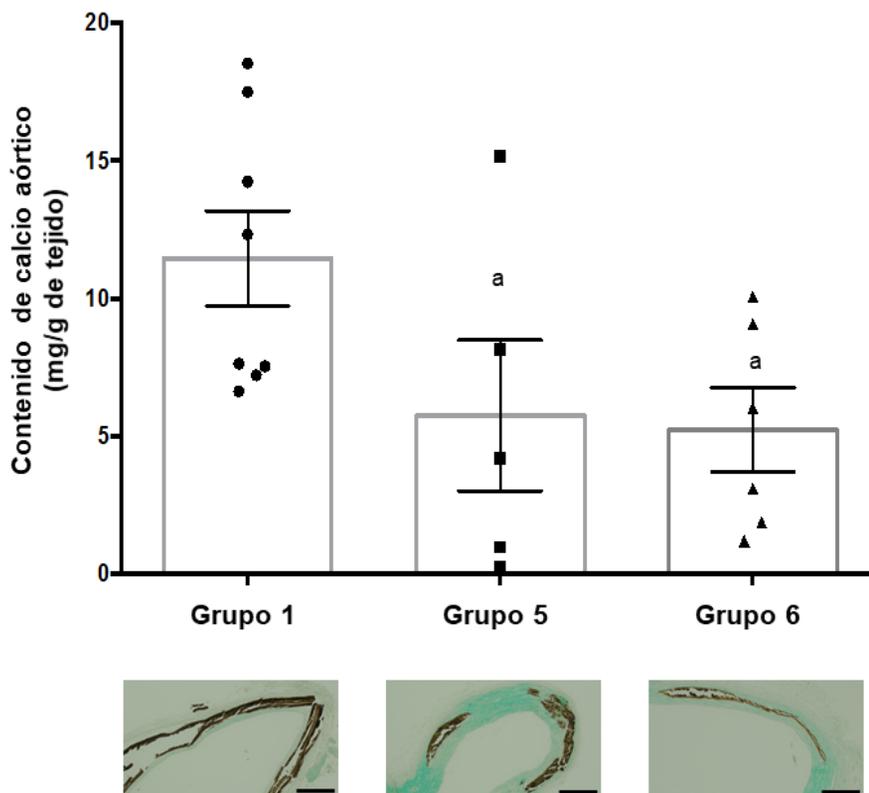


Figura 28. Concentración de calcio contenido en tejido aórtico (superior) y secciones representativas de aorta teñida con Von Kossa (escala 100 μ m) (inferior) en los grupos de ratas alimentadas con una ingesta calórica normal (Grupo 5) o reducida (Grupo 6) durante la fase de regresión de la calcificación vascular.

SECCIÓN 3. METABOLISMO MINERAL Y COMPOSICIÓN MUSCULAR

Estudio 4. Efecto de la dieta hipocalórica sobre el metabolismo de la vitamina D y la composición muscular

Durante las 28 semanas que duró el experimento, las ratas que se alimentaron con un régimen de dieta hC perdieron un 12,9% de su peso corporal total, de $239,0 \pm 2,7$ a $208,0 \pm 3,7$ g. Las ratas del grupo control, en cambio, ganaron un 31,3 % respecto a su peso inicial, de $244,6 \pm 1,9$ a $321,3 \pm 7,2$ g ($p < 0,0001$; Figura 29a). Además, el peso de la grasa abdominal, la cual fue extraída y pesada durante el sacrificio, fue mucho menor en las ratas del grupo hC, $1,7 \pm 0,2$ g, que en las del grupo control, $20,4 \pm 2,4$ g ($p < 0,0001$). Por tanto, los animales con dieta hC resultaron ser un 35% menos pesados teniendo hasta un 90% menos de grasa abdominal que las ratas del grupo control.

A. Estudio muscular

A.1. Masa muscular

Para la realización del estudio de musculatura esquelética se tomaron dos músculos: tibial craneal y sóleo. El músculo tibial craneal no sufrió modificaciones en cuanto a peso cuando se compararon ambos grupos. Sin

embargo, el peso registrado en el momento del sacrificio para el músculo sóleo resultó ser un 12% menor en el grupo hC ($p=0,03$; Figura 29b).

Debido a la diferencia de peso corporal ganado entre los grupos de estudio, la valoración de la masa muscular se realizó utilizando el ISM, observándose un incremento de este en un 55% en el músculo tibial craneal y un 35,5% en el sóleo de ratas alimentadas con un régimen hC ($p<0,0001$; Figura 29c).

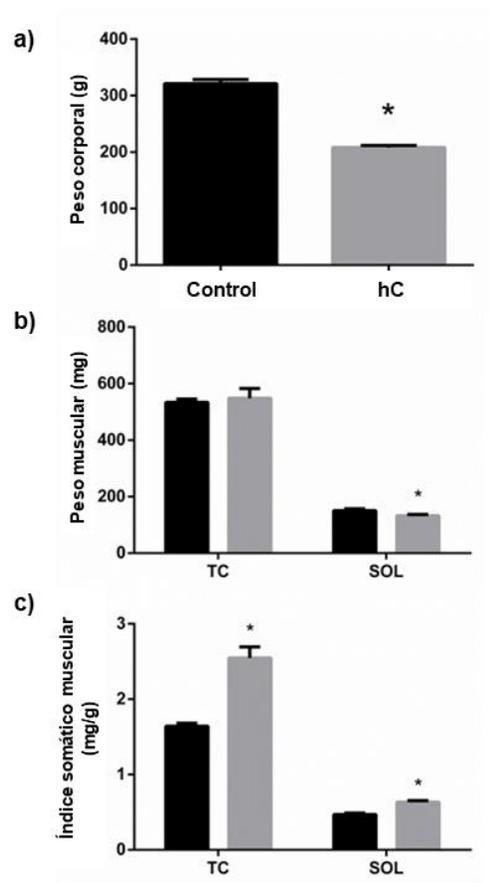


Figura 29. (a) Peso corporal de las ratas en el momento del sacrificio, (b) peso muscular y (c) índice somático muscular de los músculos tibial craneal, TC, y sóleo, SOL, en el momento del sacrificio en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (hC, barra gris). * $p<0.05$ vs Control.

A.2. *Composición muscular*

Tanto en el músculo tibial craneal como en el sóleo se identificaron los tipos de fibras musculares presentes en cada grupo de estudio.

En el tibial craneal se identificaron cuatro tipos de fibras principales: I, IIA, IIX y IIB. En este músculo, la RC supuso un incremento en la proporción de fibras de tipo IIA de un 13,8% ($p=0,001$), que se acompañó con una disminución en el número de fibras de tipo IIX, 12,8% ($p=0,006$). No se observaron cambios fenotípicos en relación a las fibras de tipo I ni tampoco del tipo IIB (Figura 30a).

El sóleo, el cual se compone en condiciones normales de fibras de tipo I y una menor proporción de fibras de tipo IIA, no presentó cambios significativos en cuanto a la composición de fibras musculares. No obstante, se observó una tendencia hacia la reducción de fibras de tipo I en la misma proporción que aumentó el porcentaje de fibras de tipo IIA (2,2%) cuando los animales se alimentaron con el protocolo de dieta hC (Figura 30b).

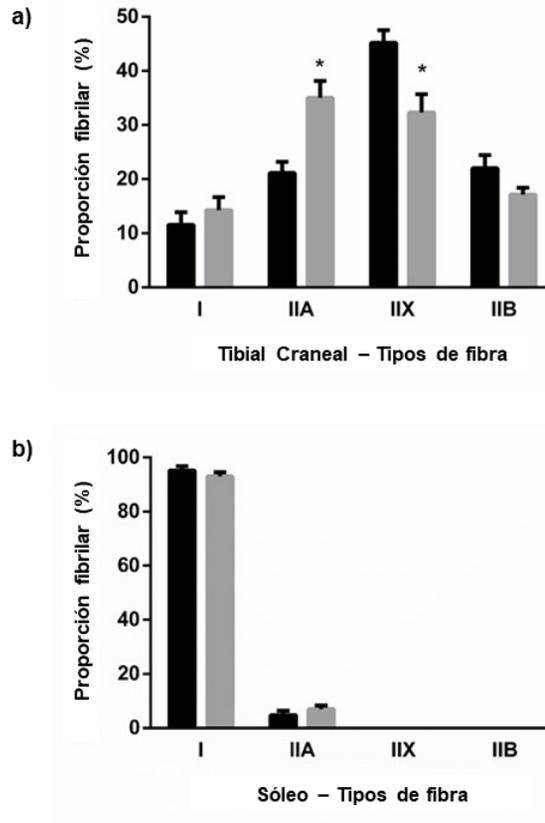


Figura 30. Composición fibrilar del músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (barra gris). * $p < 0.05$ vs Control.

A.3. Tamaño fibrilar

El tamaño de las fibras musculares se analizó mediante la valoración de dos indicadores: el área de cada fibra muscular y su diámetro menor. Se encontró una alta correlación entre ambos parámetros por lo que los resultados de tamaño fibrilar han sido reflejados a lo largo de este trabajo utilizando el valor del área.

Los cuatro tipos de fibras musculares identificados en tibial craneal sufrieron una ligera atrofia, aunque no significativa, en el grupo hC cuando se

comparó con el grupo control. Esta atrofia fue más evidente en las fibras de fenotipo rápido (IIA, IIX, IIB), siendo más discreta en las fibras de fenotipo lento (tipo I) (Figura 31a). En el músculo sóleo también se encontró una disminución de su tamaño, en este caso significativa, como consecuencia de la atrofia generalizada de los dos tipos de fibras identificados. Esta atrofia afectó principalmente a las fibras de tipo I, presentando un área de $4.181 \pm 222 \mu\text{m}^2$ en el grupo control frente a $3.395 \pm 222 \mu\text{m}^2$ en el grupo hC ($p=0,025$; Figura 31b).

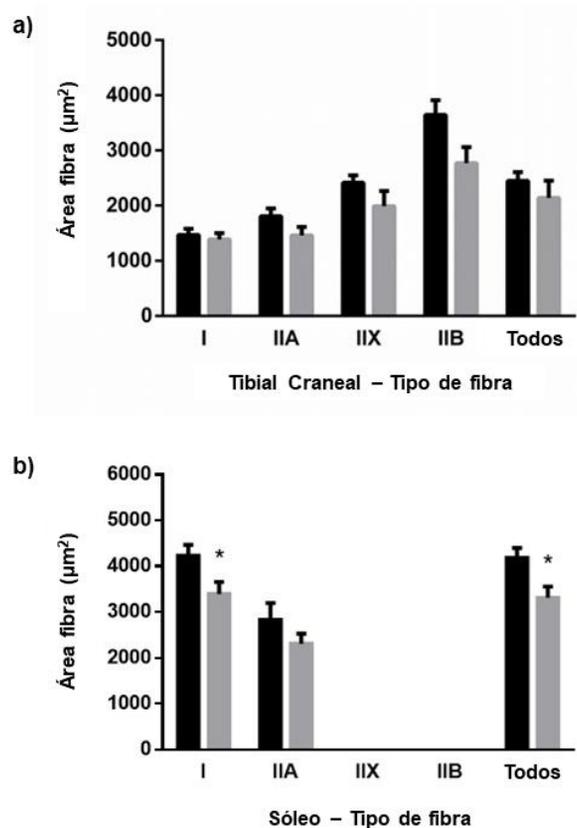


Figura 31. Tamaño fibrilar en el músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (barra gris). * $p<0.05$ vs Control.

A.4. Actividad oxidativa

El perfil oxidativo muscular, representado como unidades de DO obtenidas a partir del estudio de la actividad de la SDH, no cambió en el músculo tibial craneal (Figura 32a). Sin embargo, sí se observó una modificación en la actividad SDH en el músculo sóleo, encontrándose reducida en ratas del grupo hC, $0,41 \pm 0,01$ unidades DO, en comparación con el grupo control, $0,47 \pm 0,01$ unidades DO ($p < 0,001$; Figura 32b).

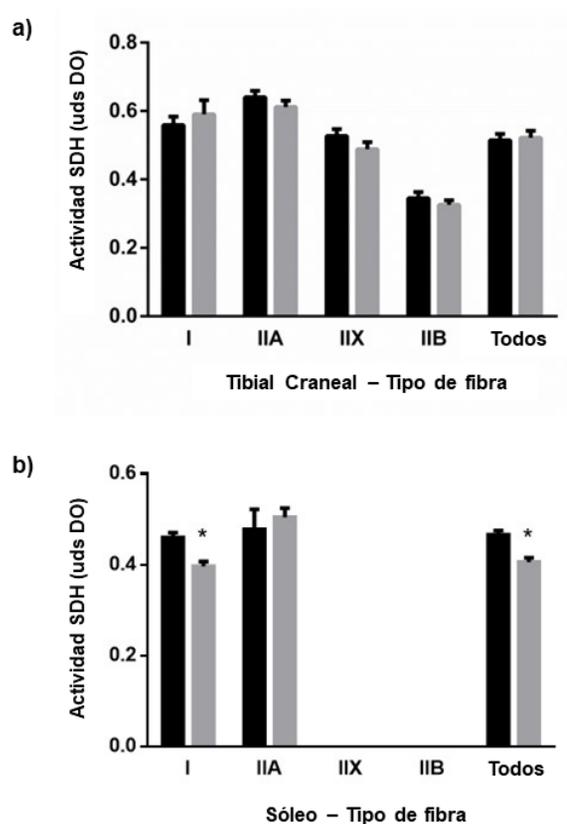


Figura 32. Actividad media de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en las fibras en el músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control, barra negra) o reducido (barra gris). * $p < 0,05$ vs Control.

B. Estudio sobre el metabolismo de la vitamina D

B.1. Vitamina D y metabolitos

Como metabolitos integrantes del metabolismo de la vitamina D, se midieron tanto la forma activa de la vitamina D (calcitriol) como su precursor (calcidiol). No se encontraron diferencias significativas en los valores de calcidiol del grupo hC, $19,9 \pm 1,7$, al compararlo con el control, $23,2 \pm 1,8$ ng/ml ($p=0,181$; Figura 33a) mientras que el calcitriol plasmático experimentó un incremento significativo en el grupo hC, $169,7 \pm 6,8$ pg/ml, respecto al grupo control, $85,4 \pm 11,5$ pg/ml ($p<0,0001$; Figura 33b). Estos datos fueron consistentes con el análisis de las enzimas implicadas en el metabolismo de la vitamina D, encontrándose un incremento en la expresión de ARNm renal de la enzima Cyp27b1 en ratas con dieta hC, $3,01 \pm 0,78$ vs $1,24 \pm 0,31$ ($p=0,027$; Figura 33c), y una disminución en la expresión renal de Cyp24a1, $0,14 \pm 0,11$ vs $1,30 \pm 0,31$ ($p=0,011$; Figura 33d). Además, también se encontraron valores plasmáticos de FGF23 más bajos en los animales del grupo hC, $151,2 \pm 14,1$ pg/ml, que en aquellos del grupo control, $324,5 \pm 16,8$ pg/ml ($p<0,0001$; Figura 33e).

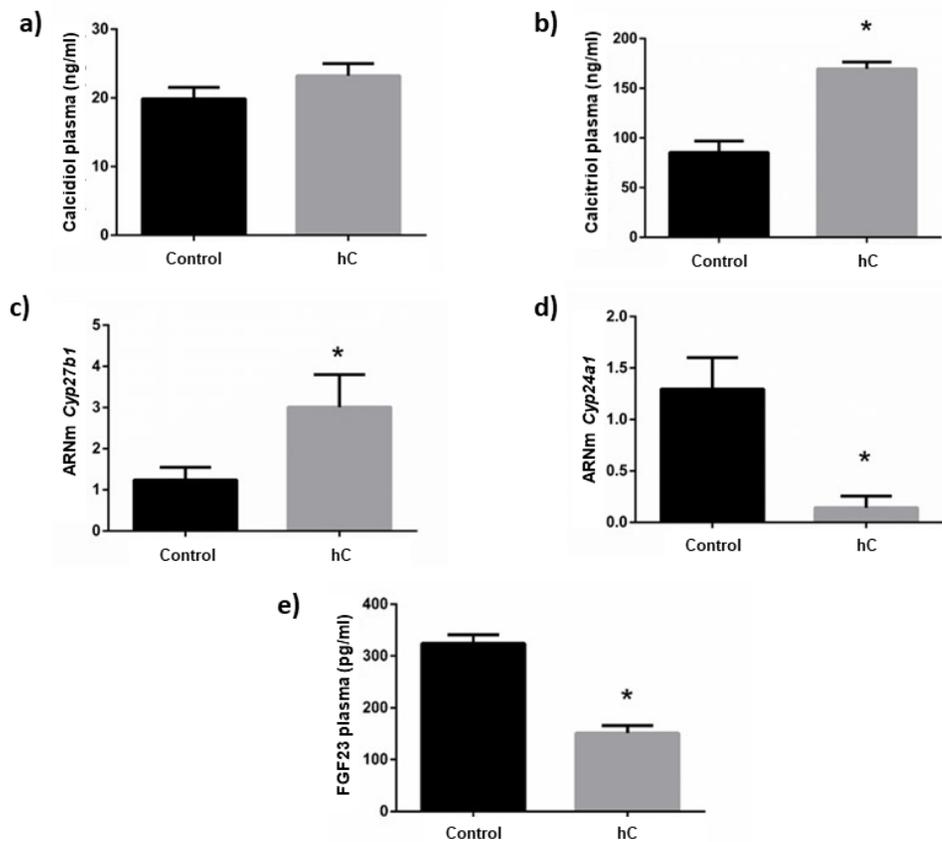


Figura 33. (a) Concentración plasmática de calcidiol, (b) concentración plasmática de calcitriol, (c) expresión renal de la enzima 1-alfa-hidroxilasa, Cyp27b1, (d) expresión renal de la enzima 24-hidroxilasa, Cyp24a1, y (e) concentración plasmática de FGF23 en ratas alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (Control) o reducido (hC). * $p < 0.05$ vs Control.

B.2. Estudio de correlaciones

El estudio de Pearson reveló la existencia de correlación positiva entre el incremento de calcitriol y el aumento del ISM observado en las ratas del grupo hC. Esta relación se encontró en el análisis de ambos músculos, tibial craneal (Figura 34a) y sóleo (Figuras 34b). También se encontró correlación positiva entre los cambios fenotípicos de la composición fibrilar y el calcitriol. Así, la

proporción de fibras de tipo IIA en el músculo tibial craneal presentó una correlación positiva ($r=0,772$; $p<0,001$) con los niveles plasmático de calcitriol, mientras que la proporción de fibras de tipo IIX mostró una correlación negativa ($r=-0,638$; $p=0,004$). También los cambios en la actividad oxidativa observados en el músculo sóleo revelaron una correlación inversa con los valores de calcitriol ($r=-0,491$; $p=0,009$).

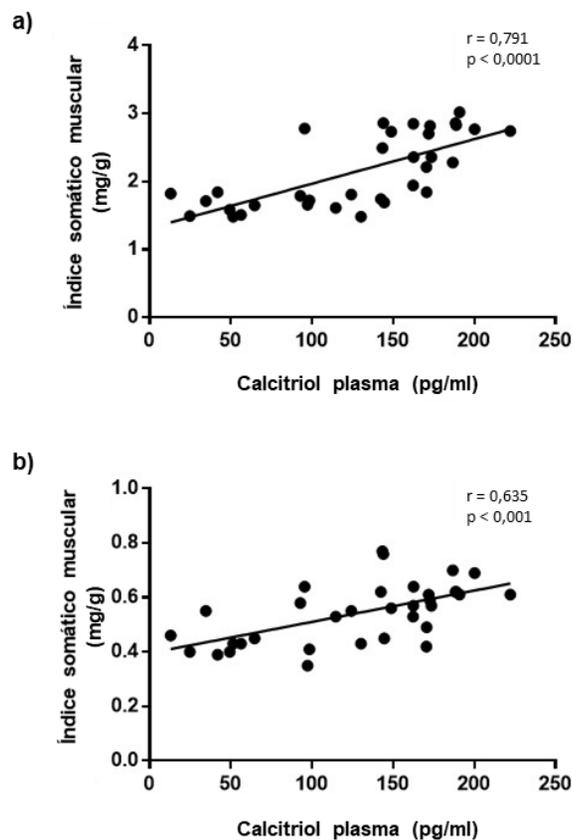


Figura 34. Correlación entre la concentración de calcitriol plasmático y el índice somático muscular en el músculo tibial craneal (a) y sóleo (b) en el conjunto de ratas alimentadas con una dieta de un contenido calórico normal o reducido.

Discusión

SECCIÓN 1. METABOLISMO ENERGÉTICO Y MINERAL

El primer gran objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de la RC sobre el metabolismo mineral y, concretamente, sobre el metabolismo del fósforo. Para ello se realizaron diferentes estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, encaminados a investigar el papel de la ingesta calórica sobre la modulación del balance del fósforo y la producción de FGF23, así como de los mecanismos implicados en la conexión energético-mineral.

La RC ha demostrado tener múltiples efectos sobre el organismo. Desde la simple pérdida de peso con los beneficios metabólicos que esto conlleva en un contexto de obesidad y síndrome metabólico, hasta el aumento de la longevidad, efecto muy estudiado en roedores, aunque con importantes discrepancias en cuanto a su estudio en humanos (Omodei y Fontana, 2011; Most et al., 2017; Wang, S.Y. et al., 2018; Almendáriz-Palacios et al., 2020).

Son diversas las formas de diseñar una pauta de alimentación de RC. La metodología más extendida en investigación es la restricción parcial en la ingesta de alimento, en una proporción que oscila alrededor de un 30-40% de reducción respecto a las necesidades energéticas diarias del animal (Young y Kirkland, 2007). Este es un método común para la inducción de RC que puede aplicarse tanto en un protocolo de restricción diaria (Ingram et al., 2017) como en días alternos (Xie et al., 2017). Sin embargo, a pesar de la sencillez en el diseño y el desarrollo de los experimentos, este enfoque tiene el inconveniente

de reducir no sólo en consumo energético el conjunto de los nutrientes, incluyendo el fósforo, puesto que los animales comen, proporcionalmente, menor cantidad de cada uno de los macro y micronutrientes que componen la dieta. En un esfuerzo de equiparar la ingesta de fósforo en cada uno de los grupos, los estudios planteados en la presente Tesis con esta metodología fueron diseñados ajustando el contenido mineral de las dietas, evitando así los efectos colaterales sobre el metabolismo mineral causados por la ingesta de fósforo. Por otro lado, en el campo de la nutrición humana están ampliamente aceptadas otras estrategias que consisten en la reducción del contenido calórico de la dieta mediante la modificación en la proporción de los macronutrientes que la componen. Es por ello que ambas opciones han sido objeto de estudio en este trabajo.

Por tanto, en esta sección se discuten un conjunto de experimentos diseñados con el fin de investigar la influencia de la ingesta energética sobre el metabolismo del fósforo y el FGF23. Los resultados demuestran una relación directa entre estos parámetros. En los experimentos *in vivo*, un aumento en la ingesta calórica se asoció con concentraciones más altas de FGF23, mientras que la restricción calórica dio como resultado niveles más bajos de FGF23. En los experimentos *in vitro*, la disponibilidad energética también moduló el FGF23, disminuyendo su expresión cuando se redujo la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Además, los estudios *in vitro* también indican

que la vía de señalización de mTOR se encuentra involucrada en la regulación de FGF23 por la ingesta calórica.

1.1. Efecto de la RC sobre el metabolismo energético

Como cabía esperar, la RC aportó múltiples beneficios metabólicos. Los animales sometidos a la misma experimentaron una pérdida de peso significativa manifestada principalmente como pérdida de grasa abdominal, lo que se reflejó como una disminución en la concentración plasmática de leptina. Además, se observó que estos animales también disminuyeron de forma general las concentraciones sanguíneas de lípidos mientras que incrementaron el valor de adiponectina plasmática. Todos estos cambios metabólicos concuerdan con los anteriormente reportado por otros autores (Park, S.Y. et al., 2005; Speakman et al., 2011; Chen, J.H. et al., 2015). La concentración plasmática de glucosa, en cambio, no se vio modificada de una forma directa por el contenido calórico de la dieta. De hecho, las ratas alimentadas con una dieta HC tuvieron valores de glucosa ligeramente más bajos que los alimentados con una dieta normal o hC. En cambio, la RC basada en la restricción de alimento ofrecido (NCR, Estudio 2) sí que disminuyó la glucemia, aunque este efecto podría deberse a un artefacto causado por el comportamiento de alimentación de los animales. Teniendo en cuenta que las ratas NCR del Estudio 2 dispusieron de una menor cantidad de alimento diario,

no resultaría improbable que este grupo de animales ingiriesen rápidamente el alimento suministrado e incrementasen ligeramente el periodo de ayuno previo al sacrificio, influyendo así en los valores de glucosa sanguínea.

1.2. Efecto de la RC sobre el balance de fósforo

Aunque la alimentación de los animales se controló de forma exhaustiva y se hizo todo lo posible por ajustar la ingesta de fósforo en todas las ratas a la misma cantidad, es conocido que las modificaciones dietéticas cambian el comportamiento de alimentación de los roedores. Es por ello que la evaluación del efecto del fósforo como parte integrante del metabolismo mineral y principal estímulo de la producción de FGF23, se realizó en función de la absorción intestinal neta de fósforo. Este parámetro es especialmente relevante en el Estudio 1 de esta sección, en el que se trabajó con dietas con diferente proporción de grasa, puesto que se ha demostrado que el contenido de grasa modifica la absorción de fósforo (Frommelt et al., 2014; Raya et al., 2016). No obstante, ni siquiera después de realizar todos estos ajustes se encontró relación entre FGF23 y absorción intestinal de fósforo. Los resultados de los estudios demostraron que la ingesta calórica influye directamente en la absorción de fósforo, reduciéndola en los animales sometidos a RC y, consecuentemente, disminuyendo el balance de fósforo respecto a los animales que se alimentaron con una ingesta calórica normal. Esto concuerda con estudios previos en los

que se demostró que el incremento de la concentración de grasa en la dieta favorece la digestibilidad del fósforo, favoreciendo su absorción (Frommelt et al., 2014; Raya et al., 2016; Kawamoto et al., 2020). Se ha demostrado que las grasas también reducen la absorción intestinal de calcio (Agnew y Holdsworth, 1971) y, de hecho, la influencia de las grasas de la dieta sobre la absorción intestinal de fósforo parece ser secundaria a la formación de jabones de calcio en la luz intestinal. La captura de calcio en estas estructuras disminuye la generación de complejos insolubles calcio-fósforo, lo que permite que más iones de fósforo se encuentren libres y puedan ser absorbidos (Frommelt et al., 2014). Otro mecanismo por el que las dietas ricas en grasas pueden favorecer la absorción intestinal de fósforo es promoviendo el transporte paracelular de fósforo, al aumentar la permeabilidad intestinal, y regulando al alza los transportadores de fósforo NaPi2b y Pit1 en el intestino delgado (Kawamoto et al., 2020) (Figura 35).

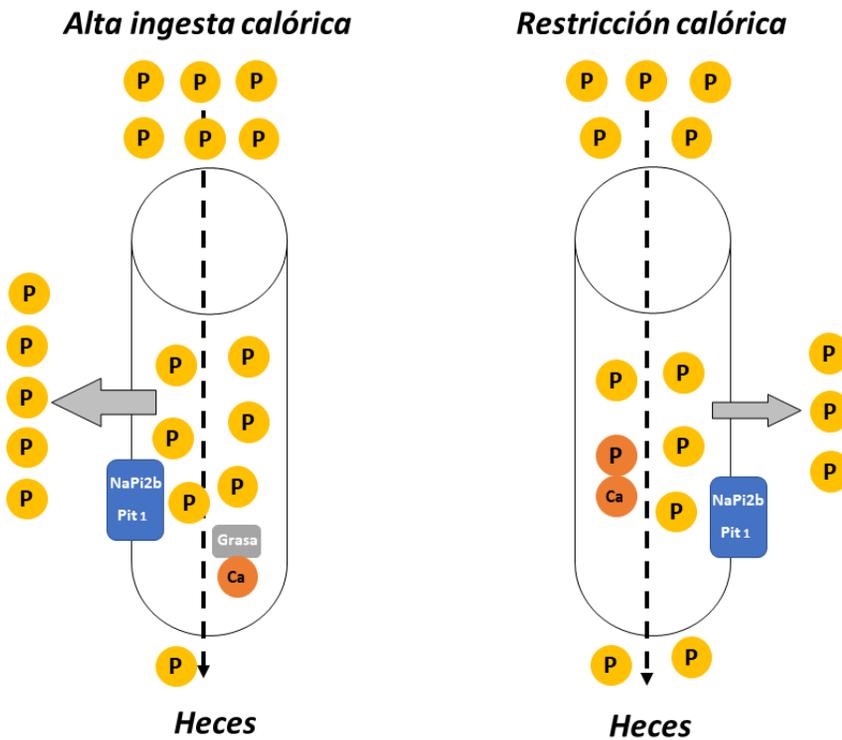


Figura 35. Influencia del contenido calórico de los alimentos en la absorción intestinal de fósforo. Los alimentos ricos en calorías (izquierda) generalmente tienen un contenido de fósforo más alto que los alimentos menos calóricos (derecha). La absorción intestinal de fósforo es más eficiente en alimentos ricos en calorías, mientras que la restricción calórica tiende a disminuir la absorción y las concentraciones plasmáticas de fósforo. Ca, calcio; P, fósforo; NaPi2b, transportador de fósforo sodio-dependiente tipo II; Pit1, transportador de fósforo sodio-dependiente tipo III.

1.3. Efecto de la ingesta calórica sobre el FGF23

Los resultados de estos estudios confirman lo que otros autores ya reportaron previamente, la ingesta de dietas altamente calóricas incrementa las concentraciones plasmáticas de FGF23 (Raya et al., 2016; Rios et al., 2018). Se sabe que las grasas pueden desencadenar daño renal (Wickman et al., 2013) y que una lesión renal aguda es suficiente para estimular la producción de FGF23 independientemente de los niveles de fósforo (Christov et al., 2013). Por otro lado, las dietas altas en grasa también promueven la inflamación sistémica

(Poret et al., 2018), lo que de forma indirecta también elevaría los valores de FGF23 (Hanks et al., 2015). En este mismo contexto, el incremento de TNF-alfa, citoquina inflamatoria de fase aguda (por sus siglas en inglés de: factor de necrosis tumoral alfa), se ha asociado con el aumento de FGF23 en roedores alimentados con dietas con alto contenido de grasa (Glosse et al., 2018; Rios et al., 2018). Todo ello nos sitúa en un complejo escenario que dificulta la interpretación de los resultados a la hora de relacionar los efectos de la ingesta calórica sobre el FGF23.

Con el fin de aclarar la existencia de una relación directa entre energía y FGF23, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en los que un grupo de ratas se alimentó con un régimen de RC. Para ello se establecieron dos protocolos dietéticos diferentes: alimentación con una dieta formulada con un contenido en grasa muy bajo (Estudio 1) o una restricción del 30% sobre la cantidad de alimento ofrecido diariamente (Estudio 2). Esto nos permitió estudiar no sólo los efectos de la ingesta calórica sobre el FGF23, sino también si estos efectos eran dependientes del contenido de grasa o de la densidad energética de la dieta.

El FGF23 se encuentra fuertemente regulado por la concentración plasmática de fósforo, incrementándose en casos de hiperfosfatemia y reduciéndose a medida que el fósforo plasmático se normaliza. Resulta interesante enfatizar que, aunque los animales que se alimentaron con una dieta hC redujeron los niveles plasmáticos de fósforo respecto a las ratas controles,

también lo hicieron aquellos animales alimentados con dietas altas en grasas. Sin embargo, el comportamiento en cuanto a síntesis y producción de FGF23 resultó ser opuesta puesto que FGF23 disminuyó en las ratas con dieta hC y aumentó en las alimentadas con dieta rica en grasa. La disminución en los valores de fósforo acompañada con un descenso en el FGF23 en plasma, también se observó en los animales del grupo NCR del Estudio 2. El hecho de que esta reducción se encontrase en ambos protocolos dietéticos, refuerza la hipótesis de que el FGF23 se encuentra regulado directamente por la ingesta calórica. Además, los estudios de correlación demostraron una fuerte asociación positiva entre la energía metabolizable ingerida por los animales a través de la dieta y su concentración plasmática de FGF23. Por tanto, la modulación del FGF23 observada en los estudios de RC sucedió de forma independiente a los cambios en las concentraciones plasmáticas de fósforo.

La ingesta de fósforo es otro de los grandes pilares en la modulación del FGF23. Aunque es bien conocido que un aumento de la ingesta de fósforo actúa como estímulo en las células óseas para la síntesis FGF23 (Ferrari et al., 2005), es poco probable que el fósforo ingerido en los animales de los estudios metabólicos presentados en este trabajo haya ejercido un papel regulador sobre el FGF23, probablemente porque su efecto se ha visto modulado por la ingesta calórica. Si analizamos los resultados de este mismo estudio comprobamos que, de hecho, las ratas alimentadas con una dieta hC tuvieron una ingesta de fósforo mucho mayor que aquellas alimentadas con una dieta control o

hipercalórica. Teniendo en cuenta que el valor de FGF23 se encuentra disminuido en este grupo, parece razonable pensar que, efectivamente, la modulación del FGF23 por la ingesta calórica no corresponde a una acción indirecta mediada por el fósforo ingerido. Además, a la vista de los resultados del Estudio 2 (véase Tabla 6), en el que las ratas con acceso restringido al alimento mantuvieron niveles de FGF23 disminuidos a pesar de ingerir la misma cantidad de fósforo, se puede confirmar que la ingesta calórica prevalece sobre la ingesta de fósforo en la regulación de FGF23.

1.4. Efecto de la RC sobre la vitamina D

Además del fósforo, el calcitriol es otro de los parámetros que influyen en la producción de FGF23, estimulando su síntesis (Masuyama et al., 2006). A su vez, ambos se encuentran involucrados en un sistema de retroalimentación negativa de forma que el incremento de FGF23 también inhibe la síntesis de calcitriol (Shimada et al., 2004). Los resultados observados en nuestros estudios muestran un incremento del calcitriol plasmático al reducir la ingesta energética, independientemente de la pauta dietética seguida para inducir la RC, y viceversa, el incremento de la densidad energética de la dieta disminuyó los niveles plasmáticos de calcitriol.

La relación entre ingesta calórica y vitamina D no está bien documentada y la mayoría de los datos disponibles que relacionan la vitamina D con el peso

corporal están, generalmente, referidos a los niveles de calcidiol. La deficiencia de vitamina D se ha descrito en diferentes patologías, entre ellas la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (Forouhi et al., 2008; Kayaniyil et al., 2010; Kabadi et al., 2012; Vimalaswaran et al., 2013). Además, la obesidad ha demostrado reducir la biodisponibilidad de la vitamina D (Wortsman et al., 2000).

Los estudios experimentales avalan los datos de los estudios en humanos. Se ha reportado que la alimentación con una dieta hipercalórica en ratas resultó en una disminución del calcitriol plasmático incluso en animales que no desarrollaron obesidad (Raya et al., 2016; Rios et al., 2018), lo que se corresponde con los resultados obtenidos en el Estudio 1. La influencia de la grasa de la dieta en la absorción intestinal de vitamina D es algo controvertida, aunque se ha reportado que las dietas con alto contenido de grasa pueden aumentar la absorción de vitamina D (Dawson-Hughes et al., 2015). Teniendo en cuenta que los datos de nuestros estudios muestran una relación completamente opuesta, parece poco probable que la absorción de vitamina D se encontrase alterada a consecuencia del contenido de grasa de la dieta. Además, otros autores ya encontraron que, a pesar de los cambios en el calcitriol, las concentraciones plasmáticas de calcidiol no se modificaron tras una alimentación con dietas altas en grasas (Raya et al., 2016). Esto mismo encontramos en las ratas alimentadas con una dieta baja en grasas (ver Figura

33a, Estudio 4), por lo que las diferencias en el calcitriol plasmático no pueden atribuirse a cambios en la absorción de la vitamina D.

Además, los resultados demuestran que, al igual que el fósforo, el calcitriol tampoco es el responsable de la modulación del FGF23 por la ingesta calórica. De hecho, se encontró una fuerte correlación inversa entre estos dos parámetros, lo que hace pensar que los cambios en el calcitriol fueron secundarios a las variaciones en la producción de FGF23 y no al contrario. La vitamina D tiene importantes repercusiones sobre la salud renal y cardiovascular (Kaur et al., 2018; Disthabanchong y Srisuwarn, 2019), ósea (Schoor et al., 2008) y también muscular (Książek et al., 2019), por lo que la regulación indirecta del calcitriol mediada por FGF23 es de gran relevancia en el estudio de la fisiopatología de estas enfermedades, ya que integra componentes clave para el desarrollo de patologías asociadas tanto a metabolismo energético como mineral (Figura 36).

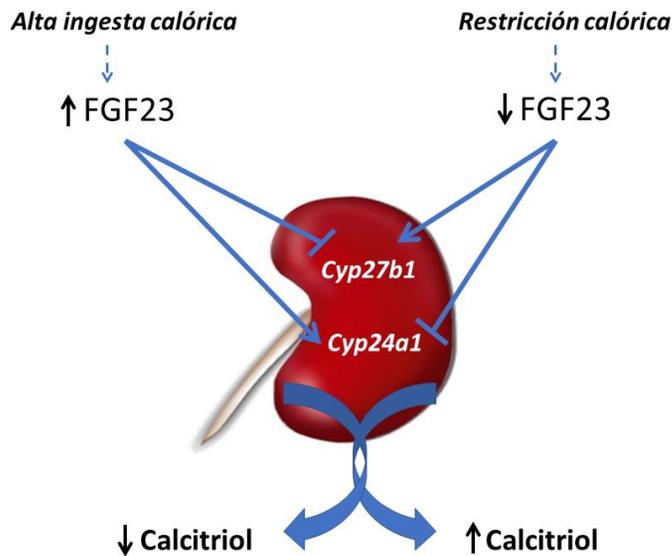


Figura 36. Regulación del calcitriol por el contenido calórico de la dieta secundaria a cambios en el FGF23. El aumento del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) observado tras la ingesta de alimentos ricos en calorías regula a la baja la enzima 1-alfa-hidroxilasa, Cyp27b1 (síntesis de calcitriol) y al alza la enzima 24-hidroxilasa, Cyp24a1 (degradación de calcitriol), lo que conduce a una disminución de las concentraciones de calcitriol. Por el contrario, la disminución de FGF23 tras la restricción calórica aumenta Cyp27b1 y disminuye Cyp24a1, lo que da como resultado un incremento de las concentraciones de calcitriol.

1.5. Modulación del FGF23 por la ingesta calórica: mecanismos moleculares

El mecanismo por el cual el contenido energético de la dieta puede modular el FGF23 es una cuestión aún en investigación. Para profundizar en el ello, se llevaron a cabo estudios *in vitro* en los que se investigó el efecto de la disponibilidad energética sobre la expresión génica de FGF23 en células óseas. Las células UMR106 cultivadas en un medio HG expresaron consistentemente más ARNm de FGF23 que las células cultivadas en medio LG. Es importante señalar que, aunque la disponibilidad de energía fue limitada en el medio LG,

no se encontraron grandes diferencias en el ritmo de crecimiento celular. De hecho, el tiempo para alcanzar la confluencia no fue significativamente diferente entre ambos grupos (HG, $120,0 \pm 0,5$ horas; LG, $127,6 \pm 4,6$ horas), por lo que, presumiblemente, las células cultivadas en LG pudieron mantener sus procesos fisiológicos normalmente. Esto se pudo confirmar con el análisis de otros genes osteogénicos que no se vieron afectados por el contenido de glucosa en el medio. Los resultados de estos estudios revelaron que sólo el FGF23 se vio afectado por la disponibilidad energética.

Dado que la concentración de glucosa en el medio modifica la osmolalidad del mismo, siendo más alta en el medio HG que en el LG, y teniendo en cuenta la existencia de datos que respaldan la influencia de la osmolalidad en la biología de las células óseas (Botolin et al., 2006), se realizaron experimentos adicionales añadiendo manitol al medio LG hasta alcanzar la misma osmolalidad del medio HG. En estos estudios, las células cultivadas en LG y manitol también expresaron niveles más bajos de FGF23 que las células cultivadas en HG, por lo que la hipótesis de que la disminución de FGF23 se debiera a un efecto colateral debido al cambio de osmolaridad en vez de al contenido energético, fue descartada.

Si bien en los experimentos *in vitro* se utilizó la glucosa como sustrato determinante de la disponibilidad energética, es interesante recordar que la concentración de glucosa en sangre en los experimentos *in vivo* no tuvo una correlación directa con la ingesta calórica. Por tanto, el factor desencadenante

de los cambios de FGF23 parece ser la disponibilidad de nutrientes liderada por el contenido energético y no por la concentración de glucosa *per se*. La ausencia de cambio en la expresión de FGF23 cuando las células fueron cultivadas en LG durante un periodo de tiempo breve o fueron expuestas a un medio MG, sustenta la afirmación de que la modulación del FGF23 responde a una reducción importante en la disponibilidad energética y dependiente del tiempo de exposición.

La interrelación entre metabolismo del fósforo y energía también se estudió en cultivos celulares. Como cabía esperar, las células incubadas en HG y expuestas a concentraciones elevadas de fósforo, incrementaron la expresión de FGF23. Sin embargo, cuando las células se incubaron en LG, el fósforo no actuó como estimulante del FGF23, incluso cuando las concentraciones de fósforo en el medio se cuadruplicaron respecto al control. Estos datos están en línea con estudios previos que han reportado que la restricción de fósforo en la dieta no previene el aumento de FGF23 asociado a una alta ingesta calórica (Rios et al., 2018). Aunando estos datos con los obtenidos en los experimentos *in vivo*, podríamos conjeturar sobre una regulación preferencial del FGF23 mediado por la disponibilidad energética más que por el fósforo.

Seguidamente, se exploraron mecanismos moleculares por los cuales la energía pudiera estar modulando su síntesis de forma directa. Recientemente se ha demostrado que la activación de AMPK disminuye la expresión de FGF23 *in vitro* y que este efecto es consecuencia de la inhibición de Orail implicando

a SOCE en este mecanismo (Glosse et al., 2018). Por otra parte, Bar y colaboradores reportaron que la insulina suprime la producción de FGF23 a través de la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) y mediante la inhibición del factor de transcripción FOXO1 (de sus siglas en inglés, *forkhead box O1*) (Bär et al., 2018). No obstante, estos mecanismos se antojan contradictorios dado que se sabe que la insulina inhibe la actividad de AMPK (Valentine et al., 2014). En este punto, decidimos investigar otra importante vía de señalización, mTOR y comprobar si, al igual que AMPK y la vía de la insulina, también se encuentra implicada en los cambios de FGF23. La elección de esta vía se fundamenta en que se ha demostrado que la inhibición de mTOR mimetiza la RC (Cavanagh et al., 2015).

La proteína mTOR se compone de dos complejos, mTORC1 y mTORC2, aunque sólo mTORC1 se ve afectado por la acción inhibitoria de la rapamicina. Asimismo, mTORC1 también se inhibe por la privación de energía siendo un objetivo diana en la acción de AMPK (Xu, J. et al., 2012). Además, la vía de mTOR ha demostrado estar involucrada en la activación de SOCE, de forma que la inhibición de la vía mTOR por rapamicina suprime STIM1, una proteína necesaria para la activación de este (Peng et al., 2013). También, en un estudio realizado en ratones, Kempe y colaboradores demostraron que los animales tratados con rapamicina incrementaron la excreción urinaria de fósforo, pero este efecto se produjo a pesar de encontrarse una disminución en las concentraciones de FGF23 (Kempe et al., 2010).

Los resultados de los estudios con UMR106, demostraron que la incubación de las células con rapamicina reducía la expresión de FGF23 y que este efecto seguía un comportamiento dosis-dependiente. Confirmamos la implicación de la vía mTOR mediante la realización de estudios en los cuales se sustituyó la rapamicina por everolimus como inhibidor de mTOR. En ellos encontramos que, al igual que en los experimentos con rapamicina, la expresión de ARNm de FGF23 se encontraba disminuido en las células cultivadas con everolimus. Además, la confirmación de la disminución en la expresión de STIM1 en las células tratadas tanto con rapamicina como con everolimus refuerza el papel de mTOR en la regulación de FGF23. Esto es, tanto AMPK, a través de Orai1, como mTOR, a través de STMI1, modulan la actividad de SOCE interviniendo directamente en la síntesis de FGF23.

A la vista de estos datos se propone que la conexión entre energía y FGF23 responde a un mecanismo molecular cuya pieza central la ocupa mTOR. Tanto la AMPK como la rapamicina tienen un efecto inhibitor sobre mTOR, pero el hecho de que la rapamicina por sí misma sea capaz de disminuir la producción de FGF23 ayuda a armonizar la información previamente reportada por otros autores. Así, tanto la señalización de insulina como la supresión de mTOR pueden actuar inhibiendo FOXO1 (Abdelnour-Berchtold et al., 2010; Bär et al., 2013), mientras que la activación de la AMPK por la privación energética también resulta en la inhibición de mTOR. Todo ello, en última instancia, resulta en la disminución de los niveles de FGF23 (Figura 37). No obstante,

cabe mencionar un artículo reciente, y posterior a la publicación de los datos de esta Tesis, en el que los autores observaron que el tratamiento con rapamicina atenuó la disminución de FGF23 en osteocitos que tenían delecionada la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) delecionada (Kawai et al., 2021). PTEN es una molécula de acción antitumoral cuya inhibición ha demostrado estar involucrada en la activación de la vía de mTOR (Lee, Y.R. et al., 2018). Inicialmente, este hallazgo puede resultar contradictorio con los resultados de nuestros estudios. Sin embargo, el hecho de que el efecto de la inhibición de mTOR sobre el FGF23 difiera en función del tiempo podría dar explicación a estas discrepancias. Esto refuerza aún más la necesidad de profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en la modulación de FGF23 en función del estatus energético.

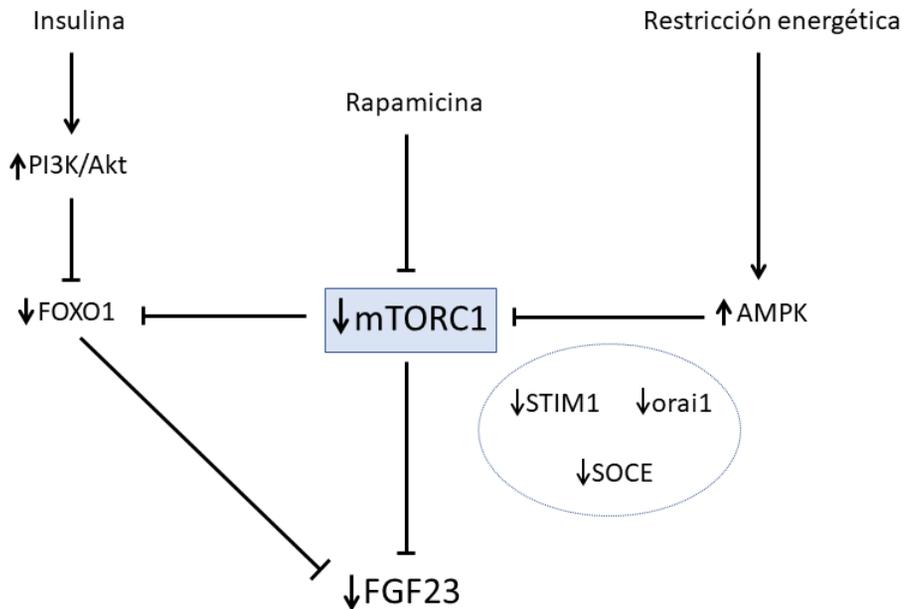


Figura 37. Representación esquemática de la propuesta mecánica por la cual el FGF23 se encuentra regulado por la ingesta calórica. La inhibición del complejo 1 de mTOR (mTORC1) de forma directa por rapamicina o indirectamente mediante inducción de restricción calórica y activación de la vía de la AMPK, conducen a una disminución de FGF23 implicando a SOCE mediante la inhibición de STIM1 u orai1. Por otro lado, la inhibición de FOXO1 también reduce el FGF23 bien mediante la inhibición de la vía mTOR o la activación de la vía PI3K/Akt a través de la acción de la insulina.

Si bien el modelo propuesto puede dar explicación a los mecanismos moleculares directos que pueden causar la modulación de FGF23 por la ingesta calórica, no se puede descartar que los cambios de FGF23 puedan responder también a una influencia indirecta a los cambios en Klotho renal. En publicaciones previas se ha demostrado que el aumento de la densidad energética de la dieta disminuye la expresión de Klotho renal, al mismo tiempo que incrementa los niveles plasmáticos de FGF23 (Raya et al., 2016). El papel del eje Klotho/FGF23 también ha sido objeto de estudio en investigaciones

sobre el desarrollo del conocido como síndrome del pie diabético, una complicación común en pacientes con diabetes *mellitus*. Estos autores demostraron que los pacientes afectados presentaban valores de Klotho soluble disminuidos, lo que se acompañó con un incremento de FGF23 (Donate-Correa et al., 2019). Además, la relación energía-Klotho también ha sido expuesta en un artículo reciente diseñado para caracterizar la expresión de la proteína Klotho cerebral durante el envejecimiento e investigar su comportamiento en función de la alimentación. Los autores de este estudio encontraron que los niveles proteicos de alfa-Klotho en el córtex prefrontal se redujeron en los animales alimentados con una dieta alta en grasa. En cambio, aquellas ratas a las que se les ofreció una dieta hC, incrementaron significativamente los valores de Klotho tanto en el córtex como en el hipocampo (Shafie et al., 2020). En los resultados de los estudios de esta Tesis, observamos un aumento significativo de los valores de Klotho, tanto a nivel de expresión génica como en la cuantificación proteica, tras la RC. Esto nos lleva a pensar que Klotho se encuentra también regulado, al menos en parte, por la ingesta calórica, aunque los mecanismos moleculares aún se desconocen. De forma hipotética, la disminución de Klotho en animales alimentados con una dieta con densidad energética elevada implicaría una resistencia a FGF23, lo que estimularía su producción para poder ejercer su efecto fosfatúrico; en el lado opuesto, el aumento de Klotho, tras una disminución en el consumo energético, actuaría

como señalización de una menor necesidad de FGF23, disminuyendo así la producción de este (Figura 38).

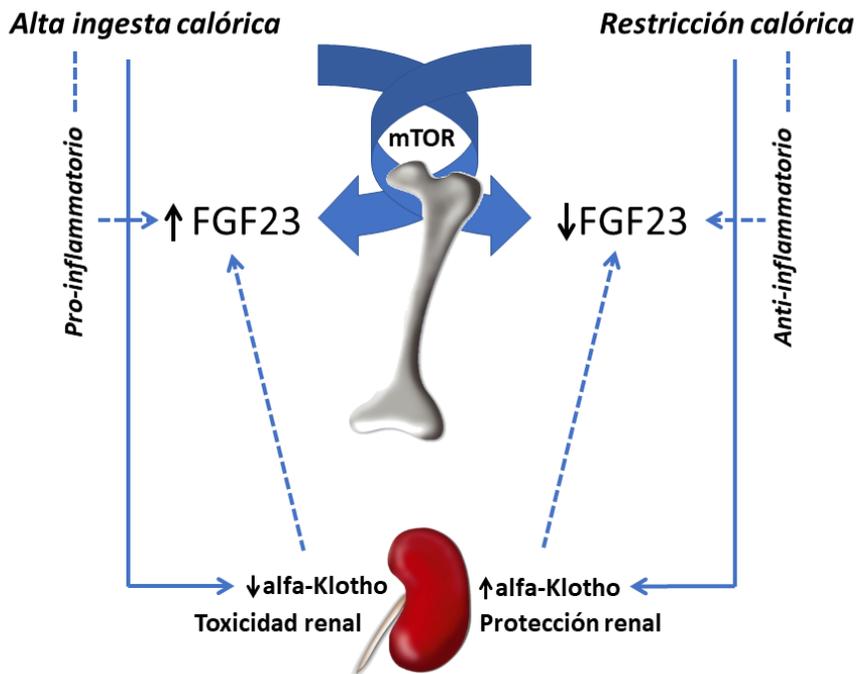


Figura 38. Regulación del FGF23 por el contenido calórico de la dieta. La elevada ingesta calórica incrementa los niveles de FGF23 mientras que la restricción calórica lo disminuye. Los mecanismos de regulación del FGF23 por la ingesta calórica incluyen un efecto directo sobre el hueso, mediado a través de la vía de señalización de mTOR, y mecanismos indirectos, a través de la regulación renal de alfa-Klotho. La acción inflamatoria o antiinflamatoria de una ingesta alta o baja en calorías también pueden actuar como mecanismos indirectos de regulación del FGF23. AMPK, *AMP-activated protein kinase*; FGF23, factor de crecimiento fibroblástico 23; FOXO1, *forkhead box O1*; PI3K/AKT, fosfatidilinositol-3-quinasa/quinasa B; SOCE, *store-operated calcium entry*; STIM1, molécula de interacción estromal 1

SECCIÓN 2. ENFERMEDAD RENAL Y CALCIFICACIÓN VASCULAR

El metabolismo mineral es objeto de estudio principal en investigaciones relacionadas con la enfermedad renal y alteraciones asociadas como el TMO y la CV. En esta sección se discutirán los datos obtenidos en los estudios realizados en animales con función renal disminuida (véase Estudio 3). El objetivo de estos experimentos fue investigar la influencia de la RC sobre el metabolismo de fósforo y las repercusiones de estos cambios en el desarrollo y resolución de la CV.

La CV es uno de los procesos más relevantes que suceden de forma secundaria a la progresión de la enfermedad renal, incrementando la mortalidad. Se ha demostrado que el aumento de FGF23 y la disminución de Klotho que acontece a consecuencia del deterioro renal son factores predisponentes para el desarrollo de CV (Lim et al., 2012; Navarro-González et al., 2014). Además, la disminución de la TFG en estos pacientes favorece el incremento del producto CaxP, lo que se traduce en el depósito de sales en las paredes arteriales (Zununi et al., 2020). En los procesos de RC, la restricción alimentaria implicaría no sólo una limitación en la ingesta calórica sino también en la del resto de nutrientes, entre ellos el fósforo. Debido al efecto nocivo del fósforo sobre la CV, la reducción de la ingesta de este mineral complicaría la interpretación de cualquier efecto protector observado tras la RC. Por tanto, para poder aislar el efecto de la energía sobre la CV, la

concentración mineral de las dietas se ajustó en función de la cantidad de comida ofrecida a los animales de forma que todos los animales consumieran la misma cantidad de fósforo, independientemente de su pertenencia al grupo control o al grupo RC.

Otro aspecto de especial interés en este estudio es el momento en que se instituye la RC. Si bien, inicialmente, se planteó el diseño experimental de forma que se pudiera investigar el efecto de la RC durante todo el periodo de pre-uremia, calcificación y regresión de la CV, la reducción voluntaria de la ingesta de alimento por los animales tras la inducción de la uremia obligó a abandonar este enfoque durante la fase de calcificación. Teniendo en cuenta que la RC se fijó en un consumo diario de 10 g de alimento y la ingesta de los animales fue inferior, parecía poco razonable restringir aún más el acceso a los alimentos tras la nefrectomía, ya que no se podrían asegurar las necesidades nutricionales básicas de los animales.

Como se expuso en la sección anterior, la RC en ratas sanas redujo de forma significativa las concentraciones plasmáticas de fósforo, mostrando una tendencia a disminuir el balance de fósforo, efectos que, teóricamente, deberían proteger frente a la CV (Villa-Bellosta et al., 2011; Yamada y Giachelli, 2017). Por otro lado, el aumento FGF23 se asocia con morbilidad y mortalidad cardiovascular (Kestenbaum et al., 2014; Scialla et al., 2014; Panwar et al., 2015), y las ratas con RC también mostraron, consistentemente, valores reducidos de FGF23, lo que además se acompañó de un incremento de Klotho

en estas mismas ratas. La RC también indujo cambios beneficiosos en el metabolismo energético consistentes con la evidencia existente (Park, S.Y. et al., 2005; Chen, J.H. et al., 2015). Todos estos cambios, tanto en el metabolismo energético como mineral, tras la RC se oponen a los efectos reportados anteriormente en estudios experimentales realizados en ratas alimentadas con dietas altas grasas y que desarrollaron CV severa (Perarlta-Ramírez et al., 2014; Rios et al., 2017). Por tanto, si estos resultados se replicaran en las ratas con función renal disminuida, podríamos concluir que la RC es un factor potencialmente protector contra la CV (Figura 39). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que, a pesar de que la RC desencadenó efectos en la modulación de los parámetros tanto del metabolismo energético como del metabolismo del fósforo que podrían actuar como protectores frente al desarrollo de CV en ratas urémicas, la reducción de la ingesta no previno de la aparición de CV e, incluso, incrementó la mortalidad de estos animales.

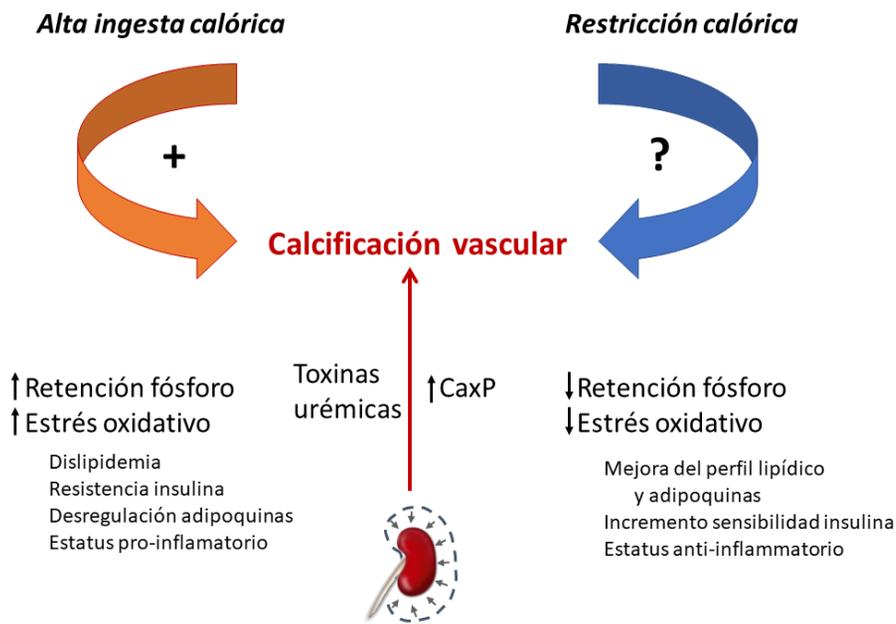


Figura 39. Factores que influyen sobre el desarrollo de la calcificación vascular. La enfermedad renal crónica conduce a la calcificación vascular debido al aumento del producto calcio-fósforo (CaxP) y al acúmulo de toxinas urémicas. La alimentación con alimentos altamente calóricos potencia la calcificación vascular mediante mecanismos que incluyen la retención de fósforo y el aumento del estrés oxidativo. Aunque la restricción de calorías produce cambios metabólicos opuestos a los provocados por una ingesta calórica elevada, los estudios experimentales no han logrado demostrar un efecto protector de la restricción calórica sobre la calcificación vascular.

2.1. Efecto de la RC en el desarrollo de calcificaciones urémicas

Para testar la hipótesis del valor protector de la RC frente al desarrollo de calcificaciones, los experimentos de CV se diseñaron con el objetivo de estudiar este efecto en dos escenarios: a) inducción de CV con un protocolo estándar, consistente en la disminución de la función renal mediante Nx 5/6 y alimentación de los animales con una dieta alta en fósforo (1,2% de fósforo) y b) inducción de CV severa, en cuyo caso el incremento del fósforo dietético se estableció en 1,8%. Como era de esperar, los estudios histológicos en tejido

aórtico mostraron una gran cantidad de depósitos de calcio en ambos casos, independientemente de si los animales tuvieron o no RC. Aunque no encontramos diferencias entre grupos según el contenido de fósforo de la dieta, esto pudo deberse a que el alto grado de calcificación encontrado ya en ratas alimentadas con 1,2%, el cual quizás alcanzó el umbral de supervivencia de los animales calcificados de forma que a partir de este punto el grado de calcificación fue incompatible con la vida y los animales comenzaban a morir. Según esta hipótesis, los animales que continuaron hasta el final del estudio en los grupos de 1,8% de fósforo serían aquellos que calcificaron menos. Esto se encuentra respaldado por el hecho de que en estos grupos la mortalidad fue mayor que aquellos con una concentración de 1,2%.

Sabemos que el incremento de fósforo plasmático en pacientes renales contribuye a la progresión de la enfermedad y aumenta el índice de mortalidad entre estos pacientes (Kenstenbaum et al., 2016). También que el incremento de fósforo unido al aumento de FGF23 y a la disminución de Klotho favorecen la CV en los pacientes urémicos (Lim et al., 2012; Vogt et al., 2019). En estos experimentos observamos que las ratas con una mayor ingesta de fósforo (1,8%) también presentaron tendencia a incrementar los valores plasmáticos de este mineral, que se acompañó de unos valores plasmáticos de FGF23 mucho más elevados que los grupos alimentados con una dieta NC1,2, a pesar de que estos últimos ya tenían valores extremadamente altos como consecuencia del deterioro renal. El mayor daño renal en estos grupos también se observó en la

drástica disminución en la expresión tisular de Klotho. De nuevo esto es un reflejo del efecto perjudicial del fósforo en la progresión de la enfermedad renal.

No obstante, resultó interesante observar que la RC no actuó como protector frente a la CV e incluso incrementó la mortalidad, a pesar de que los cambios metabólicos producidos en fases previas a la instauración de la uremia (cuando los animales fueron sometidos o no a RC) debieran ser favorecedores para disminuir de las calcificaciones extraesqueléticas en estos animales. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros bioquímicos ni tampoco en la expresión de Klotho cuando se compararon animales que fueron sometidos a RC con aquellos que tuvieron una ingesta normal de calorías, tanto en los grupos con NC1,2 como en aquellos con NC1,8. El FGF23 tendió a disminuir en ambos casos con la RC; sin embargo, sólo resultó ser significativamente inferior respecto a su homólogo, en el grupo RC de 1,8% de fósforo. Todo ello nos indica que el deterioro renal sucedido en todos los grupos de estudio enmascaró cualquier poder de protección que la RC pudiera ejercer en la normalización de los parámetros renales.

La mortalidad es uno de los factores a tener en cuenta en los experimentos diseñados para el estudio de CV en animales urémicos. Sin embargo, los resultados prometedores de la RC sobre los cambios en el metabolismo energético y mineral en ratas sanas fue un argumento importante para diseñar un experimento ambicioso con el fin de asegurar el desarrollo de

calcificaciones. En el curso del estudio, algunas ratas murieron y otras tuvieron que ser sacrificadas por razones humanitarias antes de la finalización de los experimentos. Se establecieron como criterios de punto y final la anorexia y la depresión de los animales de tal forma que podemos asegurar que los animales que fueron sacrificados habrían contado igualmente como bajas de haber continuado con el experimento. En cualquier caso, el análisis de supervivencia de estos estudios se realizó con ambos enfoques: contabilizando únicamente aquellas ratas que murieron de forma natural o incluyendo también a las que tuvieron que ser sacrificadas anticipadamente; y los resultados fueron similares, con un incremento significativo de la mortalidad en los grupos con una dieta 1,8% de fósforo y aún mayor si los animales se sometieron a RC.

Del mismo modo que el aumento de la mortalidad acompañado de un incremento de la ingesta de fósforo responde a un comportamiento lógico, el hecho de que la RC incrementase la mortalidad de los animales resulta más complejo de explicar. Quizás asumir que alimentación con RC y alimentación con dieta hipercalórica debieran tener efectos contrapuesto no está del todo justificado y puede contribuir a la explicación de los resultados encontrados en estos estudios. De hecho, hay publicaciones que respaldan que estos dos protocolos dietéticos no sólo no son opuestos, sino que, en algunos parámetros fisiológicos, pueden tener efectos similares. Prueba de ello es el trabajo de Cunha y colaboradores en el que demuestran que la alimentación de las ratas gestantes con cualquiera de las dos pautas (baja o alta ingesta calórica)

modulan del mismo modo el peso al nacimiento o la actividad física de la descendencia cuando llegan a su etapa adulta (Cunha et al., 2015). También, hay otros factores que pudieron enmascarar los beneficios previsibles de la RC sobre el desarrollo de calcificaciones como la modificación de la producción de componentes protectores de calcificación, como es el ejemplo de la fetuína A. La fetuína A es una proteína perteneciente a la familiar de las alfa globulinas sintetizada en el hígado y cuya función se centra en favorecer la solubilidad del calcio mediante la formación de partículas conocidas como calciproteínas (complejos formados por la unión de calcio, fosfatos y fetuína A) (Brylka y Jahnen-Dechent, 2013). Esta proteína se ha demostrado que está involucrada en el desarrollo de la CV ejerciendo como protectora de la misma (Westenfeld et al., 2009) y su disminución se ha encontrado tanto en roedores como en humanos tras un periodo de alimentación con RC (Choi et al., 2013). El magnesio, otro de los minerales importantes en la ERC, también ha demostrado tener efectos beneficiosos, pues mejora el control glucémico (Toprak et al., 2017) y protege contra la CV (Diaz-Tocados et al., 2017; Rodelo-Haad et al., 2020). El hecho de que la RC disminuya la absorción de fósforo permite pensar que la absorción de otros minerales como el magnesio puedan también verse afectadas y con ello su poder protector frente a la CV.

Por otro lado, es importante recordar el fenómeno conocido como la “paradoja de la obesidad en la enfermedad renal”. Este fenómeno se fundamenta en la evidencia de que la pérdida de peso no sólo es perjudicial

para la progresión de la enfermedad renal, sino que el sobrepeso puede, incluso, ser beneficioso en estos pacientes. Esto se ha constatado al encontrarse que la mortalidad en pacientes con ERC es inversamente proporcional al peso corporal y al índice de masa corporal (IMC) (Ahmadi et al., 2016; Kalantar-Zadeh et al., 2017).

Los pacientes con enfermedad renal comienzan a perder peso en las etapas tempranas de la enfermedad y esta pérdida de peso se asocia con un mal pronóstico (Ku et al., 2018). Inicialmente, los pacientes se ven afectados por la desnutrición caracterizada por la pérdida de grasa corporal, aunque preservan la masa corporal magra, pero a medida que avanza la enfermedad, los pacientes pueden desarrollar caquexia, afectando al tejido muscular, y desarrollar otras alteraciones metabólicas como anorexia o incremento del gasto energético basal (Mak y Cheung, 2006). Las ratas del estudio de calcificación sometidas a RC no se pueden considerar caquéticas o desnutridas ya que estas ratas eran metabólicamente saludables y mantenían concentraciones de albúmina plasmática dentro del rango normal. Además, se ha propuesto que la caquexia asociada a la enfermedad renal es un proceso mediado por los altos niveles de leptina, postulándose que antagonizar la señalización de esta hormona podría ser un tratamiento plausible contra la caquexia renal (Mak et al., 2014). Teniendo en cuenta que las ratas del estudio tenían concentraciones de leptina en plasma significativamente menores cuando fueron alimentadas con RC en comparación con las que tuvieron una ingesta calórica normal, la leptina no

parece ser la responsable de la mortalidad de estos animales. Además, como se ha comentado, la anorexia se utilizó como criterio de eutanasia y los análisis de supervivencia arrojaron resultados similares independientemente de si se incluyeron o no a los animales anoréxicos en el estudio.

Es importante remarcar que la pérdida de peso observada en las ratas RC del estudio se corresponde con la etapa pre-CV, por lo que el argumento de que la enfermedad renal desencadena caquexia, anorexia y, en fin último, mortalidad, no es del todo aplicable en este caso ya que nos enfrentamos a una situación diferente en la que la pérdida de peso no sucede durante la progresión de la enfermedad sino que, en el momento de instaurarse la uremia, los animales sometidos a RC ya tienen un peso menor que aquellos sin restricción.

Retomando de nuevo la paradoja de la obesidad, en los animales con RC observamos una disminución en las concentraciones plasmáticas de lípidos. Esto sucedió tanto en ratas sanas, como se comentó en la Sección 1, como en ratas urémicas. Aunque este efecto se consideraría beneficioso en un contexto de obesidad en un individuo con función renal normal, pues significaría la tendencia a la normalización de las concentraciones de lípidos en sangre, esto podría tener efectos nocivos en aquellos urémicos, pues se ha descrito la existencia de una correlación inversa entre la concentración lipídica en plasma y la mortalidad en pacientes con enfermedad renal (Kovesdy et al., 2007), lo que está en la misma línea de la asociación referente al peso corporal previamente comentado. Sin embargo, esto es un tema controvertido, pues,

aunque los depósitos de grasa pueden prevenir la emaciación de los pacientes renales, la grasa puede actuar secuestrando toxinas que serían liberadas al torrente sanguíneo cuando estos individuos pierden peso. Esta cuestión es de especial relevancia en pacientes sometidos a hemodiálisis, cuando la progresión de la enfermedad se encuentra en fases de pérdida acelerada de peso corporal, aumentando la mortalidad en los pacientes más delgados (Sepeakman y Westerterp, 2010).

Al igual que la ingesta de fósforo es un claro punto de control terapéutico en la enfermedad renal y su restricción permite retrasar su progresión, la RC parece ser también perjudicial para estos pacientes. Fósforo y energía son dos elementos que, en el curso del presente trabajo hemos comprobado que están claramente conectados. Ambos comparten funciones metabólicas beneficiosas como favorecer la termogénesis mediante la conversión de tejido adiposo blanco en marrón (Abuduli et al., 2016; Fabbiano et al., 2016). Sin embargo, en el contexto de la enfermedad renal, este efecto beneficioso en animales sanos, se torna nocivo al ayudar a reducir el peso corporal de animales urémicos facilitando el desarrollo de caquexia renal (Wang, S.Y. et al., 2018).

Todo ello conduce a pensar que, a pesar de que los animales con RC presentaban un perfil metabólico más saludable que aquellos que se alimentaron con una ingesta calórica normal, el menor peso de estos animales les confiere mayor fragilidad para afrontar una lesión renal posterior. Esto se

ve respaldado por la correlación inversa encontrada entre el peso corporal al inicio de la CV y la supervivencia durante el periodo de uremia y calcificación.

2.2. Efecto de la RC en la regresión de calcificaciones urémicas

En publicaciones anteriores ya se ha reportado que las calcificaciones en las arterias pueden revertirse si se controlan los estímulos pro-calcificantes (Bas et al., 2006); incluso se han propuesto algunas opciones como que pueden actuar como agentes terapéuticos durante la CV, entre ellos se ha demostrado que los calcimiméticos o el magnesio aceleran la regresión de las calcificaciones extraesqueléticas asociadas a la uremia (Lopez et al., 2009; Diaz-Tocados et al., 2017).

Como hemos observado en los estudios realizados a lo largo de esta Tesis, la RC modula el metabolismo del fósforo en un sentido que podría favorecer la resolución de la CV, pues se sabe que un factor importante para lograr la regresión de la calcificación es precisamente normalizar los parámetros relacionados con el fósforo (Bas et al., 2006). Aunque se ha expuesto en el epígrafe inmediatamente anterior que no se encontraron efectos beneficiosos notables de la RC como protector frente al desarrollo de calcificaciones, se desconoce si la aplicación de la RC pudiera favorecer su regresión.

En ambos grupos del estudio de regresión encontramos que el cese del tratamiento con calcitriol junto con el control de la ingesta de fósforo resultó en

el incremento de los niveles de calcio y la normalización de los niveles de fósforo en plasma. Además, también se observó una reducción en los valores bioquímicos renales (urea y creatinina). Estos datos son indicativos de la mejora de la función renal asociada a la normalización del fósforo y la disminución de nefrocalcinosis. La disminución de calcio es una de las alteraciones del metabolismo mineral características de la enfermedad renal. Debido a una disminución de calcitriol a causa del deterioro de la funcionalidad renal, la absorción intestinal de calcio se reduce, lo que a su vez conlleva el incremento de PTH observado en pacientes urémicos (Viegas et al., 2019). El incremento de la calcemia en la fase de regresión de CV probablemente sea consecuencia de la intervención de dos mecanismos: por un lado, la mejora a la respuesta de la PTH gracias a la reducción de los niveles de fósforo en sangre (Rodriguez et al., 1991; Silver y Naveh-Many, 2009); y, en segundo lugar, la reabsorción del calcio depositado en el organismo durante el periodo de inducción (Bas et al., 2006; Diaz-Tocados et al., 2017). En la misma línea de los resultados observados en la fase de CV, la RC no supuso una mejora durante el proceso de regresión. Aunque, de nuevo, se observó una tendencia a la disminución de los niveles plasmáticos tanto de fósforo como de FGF23 en ratas con RC, así como un aumento de la expresión renal de Klotho, no se encontraron diferencias significativas en estos parámetros entre los animales sometidos a restricción y aquellos que tuvieron una ingesta normal de calorías durante la regresión. Del mismo modo, el contenido de calcio aórtico y

los estudios histológicos mostraron que la RC no aportó ningún beneficio adicional a la resolución de la CV.

SECCIÓN 3. METABOLISMO MINERAL Y COMPOSICIÓN MUSCULAR

Durante el desarrollo de la presente Tesis se diseñó un estudio encaminado a investigar los cambios fenotípicos acaecidos en el músculo esquelético como consecuencia de una alimentación a largo plazo en régimen de RC, así como la influencia de la vitamina D en estos cambios.

Nuestros resultados demostraron que, aunque la RC supuso un retraso en el crecimiento de los músculos posturales (sóleo) con una disminución en su volumen, el ISM, por el contrario, se incrementó. Además, en los músculos fásicos (tibial craneal) se observó un cambio hacia un fenotipo de contracción más lenta. En ambos casos, se encontró una fuerte relación entre las fluctuaciones de calcitriol plasmático y los cambios musculares, tanto en la composición fibrilar como en la masa muscular de las ratas alimentadas con RC.

3.1. Efecto de la RC sobre la masa muscular

Puesto que la proteína es un macronutriente esencial para asegurar el buen desarrollo y función muscular (Prescod et al., 2011; Agarwal et al., 2013), en el estudio llevado a cabo en este trabajo, el régimen de RC se basó en la reducción del contenido energético de la dieta suministrada a las ratas, asegurando un consumo proteico que al menos igualase al de los animales

alimentados *ad libitum*. De esta forma conseguimos aislar el efecto de la ingesta calórica sobre el músculo esquelético. Como consecuencia del bajo contenido calórico de la dieta, las ratas con dieta hC adoptaron un comportamiento de sobrealimentación. Esto supuso que las ratas del grupo hC no sólo no consumieron menor cantidad de proteínas, sino que incrementaron ligeramente la ingesta total de este nutriente respecto a las ratas controles, 798 g vs 670 g ($p < 0,05$). Teniendo en cuenta que estudios anteriores demuestran que la ingesta de proteínas de alta calidad es un factor importante para la adecuada síntesis proteica muscular y la prevención de la pérdida de masa muscular asociada a la edad (Walrand et al., 2011), que nuestros animales con dieta hC consumieran mayor cantidad de proteína pudo influir en el efecto anti-catabólico observado en los músculos de estos animales.

Los efectos de la RC sobre el músculo esquelético son aún controvertidos. Si bien hay publicaciones en las que se ha reportado que la RC reduce el tamaño muscular, hay evidencia de que esto no ocurre así en todos los músculos (McKiernan et al., 2004; Chomentowski et al., 2009; Boldrin et al., 2017; Lu et al., 2017; Hoek et al., 2019). Los resultados de nuestro estudio concuerdan con esta afirmación. Así, encontramos una reducción en el tamaño muscular del sóleo, mientras que el tibial craneal permaneció igual en las ratas alimentadas con una dieta de reducido contenido calórico. Este efecto asociado al tipo muscular puede ser debido a la distinta funcionalidad de los músculos. El músculo sóleo, como músculo postural tiene como función la de soportar el

peso corporal. Puesto que los animales sometidos a RC reducen su peso corporal total respecto a los controles, el efecto anti-gravitatorio que ha de ejercer el músculo sóleo será también menor por lo que la disminución en el tamaño de los músculos posturales tras la alimentación con un protocolo de dieta hC podría ser consecuencia de un menor estímulo en el crecimiento de estos músculos supeditado a la pérdida de peso corporal (Baldwin et al., 2013). Este fenómeno también se ha visto en mujeres, en las que se ha observado un menor tamaño de las fibras musculares en aquellas mujeres con bajo peso corporal (Galusca et al., 2018). En cambio, no observamos pérdida de masa muscular absoluta en el músculo tibial craneal, un músculo encargado de la locomoción y cuyo tamaño se vería afectado principalmente por el ejercicio (Hoppeler y Flück, 2002).

Esta disparidad en los resultados asociada al tipo muscular parece indicar que la atrofia encontrada en algunos músculos tras un periodo de RC está más relacionada con el peso corporal que con la ingesta calórica *per se*. Esto se ve reforzado con el hecho de que cuando se realiza una corrección de la masa muscular frente al peso corporal, el ISM se encuentra incrementado en ambos músculos, sóleo y tibial craneal, de las ratas con hC, resultados que concuerdan con los previamente reportados por otros autores (Mckiernan et al., 2004; Faitg et al., 2019). El aumento de ISM es un reflejo de la conservación de la masa muscular tras una restricción energética, y se ha asociado con ventajas en la funcionalidad muscular (Granic et al., 2019; Larsson et al., 2019).

3.2. Efecto de la RC sobre el fenotipo del músculo esquelético

Efecto sobre la composición fibrilar

Puesto que el tipo y función de cada músculo determina su composición fibrilar, se estudiaron dos músculos con diferente estructura para investigar los cambios fenotípicos de la RC sobre distribución de las fibras musculares. Por un lado, el sóleo es un músculo con fenotipo de contracción lenta cuya composición se basa mayoritariamente en fibras de tipo I seguido de una pequeña proporción de fibras de tipo IIA. Por otro lado, el músculo tibial craneal se engloba dentro de los músculos de contracción rápida y como el resto de los músculos fásicos presenta un fenotipo compuesto principalmente por una combinación de fibras de tipo IIA, IIX y IIB y un menor número de fibras lentas de tipo I.

Como ya se ha comentado en la Introducción, el fenotipo de los músculos no es estático, sino que puede ser modificado por la influencia de factores como la nutrición (Collino et al., 2014), el ejercicio (Hearris et al., 2018) o incluso una situación de enfermedad (Puthuchearry et al., 2018). Estos cambios en el fenotipo contráctil suceden más comúnmente en los músculos fásicos, los cuales participan en la propulsión para generar el movimiento. Por ejemplo, después de hacer ejercicio o llevar a cabo un entrenamiento prolongado se produce una adaptación de las fibras musculares hacía un fenotipo de contracción lenta cuyo objetivo es el de reducir los efectos de la fatiga

muscular, mejorando así la resistencia al ejercicio (Mujika et al., 2016; Pons et al., 2018). Del mismo modo, la función metabólica muscular también se ve afectada tendiendo a una preservación de la capacidad oxidativa (St-Jean-Pelletier et al., 2017). Los resultados obtenidos del estudio de histomorfometría muscular desarrollado en la presente Tesis van en esta misma línea. Mientras que no se observaron cambios importantes en las fibras del músculo sóleo, la alimentación con una dieta hC resultó en una adaptación muscular con un cambio en la composición fibrilar en la dirección de un fenotipo más lento en el músculo tibial craneal. Se observó un incremento de las fibras de tipo IIA a expensas del número de fibras de tipo IIX y fibras tipo I, cuya proporción se encontró disminuida en comparación con el músculo tibial craneal de las ratas controles. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por el equipo de Faitg, quienes encontraron una disminución en el porcentaje de fibras tipo IIX acompañado por un incremento del número de fibras tipo IIA en aquellas ratas sometidas a RC en comparación con un grupo alimentado *ad libitum* (Faitg et al., 2017). Es interesante destacar que mientras que nuestro estudio se llevó a cabo en ratas jóvenes sometidas a RC durante un periodo de 7 meses, Faitg y colaboradores realizaron sus experimentos en ratas adultas alimentadas durante un periodo de 13 meses. Además, ellos utilizaron un sistema de restricción de ingesta total mientras que las ratas de nuestro experimento se alimentaron con una dieta hC mediante una disminución del contenido de grasa, evitando así la limitación del resto de nutrientes. Esto hace

pensar que los cambios fenotípicos sucedidos tras un protocolo de RC son consecuencia de la restricción en la ingesta energética, sin importar la composición nutricional de la dieta y siempre y cuando se asegure un buen aporte de micronutrientes. Por otro lado, los cambios en el fenotipo contráctil que encontramos en nuestro estudio son también similares a los observados en el remodelado muscular que acontece durante el entrenamiento y cuyo objetivo es el de mejorar la función muscular (Zierath y Hawley, 2004; St-Jean-Pelletier et al., 2017), por lo que se antoja pensar que la RC aplicada en individuos jóvenes pudiera tener beneficios en cuanto a funcionalidad muscular similares a los obtenidos con el estímulo del ejercicio.

Efecto sobre la actividad oxidativa

Otro indicador de gran importancia en la función del músculo esquelético es la capacidad oxidativa del mismo. Si bien nuestros resultados no muestran cambios en el perfil oxidativo del músculo tibial craneal, sí que observamos una reducción de la actividad de la SDH en el músculo sóleo de ratas alimentadas con una dieta menos calórica, disminución que resultó estadísticamente significativa en las fibras lentas tipo I. Como ya se ha comentado en varias ocasiones, el sóleo es un músculo postural. Sabido esto y teniendo en consideración que el peso corporal de los animales del grupo hC se redujo significativamente respecto al control, una disminución en la actividad

oxidativa mitocondrial sería consistente con la necesidad de soportar un peso corporal menor. En el tibial craneal, en cambio, cuya función consiste en generar movimiento, se observó una preservación del perfil oxidativo en ratas hC, lo cual es consistente con la tendencia de este músculo hacia un perfil contráctil más lento y, por tanto, de características metabólicas cuya tendencia sería la de virar de una actividad glucolítica hacia un perfil más oxidativo (véase tabla 1).

3.3. RC y músculo esquelético: implicación de la vitamina D

Se han postulado diferentes mecanismos como responsables de los beneficios musculares observados tras un periodo de RC, entre ellos la modificación de la ultraestructura mitocondrial (Chen, Y. et al., 2014; Guitiérrez-Casado et al., 2019). En el estudio de Faitg en 2017, los autores demostraron una mejora en la estructura mitocondrial del músculo sóleo después de más de un año de alimentación con RC, aunque la actividad oxidativa muscular no se vio modificada. De forma contraria, cuando examinaron el músculo gastronemio (músculo de contracción rápida), observaron una mayor actividad SDH que no se correspondía con una mejora morfológica de las mitocondrias (Faitg et al., 2017). Por tanto, cabe pensar que la modificación del fenotipo oxidativo de las fibras musculares por la RC podría estar ligada a otros factores externos a la mitocondria.

Otro factor asociado con los beneficios de la RC en el músculo esquelético es su capacidad para retrasar el deterioro neuromuscular asociado a la edad (Stockinger et al., 2017). Es bien sabido que durante el envejecimiento se producen ciclos de denervación/reinervación en el músculo, lo que explicaría la remodelación de las fibras musculares asociada a la edad (Gouspillou et al., 2013). Algunos autores postulan que la aplicación de una dieta basada en un régimen de RC podría proteger la integridad de las uniones neuromusculares, restableciendo así el perfil contráctil muscular de individuos adultos (Valdez et al., 2010; Faitg et al., 2017). No obstante, los mismos cambios reportados por otros autores en la composición fibrilar del músculo de ratas adultas los observamos también en nuestro estudio con animales jóvenes, donde se presupone que aún no habrían sucedido daños neuromusculares. Esto nos lleva a investigar factores alternativos que pudieran estar influyendo en la modificación de la composición fibrilar del músculo esquelético.

En esta línea, la vitamina D ha demostrado ser un importante factor para el correcto crecimiento y funcionalidad muscular (Dawson-Huges, 2017; Książek et al., 2019) y está involucrada en la inducción de la hipertrofia de las fibras musculares (Montenegro et al., 2019). Aunque los mecanismos por los cuales la vitamina D influye sobre las características fenotípicas del músculo no están aún dilucidados, se postula que su acción se encuentra mediada por la interacción con el receptor de vitamina D (VDR). En un artículo reciente, se ha puesto de manifiesto que la sobre-expresión de este receptor ejerce de

promotor del anabolismo muscular, induciendo la hipertrofia (Bass et al., 2020); mientras que, en otro estudio experimental, los mismos autores reportan que la inhabilitación del VDR en ratas induce atrofia muscular (Bass et al., 2020).

Los efectos de la vitamina D sobre la homeostasis muscular se encuentran ligados a la acción combinada de mecanismos genómicos y no genómicos mediados por VDR (Bollen et al., 2021). El VDR es un receptor nuclear que actúa como factor de transducción mediante su unión al ADN de los elementos respondedores de vitamina D (VDRE) encontrados en el núcleo celular (Haussler et al., 1998). Estos elementos se han identificado en diferentes genes miogénicos de forma que la interacción entre 1,25(OH)₂-vitamina D₃, VDR y VDRE es la responsable de los mecanismos genómicos por los que la vitamina D ejerce sus efectos sobre el músculo. Por otro lado, los mecanismos no genómicos se basan en la acción de la 1,25(OH)₂-vitamina D₃ sobre la vía de la ubiquitina-proteosoma, afectando principalmente a la señal transducción de esta vía, y evitando así la degradación proteica en el músculo (Bollen et al., 2021).

Como se ha expuesto en los resultados del estudio muscular (véase Resultados, Sección 3), las ratas alimentadas con dieta hC duplicaron los niveles plasmáticos de calcitriol respecto a los animales controles. Además, en el estudio histomorfométrico encontramos que el calcitriol presentó una fuerte correlación positiva no sólo con los valores del ISM de ambos músculos, sino

también con el aumento en la proporción de fibras tipo IIA del tibial craneal. Aunque es importante recordar que asociación no implica causalidad, son múltiples las publicaciones que relacionan los niveles de vitamina D con el anabolismo muscular (Dawson-Huges, 2017; Garcia et al., 2019; Montenegro et al., 2019; Bass et al., 2020; Bollen et al., 2021). Por tanto, el incremento de los niveles plasmáticos de calcitriol observados tras una dieta hC podría ser, al menos en parte, responsable del efecto anabólico de la RC sobre el músculo esquelético. Esto es especialmente importante ya que, en un contexto de enfermedad renal, en el que los pacientes presentan concentraciones plasmáticas de calcitriol especialmente reducidas (Jean et al., 2017; Kaur et al., 2018), la suplementación de vitamina D es un protocolo de actuación común, lo que podría beneficiar a la salud muscular. Sin embargo, hay que tener precaución con este tratamiento puesto que se ha demostrado que puede tener efectos secundarios como el desarrollo de calcificaciones extraesqueléticas (Jean et al., 2017). Por tanto, con los datos obtenidos en estos estudios, el aumento del calcitriol que tiene lugar tras la reducción de la ingesta calórica de la dieta podría ser potencialmente útil en la preservación de la masa muscular de estos pacientes.

La vitamina D también se ha asociado con la remodelación fenotípica del músculo por su capacidad de modular el número de fibras tipo IIA (Garcia et al., 2019; Książek et al., 2019), hecho que respalda la fuerte correlación positiva encontrada en nuestro estudio entre estos dos parámetros. Además, en

un estudio experimental, la suplementación con calcitriol en ratas nefrectomizadas demostró tener efectos beneficiosos sobre el fenotipo muscular, observándose una tendencia a incrementar la proporción de fibras tipo I y tipo IIA tanto en el sóleo como en el tibial craneal, además de una disminución de las fibras tipo IIB, restableciendo así los efectos causados por la uremia (Acevedo et al., 2016).

La deficiencia de vitamina D es un problema de salud ampliamente reconocido en la actualidad y que afecta a pacientes con enfermedades crónicas como la obesidad (Savastano et al., 2017). Se han propuesto dos mecanismos por los cuales esto puede ocurrir: el secuestro de vitamina D por el tejido adiposo (Wortsman et al., 2000) o, el más aceptado actualmente, la disminución de esta hormona a consecuencia del efecto de dilución volumétrica (Vranić et al., 2019). Esto es, la vitamina D se encuentra en equilibrio entre los niveles encontrados en el plasma y la concentración disuelta en el tejido adiposo, teniendo este último una afinidad por la vitamina D de hasta 12 veces mayor que las proteínas plasmáticas (Blum et al., 2008). Esto implicaría que un aumento en el volumen de grasa corporal total resultaría en una mayor concentración de vitamina D en el tejido adiposo, a expensas de la concentración plasmática (Vranić et al., 2019). En un supuesto teórico, la pérdida de peso derivada de la RC podría conllevar al incremento de los niveles plasmáticos de vitamina D, asociado a la disminución en la grasa corporal. Si bien este mecanismo se aplica normalmente a los niveles de

colecalfiferol o 25(OH)-vitamina D₃, estos metabolitos podrían influir en el incremento de 1,25(OH)₂-vitamina D₃ observado en las ratas sometidas a RC. No obstante, no está demostrado que la RC ejerza el efecto opuesto al modelo de dilución volumétrica.

Por su parte, el FGF23 es el mayor regulador del metabolismo de la vitamina D. Como ya se ha comentado con anterioridad, este inhibe la producción de calcitriol mediante la modulación de las enzimas involucradas en el metabolismo de la vitamina D. Además, se ha demostrado que la ingesta calórica regula de forma directa la síntesis y secreción de FGF23. Los niveles de FGF23 plasmáticos obtenidos en los estudios destinados a investigar el efecto de la RC en el músculo esquelético son consistentes con los obtenidos en los experimentos diseñados para estudiar el efecto de la RC en el metabolismo mineral. Esto es, las ratas alimentadas con la dieta hC durante un periodo prolongado de tiempo (7 meses) disminuyeron los valores plasmáticos de FGF23, a la vez que los valores de calcitriol se incrementaron respecto a las ratas que se alimentaron con dieta NC. Si bien el incremento de la ingesta de alimento, y por tanto de vitamina D, por parte de las ratas del grupo hC podría ser el resultado del aumento del calcitriol plasmático, resulta interesante que no se encontrasen diferencias en las concentraciones plasmáticas de calcidiol. Teniendo en cuenta que este último es el metabolito que mejor refleja el estatus de vitamina D en el organismo, la hipótesis de que el incremento de calcitriol sea consecuencia de la diferencia en la ingesta puede ser descartada. El estudio

enzimático reveló un aumento en la expresión renal de Cyp27b1 y la disminución de Cyp24a1 en los animales alimentados con el protocolo hC. Sabiendo que estas dos enzimas son las principales responsables de la síntesis y degradación del calcitriol respectivamente, y que su expresión se encuentra directamente regulada por el FGF23, el incremento de calcitriol resultante tras la RC podría explicarse como un reflejo de la disminución del FGF23 en estas ratas. Cabe añadir que, desde un punto de vista mecanicista, el incremento de calcitriol plasmático debiera actuar como estímulo de la expresión de Cyp24a1 renal (Murayama et al., 1999). El hecho de observar un aumento de esta enzima en los resultados del estudio refuerza la hipótesis de que el incremento de calcitriol corresponde con un efecto indirecto de la reducción de la ingesta calórica, mediado por el FGF23. De esta forma los cambios observados en el músculo esquelético tras la RC podrían ser el resultado de la acción de un complejo sistema que integra hueso, riñón y músculo (Figura 40).

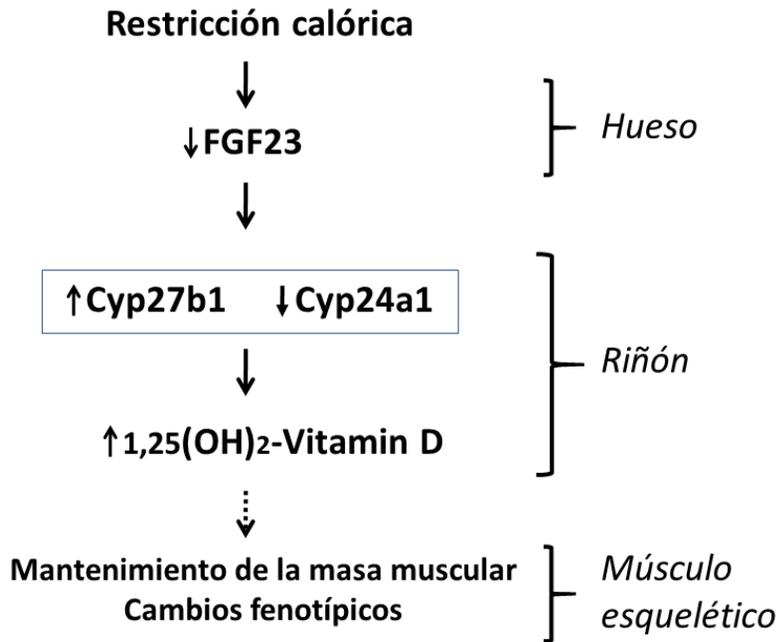


Figura 40. Propuesta mecanicista sobre la influencia de la restricción calórica en los cambios fenotípicos de la musculatura esquelética. La disminución de la ingesta calórica incide directamente sobre el hueso disminuyendo la producción de FGF23, el cual modula la actividad enzimática del metabolismo de la vitamina D incrementando los niveles de 1,25(OH)₂-vitamina D (calcitriol). El músculo esquelético responde al aumento de vitamina D adaptando el fenotipo muscular hacia unas características beneficiosas al estatus nutricional. Cyp27b1, enzima 1-alfa-hidroxilasa; Cyp24a1, enzima 24-hidroxilasa; FGF23, factor de crecimiento fibroblástico 23.

Conclusiones

Conclusión 1. La restricción calórica actúa directamente sobre la regulación del metabolismo mineral, disminuyendo el balance de fósforo en ratas con función renal normal.

Conclusión 2. En ratas sanas, la restricción calórica disminuye las concentraciones plasmáticas de FGF23.

Conclusión 3. La restricción calórica modula el metabolismo de la vitamina D de forma secundaria a la disminución del FGF23, incrementando los niveles plasmáticos de calcitriol mediante la estimulación de la enzima Cyp27b1 e inhibición de la enzima Cyp24a1.

Conclusión 4. La reducción en la disponibilidad energética del medio de cultivo disminuye la expresión de FGF23 en células osteogénicas.

Conclusión 5. El efecto de la disponibilidad energética sobre la producción de FGF23 en células óseas está mediado por la vía mTOR.

Conclusión 6. A pesar de sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo del fósforo, la restricción calórica no previene el desarrollo de calcificaciones vasculares en animales urémicos ni acelera la regresión de las mismas.

Conclusión 7. La restricción calórica incrementa la mortalidad en ratas urémicas que desarrollan calcificaciones vasculares.

Conclusión 8. En ratas sanas, la restricción calórica preserva la masa muscular y modifica la composición fibrilar de los músculos fásicos hacia un fenotipo contráctil más lento.

Conclusión 9. Los efectos de la restricción calórica sobre el músculo se encuentran estrechamente asociados a la activación de un eje óseo-renal-muscular que conlleva una disminución en la producción de FGF23 por el hueso y un incremento en la producción de 1,25(OH)₂-vitamina D₃ (calcitriol) por el riñón.

Resumen

La ingesta calórica interviene en la regulación del metabolismo mineral a diferentes niveles, principalmente renal, cardiovascular, óseo y muscular. La ingesta calórica influye en el desarrollo y la progresión de la enfermedad renal, de forma que el consumo de dietas con alto contenido en grasas favorece el deterioro de los riñones incluso en ausencia de obesidad. Por su parte, la restricción calórica (RC) tiene múltiples efectos beneficiosos sobre la salud y la longevidad y ha demostrado ser un elemento útil para preservar la funcionalidad renal. La presente Tesis Doctoral persigue investigar la influencia de la RC sobre el metabolismo mineral poniendo el foco en los aspectos de mayor interés en el contexto de la enfermedad renal crónica: el manejo del fósforo, la síntesis y secreción de factor de crecimiento de fibroblástico 23 (FGF23) y de calcitriol, y el desarrollo de calcificación vascular (CV). Por otra parte, la influencia de la RC en el músculo es controvertida y los mecanismos están aún por elucidar. Es por ello que en este trabajo se ha abordado el estudio de los efectos de la RC sobre el fenotipo del músculo esquelético, así como la implicación de la vitamina D sobre los cambios en la masa muscular y la composición fibrilar.

Para probar la hipótesis de que el FGF23 está directamente regulado por la ingesta calórica, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* e *in vitro*. En los experimentos *in vivo* se estudió la influencia de la ingesta calórica sobre el metabolismo del fósforo y la producción de FGF23 en dos escenarios de RC, mediante la modificación del contenido calórico de la dieta o a través de la restricción de la ingesta total de alimento. En el primer estudio tres grupos de ratas fueron alimentados con dietas con un contenido calórico alto (HC), normal (NC) o bajo (hC) durante 30 días. No se observaron diferencias en la absorción intestinal ni en las concentraciones plasmáticas de fósforo entre los tres grupos de ratas. Las concentraciones plasmáticas de FGF23 se incrementaron en el grupo HC y disminuyeron en el grupo hC, en comparación con las ratas del grupo NC. Además, los niveles de FGF23 correlacionaron positivamente con la ingesta calórica de los animales. En el segundo estudio, se incluyeron dos grupos de ratas alimentadas con una dieta normocalórica sometidas a un régimen de ingesta ad libitum (control) o restringida (NCR). Tras un periodo de 50 días, las ratas NCR presentaron un balance de fósforo negativo, una menor concentración plasmática de fósforo y una disminución de los niveles plasmáticos de FGF23, en comparación con el grupo control. *In vitro*, se incubaron células osteogénicas UMR106 en un medio de cultivo con un contenido de glucosa alto (HG, 4,5 g/l) o bajo (LG, 1 g/l). Además, se llevaron a cabo estudios adicionales incluyendo tratamientos con diferentes

concentraciones de fósforo, estudios de osmolaridad con manitol y estudios mecanicistas mediante con la exposición a inhibidores de la vía mTOR, como rapamicina o everolimus. La expresión de ARN mensajero (ARNm) de FGF23 fue significativamente mayor en células UMR106 cultivadas en HG que aquellas incubadas con LG. Cuando se expusieron las células a una concentración elevada de fósforo, el ARNm de FGF23 aumentó, aunque este efecto sólo se observó cuando las células se cultivaron en HG. La incubación de células en medio HG y con inhibidores mTOR disminuyó la expresión de ARNm de FGF23 respecto a aquellas incubadas sólo con el vehículo. Estos valores fueron similares a los obtenidos con la incubación en un medio LG. En conclusión, estos estudios ponen de manifiesto la existencia de una regulación directa de la producción de FGF23 por la disponibilidad de energética y demuestran que la vía de señalización mTOR juega un papel central en este sistema regulador.

En un tercer estudio se investigó el efecto de la RC sobre el desarrollo y regresión de la CV en ratas urémicas. Para ello se incluyeron cuatro grupos de ratas las cuales se distribuyeron en función de si tuvieron una pauta de alimentación con ingesta calórica normal o restringida. El contenido de fósforo de las dietas se ajustó para proporcionar una ingesta de fósforo igual en todos los grupos independientemente de la ingesta calórica. Tras un periodo de 50 días, a todos los animales se les indujo uremia mediante nefrectomía (Nx) 5/6. Tras la Nx, las ratas fueron tratadas con calcitriol (80 ng/kg ip en días alternos) y alimentadas con una dieta con un contenido de fósforo del 1.2% (NC1,2) o 1.8% (NC1,8) para inducir el desarrollo de CV. Después de 14 días de tratamiento, no se observaron diferencias significativas en el contenido de calcio aórtico entre ratas que tuvieron una ingesta calórica normal y aquellas sometidas a RC durante el periodo previo a la Nx, ni en los grupos NC1,2 ni en los grupos NC1,8. Sin embargo, la mortalidad aumentó significativamente en las ratas sometidas a RC antes de la Nx tanto en el grupo NC1,2 como en el grupo NC1,8. Después del periodo de CV un grupo de ratas fue sometido a un protocolo de regresión de CV, en el que se detuvo la administración de calcitriol y se normalizó la ingesta de fósforo, distribuyendo los animales en dos grupos, con ingesta calórica normal o reducida. La CV regresó rápidamente, pero no se observaron diferencias significativas en el calcio aórtico entre las ratas que tuvieron una ingesta calórica normal o restringida. En conclusión, la RC no previno ni mejoró la CV e incrementó la mortalidad en ratas urémicas.

Finalmente, para abordar el estudio de los efectos de la RC sobre el fenotipo muscular, 34 ratas fueron alimentadas con una dieta de contenido calórico normal (control) o reducido (hC) durante un periodo de 7 meses. Se estudió el efecto sobre la masa muscular, el índice somático muscular (ISM), la composición del tipo de fibra, el tamaño de la fibra y la actividad metabólica en los músculos tibial craneal (TC) y sóleo (SOL). Además, se midieron los metabolitos plasmáticos de la vitamina D y la expresión renal de enzimas implicadas en el metabolismo de la vitamina D con el fin de aclarar la implicación de la vitamina D los cambios del fenotipo muscular. En el grupo hC, no se observó cambio en el tamaño muscular del TC aunque sí se encontró una reducción en el SOL; sin embargo, el ISM aumentó en ambos músculos. Los estudios histomorfométricos mostraron un incremento en el porcentaje de fibras de tipo IIA y una reducción en la proporción de fibras de tipo IIX en el TC de ratas con dieta hC. Además, se identificó una disminución del tamaño de las fibras de tipo I y una reducción de la actividad oxidativa en el sóleo de estas ratas en comparación con el grupo control. Las ratas hC presentaron un incremento significativo en los niveles plasmáticos de calcitriol, acompañado de un aumento en la expresión renal de Cyp27b1 y una disminución de Cyp24a1. Se observó una fuerte correlación positiva entre la concentración de calcitriol y el ISM en ambos músculos. El calcitriol también correlacionó significativamente con los porcentajes de fibras tipo IIA y tipo IIX en TC y con el perfil oxidativo en SOL. En conclusión, la RC preserva la masa del músculo esquelético, mejora el fenotipo contráctil en los músculos fásicos (TC) y reduce el gasto energético en los músculos posturales (SOL), beneficios que están estrechamente relacionados con el incremento de vitamina D secundario a la RC.

Summary

Caloric intake influences the regulation of mineral metabolism at different levels, mainly renal, cardiovascular and musculoskeletal. Caloric intake is involved in the development and progressions of kidney disease so that the consumption of high-fat diets favors the deterioration of kidneys even in the absence of obesity. Caloric restriction (CR) is known to have multiple beneficial effects on health and longevity and has been shown to be a useful tool to preserve renal function. This Doctoral Thesis seeks to investigate the influence of CR on mineral metabolism focussing on the aspects of major interest in the context of chronic kidney disease: phosphate handling, synthesis and secretion of fibroblast growth factor 23 (FGF23) and calcitriol, and the development of vascular calcification (VC). On the other hand, the influence of CR on muscle is controversial and the mechanisms need to be elucidated. That is why this work has approached the study of the effects of CR on the skeletal muscle phenotype, as well as the role of vitamin D on changes in muscle mass and fiber-type composition.

To test the hypothesis that FGF23 is directly regulated by energy intake, *in vivo* and *in vitro* experiments were conducted. In *in vivo* experiments, the influence of energy intake on phosphate metabolism and FGF23 production was studied in two scenarios of CR, by modifying the caloric content of the diet or by deprivation of food consumption. In the first study, three groups of rats were fed diets with high (HC), normal (NC), and low (LC) caloric content for 30 days. We did not find differences in intestinal absorption between the three groups of rats. Plasma FGF23 concentrations were increased in the HC group and decreased in the LC group, as compared with NC. Moreover, a significant correlation between energy intake and plasma FGF23 concentrations was observed. In the second study, two groups of rats fed a normocaloric diet were included and subjected to an *ad libitum* (control) or restricted (NCR) feeding regime. After 50 days, NCR rats showed a negative phosphorous balance, less concentration in plasma phosphorus, and a decrease of plasma FGF23 levels, compared to the control group. *In vitro*, UMR106 cells were incubated in a high (HG, 4.5 g/l) or low glucose (LG, 1 g/l) medium. Additional experiments were conducted including treatments with different concentrations of phosphorus, osmolarity studies with mannitol, and mechanistic experiments by exposure to mTOR inhibitors, such as rapamycin or everolimus. mRNA FGF23 was significantly higher in UMR106 cells cultured in HG than in LG. When UMR106 cells were exposed to high phosphorous, mRNA FGF23 increased but only when cells were cultured in HG. Cells incubated with HG and mTOR inhibitors decreased mRNA FGF23 expression, compared to those incubated

with the vehicle. These values were similar to the data obtained in cells incubated in LG. In conclusion, these studies evidence a direct regulation of FGF23 production by energy availability and demonstrate that the mTOR signaling pathway plays a central role in this regulatory system.

The third study investigated the effect of CR on the development of VC in uremic rats. Four groups of rats were included and allocated according to a feeding regime with normal or restricted caloric intake. Phosphorus content of the diets was adjusted so phosphorus intake was similar in all groups, despite the caloric intake. After 50 days, uremia was induced by 5/6 nephrectomy (Nx) in all animals. After Nx, rats were treated with calcitriol (80 ng/kg ip every other day) and high phosphorus diets with a content of 1.2% (NC1.2) or 1.8% (NC1.8) to induce VC. After 14 days of treatment, no differences were found in aortic calcium content between rats that ate normal or restricted calories before Nx in either NC1.2 or NC1.8 rats. However, mortality was significantly increased in both CR groups, NC1.2 and NC1.8. After the period of VC, rats were subjected to regression of VC when calcitriol was stopped and phosphorous intake normalized, and animals were allocated in two groups, normal and restricted calories. VC regressed rapidly, but no significant differences in aortic calcium were observed between rats that ate normal or restricted calories during the regression phase. In conclusion, CR did not prevent or ameliorate VC and increased mortality in uremic rats.

Finally, to test the effect of CR on muscle phenotype, 34 rats were fed either a diet with a normal (control) or reduced (hC) caloric content for 7 months. Muscle mass, muscle-somatic index (MSI), fiber-type composition, fiber size, and metabolic activity were studied in both tibial cranial (TC) and soleus (SOL) muscles. Moreover, plasma vitamin D and renal expression of enzymes involved in vitamin D metabolism were measured to investigate the role of vitamin D in muscle phenotype changes. In the hC group, no change in muscle size was found in TC but a reduction in SOL was observed; however, MSI increased in both muscles. Histomorphometric studies showed an increase in type IIA fibers percentage and a decreased in type IIX fibers in TC of hC rats. Moreover, decreased size of type I fibers and reduced oxidative activity were identified in SOL of hC rats, compared to control. An increase in plasma calcitriol with kidney up-regulation of Cyp27b1 and down-regulation of Cyp24a1 was observed in hC rats. A strong correlation between plasma calcitriol concentration and MSI was observed in both muscles. Calcitriol also correlated with the percentages of type IIA and type IIX fibers in TC and with

the oxidative profile in SOL. In conclusion, CR preserves skeletal muscle mass, improves contractile phenotype in phasic muscles (TC), and reduces energy expenditure in antigravity muscles (SOL), benefits that are closely related to the increases in vitamin D secondary to CR.

Referencias

1. Abdelnour-Berchtold, E., Cerantola, Y., Roulin, D., Dormond-Meuwly, A., Demartines, N., y Dormond, O. (2010). Rapamycin-mediated FOXO1 inactivation reduces the anticancer efficacy of rapamycin. *Anticancer research*, 30(3), 799–804.
2. Abuduli, M., Ohminami, H., Otani, T., Kubo, H., Ueda, H., Kawai, Y., Masuda, M., Yamanaka-Okumura, H., Sakaue, H., Yamamoto, H., Takeda, E., y Taketani, Y. (2016). Effects of dietary phosphate on glucose and lipid metabolism. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 310(7), E526–E538.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00234.2015>
3. Acevedo, L. M., López, I., Peralta-Ramírez, A., Pineda, C., Chamizo, V. E., Rodríguez, M., Aguilera-Tejero, E., y Rivero, J. L. (2016). High-phosphorus diet maximizes and low-dose calcitriol attenuates skeletal muscle changes in long-term uremic rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 120(9), 1059–1069.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00957.2015>
4. Afsar, B., Afsar, R. E., Copur, S., Sag, A. A., Ortiz, A., y Kanbay, M. (2021). The effect of energy restriction on development and progression of chronic kidney disease: review of the current evidence. *The British journal of nutrition*, 125(11), 1201–1214.
<https://doi.org/10.1017/S000711452000358X>

5. Agarwal, E., Miller, M., Yaxley, A., y Isenring, E. (2013). Malnutrition in the elderly: a narrative review. *Maturitas*, 76(4), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.07.013>
6. Agnew, J. E., y Holdsworth, C. D. (1971). The effect of fat on calcium absorption from a mixed meal in normal subjects, patients with malabsorptive disease, and patients with a partial gastrectomy. *Gut*, 12(12), 973–977. <https://doi.org/10.1136/gut.12.12.973>
7. Ahima, R. S., y Flier, J. S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11(8), 327–332. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00301-5)
8. Ahmadi, S. F., Zahmatkesh, G., Ahmadi, E., Streja, E., Rhee, C. M., Gillen, D. L., De Nicola, L., Minutolo, R., Ricardo, A. C., Kovesdy, C. P., y Kalantar-Zadeh, K. (2015). Association of Body Mass Index with Clinical Outcomes in Non-Dialysis-Dependent Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiorenal medicine*, 6(1), 37–49. <https://doi.org/10.1159/000437277>
9. Akiyama, K. I., Miura, Y., Hayashi, H., Sakata, A., Matsumura, Y., Kojima, M., Tsuchiya, K., Nitta, K., Shiizaki, K., Kurosu, H., y Kuro-O, M. (2020). Calciprotein particles regulate fibroblast growth factor-23 expression in osteoblasts. *Kidney international*, 97(4), 702–712. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.10.019>

10. Almaden, Y., Canalejo, A., Hernandez, A., Ballesteros, E., Garcia-Navarro, S., Torres, A., y Rodriguez, M. (1996). Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *11*(7), 970–976.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110714>
11. Almendáriz-Palacios, C., Mousseau, D. D., Eskiw, C. H., y Gillespie, Z. E. (2020). Still Living Better through Chemistry: An Update on Caloric Restriction and Caloric Restriction Mimetics as Tools to Promote Health and Lifespan. *International journal of molecular sciences*, *21*(23), 9220.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239220>
12. Ambrus, C., Almasi, C., Berta, K., Deak, G., Marton, A., Molnar, M. Z., Nemeth, Z., Horvath, C., Lakatos, P., Szathmari, M., y Mucsi, I. (2011). Vitamin D insufficiency and bone fractures in patients on maintenance hemodialysis. *International urology and nephrology*, *43*(2), 475–482.
<https://doi.org/10.1007/s11255-010-9723-x>
13. Andermann, M. L., y Lowell, B. B. (2017). Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*, *95*(4), 757–778.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.014>
14. Argilés, J. M., Campos, N., Lopez-Pedrosa, J. M., Rueda, R., y Rodriguez-Mañas, L. (2016). Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan

- Crosstalk: Roles in Health and Disease. *Journal of the American Medical Directors Association*, 17(9), 789–796.
<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.04.019>
15. Arima, K., Mizukami, S., Nishimura, T., Tomita, Y., Nakashima, H., Abe, Y., y Aoyagi, K. (2020). Epidemiology of the association between serum 25-hydroxyvitamin D levels and musculoskeletal conditions among elderly individuals: a literature review. *Journal of physiological anthropology*, 39(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00249-3>
16. Aspnes, L. E., Lee, C. M., Weindruch, R., Chung, S. S., Roecker, E. B., y Aiken, J. M. (1997). Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(7), 573–581. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.7.9212081>
17. Bakker, A. D., y Jaspers, R. T. (2015). IL-6 and IGF-1 Signaling Within and Between Muscle and Bone: How Important is the mTOR Pathway for Bone Metabolism?. *Current osteoporosis reports*, 13(3), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0264-1>
18. Baldwin, K. M., Haddad, F., Pandorf, C. E., Roy, R. R., y Edgerton, V. R. (2013). Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Frontiers in physiology*, 4, 284. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00284>

19. Bär, L., Feger, M., Fajol, A., Klotz, L. O., Zeng, S., Lang, F., Hocher, B., y Föller, M. (2018). Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(22), 5804–5809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800160115>
20. Barbour, K. E., Lui, L. Y., Ensrud, K. E., Hillier, T. A., LeBlanc, E. S., Ing, S. W., Hochberg, M. C., Cauley, J. A., y Study of Osteoporotic Fractures (SOF) Research Group (2014). Inflammatory markers and risk of hip fracture in older white women: the study of osteoporotic fractures. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *29*(9), 2057–2064. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2245>
21. Bas, A., Lopez, I., Perez, J., Rodriguez, M., y Aguilera-Tejero, E. (2006). Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *21*(3), 484–490. <https://doi.org/10.1359/JBMR.051211>
22. Bass, J. J., Kazi, A. A., Deane, C. S., Nakhuda, A., Ashcroft, S. P., Brook, M. S., Wilkinson, D. J., Phillips, B. E., Philp, A., Tarum, J., Kadi, F., Andersen, D., Garcia, A. M., Smith, K., Gallagher, I. J., Szewczyk, N. J., Cleasby, M. E., y Atherton, P. J. (2021). The mechanisms of skeletal muscle atrophy in response to transient knockdown of the vitamin D

- receptor in vivo. *The Journal of physiology*, 599(3), 963–979.
<https://doi.org/10.1113/JP280652>
23. Bass, J. J., Nakhuda, A., Deane, C. S., Brook, M. S., Wilkinson, D. J., Phillips, B. E., Philp, A., Tarum, J., Kadi, F., Andersen, D., Garcia, A. M., Smith, K., Gallagher, I. J., Szewczyk, N. J., Cleasby, M. E., y Atherton, P. J. (2020). Overexpression of the vitamin D receptor (VDR) induces skeletal muscle hypertrophy. *Molecular metabolism*, 42, 101059.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101059>
24. Beaudart, C., Rizzoli, R., Bruyère, O., Reginster, J. Y., y Biver, E. (2014). Sarcopenia: burden and challenges for public health. *Archives of public health = Archives belges de sante publique*, 72(1), 45.
<https://doi.org/10.1186/2049-3258-72-45>
25. Bhavsar, S. K., Schmidt, S., Bobbala, D., Nurbaeva, M. K., Hosseinzadeh, Z., Merches, K., Fajol, A., Wilmes, J., y Lang, F. (2013). AMPK α 1-sensitivity of Orai1 and Ca(2+) entry in T - lymphocytes. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 32(3), 687–698.
<https://doi.org/10.1159/000354472>
26. Blaine, J., Chonchol, M., y Levi, M. (2015). Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 10(7), 1257–1272.
<https://doi.org/10.2215/CJN.09750913>

-
27. Block, G. A., Klassen, P. S., Lazarus, J. M., Ofsthun, N., Lowrie, E. G., y Chertow, G. M. (2004). Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *15*(8), 2208–2218.
<https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2>
28. Blouet, C., y Schwartz, G. J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research*, *209*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.024>
29. Blum, M., Dolnikowski, G., Seyoum, E., Harris, S. S., Booth, S. L., Peterson, J., Saltzman, E., y Dawson-Hughes, B. (2008). Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*, *33*(1), 90–94. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9051-4>
30. Boini, K. M., Xia, M., Abais, J. M., Li, G., Pitzer, A. L., Gehr, T. W., Zhang, Y., & Li, P. L. (2014). Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: Effects of ASC gene deletion and silencing. *Biochimica et biophysica acta*, *1843*(5), 836–845.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.033>
31. Boldrin, L., Ross, J. A., Whitmore, C., Doreste, B., Beaver, C., Eddaoudi, A., Pearce, D. J., y Morgan, J. E. (2017). The effect of calorie restriction on mouse skeletal muscle is sex, strain and time-dependent. *Scientific reports*, *7*(1), 5160. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04896-y>

32. Bollen, S. E., y Atherton, P. J. (2021). Myogenic, genomic and non-genomic influences of the vitamin D axis in skeletal muscle. *Cell biochemistry and function*, 39(1), 48–59. <https://doi.org/10.1002/cbf.3595>
33. Botolin, S., y McCabe, L. R. (2006). Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *Journal of cellular biochemistry*, 99(2), 411–424. <https://doi.org/10.1002/jcb.20842>
34. Bożentowicz-Wikarek, M., Kocelak, P., Owczarek, A., Olszanecka-Glinianowicz, M., Mossakowska, M., Skalska, A., Więcek, A., y Chudek, J. (2015). Plasma fibroblast growth factor 23 concentration and iron status. Does the relationship exist in the elderly population?. *Clinical biochemistry*, 48(6), 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.027>
35. Bruyère, O., Cavalier, E., y Reginster, J. Y. (2017). Vitamin D and osteosarcopenia: an update from epidemiological studies. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 20(6), 498–503. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000411>
36. Brylka, L., y Jahnen-Dechent, W. (2013). The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization. *Calcified tissue international*, 93(4), 355–364. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9690-6>

-
37. Buchanan, S., Combet, E., Stenvinkel, P., y Shiels, P. G. (2020). Klotho, Aging, and the Failing Kidney. *Frontiers in endocrinology*, 11, 560. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00560>
38. Bushinsky, D. A., y Monk, R. D. (1998). Electrolyte quintet: Calcium. *Lancet (London, England)*, 352(9124), 306–311. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)12331-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)12331-5)
39. Caldas, Y. A., Giral, H., Cortázar, M. A., Sutherland, E., Okamura, K., Blaine, J., Sorribas, V., Koepsell, H., y Levi, M. (2011). Liver X receptor-activating ligands modulate renal and intestinal sodium-phosphate transporters. *Kidney international*, 80(5), 535–544. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.159>
40. Cao J. J. (2011). Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 6, 30. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-6-30>
41. Cao J. J. (2018). Caloric restriction combined with exercise is effective in reducing adiposity and mitigating bone structural deterioration in obese rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1433(1), 41–52. <https://doi.org/10.1111/nyas.13936>
42. Carling D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Current opinion in cell biology*, 45, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005>
43. Carocho, M., Morales, P., y Ferreira, I. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to

- come. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 107(Pt A), 302–317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>
44. Cartee, G. D., Hepple, R. T., Bamman, M. M., y Zierath, J. R. (2016). Exercise Promotes Healthy Aging of Skeletal Muscle. *Cell metabolism*, 23(6), 1034–1047. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.007>
45. Cavanagh de, E. M., Inserra, F., y Ferder, L. (2015). Angiotensin II blockade: how its molecular targets may signal to mitochondria and slow aging. Coincidences with calorie restriction and mTOR inhibition. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 309(1), H15–H44. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00459.2014>
46. Ceglia L. (2009). Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 12(6), 628–633. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328331c707>
47. Chang, W. T., Wu, C. H., Hsu, L. W., Chen, P. W., Yu, J. R., Chang, C. S., Tsai, W. C., y Liu, P. Y. (2017). Serum vitamin D, intact parathyroid hormone, and Fetuin A concentrations were associated with geriatric sarcopenia and cardiac hypertrophy. *Scientific reports*, 7, 40996. <https://doi.org/10.1038/srep40996>
48. Charoenngam, N., y Holick, M. F. (2020). Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*, 12(7), 2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>

-
49. Chen, G., Chen, H., Wang, C., Peng, Y., Sun, L., Liu, H., y Liu, F. (2012). Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PLoS one*, 7(3), e33626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033626>
50. Chen, J. H., Ouyang, C., Ding, Q., Song, J., Cao, W., y Mao, L. (2015). A Moderate Low-Carbohydrate Low-Calorie Diet Improves Lipid Profile, Insulin Sensitivity and Adiponectin Expression in Rats. *Nutrients*, 7(6), 4724–4738. <https://doi.org/10.3390/nu7064724>
51. Chen, W., y Bushinsky, D. (2017). Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. In *Handbook of Dialysis Therapy: Fifth Edition* (pp. 685-697.e1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39154-2.00059-X>
52. Chen, Y., Hagopian, K., Bibus, D., Villalba, J. M., López-Lluch, G., Navas, P., Kim, K., y Ramsey, J. J. (2014). The influence of dietary lipid composition on skeletal muscle mitochondria from mice following eight months of calorie restriction. *Physiological research*, 63(1), 57–71. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932529>
53. Chen, Y., y Zhou, X. (2020). Research progress of mTOR inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 208, 112820. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112820>

-
54. Cheng, S. P., Doherty, G. M., Chang, Y. C., y Liu, C. L. (2011). Leptin: the link between overweight and primary hyperparathyroidism?. *Medical hypotheses*, 76(1), 94–96. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.08.039>
55. Chiang, C. M., Ismaeel, A., Griffis, R. B., y Weems, S. (2017). Effects of Vitamin D Supplementation on Muscle Strength in Athletes: A Systematic Review. *Journal of strength and conditioning research*, 31(2), 566–574. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001518>
56. Chiao, Y. A., Kolwicz, S. C., Basisty, N., Gagnidze, A., Zhang, J., Gu, H., Djukovic, D., Beyer, R. P., Raftery, D., MacCoss, M., Tian, R., y Rabinovitch, P. S. (2016). Rapamycin transiently induces mitochondrial remodeling to reprogram energy metabolism in old hearts. *Aging*, 8(2), 314–327. <https://doi.org/10.18632/aging.100881>
57. Choi, K. M., Han, K. A., Ahn, H. J., Lee, S. Y., Hwang, S. Y., Kim, B. H., Hong, H. C., Choi, H. Y., Yang, S. J., Yoo, H. J., Baik, S. H., Choi, D. S., y Min, K. W. (2013). The effects of caloric restriction on fetuin-A and cardiovascular risk factors in rats and humans: a randomized controlled trial. *Clinical endocrinology*, 79(3), 356–363. <https://doi.org/10.1111/cen.12076>
58. Chomentowski, P., Dubé, J. J., Amati, F., Stefanovic-Racic, M., Zhu, S., Toledo, F. G., y Goodpaster, B. H. (2009). Moderate exercise attenuates the loss of skeletal muscle mass that occurs with intentional caloric restriction-induced weight loss in older, overweight to obese adults. *The journals of*

- gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 64(5), 575–580. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp007>
59. Christakos, S., Hewison, M., Gardner, D. G., Wagner, C. L., Sergeev, I. N., Rutten, E., Pittas, A. G., Boland, R., Ferrucci, L., y Bikle, D. D. (2013). Vitamin D: beyond bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1287(1), 45–58. <https://doi.org/10.1111/nyas.12129>
60. Christov, M., Waikar, S. S., Pereira, R. C., Havasi, A., Leaf, D. E., Goltzman, D., Pajevic, P. D., Wolf, M., y Jüppner, H. (2013). Plasma FGF23 levels increase rapidly after acute kidney injury. *Kidney international*, 84(4), 776–785. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.150>
61. Clinkenbeard, E. L., Noonan, M. L., Thomas, J. C., Ni, P., Hum, J. M., Aref, M., Swallow, E. A., Moe, S. M., Allen, M. R., y White, K. E. (2019). Increased FGF23 protects against detrimental cardio-renal consequences during elevated blood phosphate in CKD. *JCI insight*, 4(4), e123817. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123817>
62. Collino, M., Mastrocola, R., Nigro, D., Chiazza, F., Aragno, M., D'Antona, G., y Minetto, M. A. (2014). Variability in myosteatosi and insulin resistance induced by high-fat diet in mouse skeletal muscles. *BioMed research international*, 2014, 569623. <https://doi.org/10.1155/2014/569623>
63. Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Cruzen, C., Simmons, H. A., Kemnitz, J. W., y Weindruch, R. (2009). Caloric restriction delays disease onset and

- mortality in rhesus monkeys. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), 201–204. <https://doi.org/10.1126/science.1173635>
64. Compston, J. E., Watts, N. B., Chapurlat, R., Cooper, C., Boonen, S., Greenspan, S., Pfeilschifter, J., Silverman, S., Díez-Pérez, A., Lindsay, R., Saag, K. G., Netelenbos, J. C., Gehlbach, S., Hooven, F. H., Flahive, J., Adachi, J. D., Rossini, M., Lacroix, A. Z., Roux, C., Sambrook, P. N., ... Glow Investigators (2011). Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *The American journal of medicine*, 124(11), 1043–1050. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.06.013>
65. Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., y Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5775), 927–930. <https://doi.org/10.1126/science.1124147>
66. Cozzolino, M., Ciceri, P., Galassi, A., Mangano, M., Carugo, S., Capelli, I., y Cianciolo, G. (2019). The Key Role of Phosphate on Vascular Calcification. *Toxins*, 11(4), 213. <https://doi.org/10.3390/toxins11040213>
67. Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M., y Writing Group for the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2), and the Extended Group for

- EWGSOP2 (2019). Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and ageing*, 48(1), 16–31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
68. Csiszar, A., Labinsky, N., Jimenez, R., Pinto, J. T., Ballabh, P., Losonczy, G., Pearson, K. J., de Cabo, R., y Ungvari, Z. (2009). Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mechanisms of ageing and development*, 130(8), 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.06.004>
69. Cunha, F., Dalle Molle, R., Portella, A. K., Benetti, C., Noschang, C., Goldani, M. Z., y Silveira, P. P. (2015). Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the "Similarities in the Inequalities" model. *PLoS one*, 10(3), e0118586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118586>
70. Daniele di, N., Marrone, G., Lauro di, M., Daniele di, F., Palazzetti, D., Guerriero, C., y Noce, A. (2021). Effects of Caloric Restriction Diet on Arterial Hypertension and Endothelial Dysfunction. *Nutrients*, 13(1), 274. <https://doi.org/10.3390/nu13010274>
71. David, V., Martin, A., Isakova, T., Spaulding, C., Qi, L., Ramirez, V., Zumbrennen-Bullough, K. B., Sun, C. C., Lin, H. Y., Babitt, J. L., y Wolf, M. (2016). Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney international*, 89(1), 135–146. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.290>

-
72. Dawson-Hughes B. (2017). Vitamin D and muscle function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *173*, 313–316. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.018>
73. Dawson-Hughes, B., Harris, S. S., Lichtenstein, A. H., Dolnikowski, G., Palermo, N. J., y Rasmussen, H. (2015). Dietary fat increases vitamin D-3 absorption. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *115*(2), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.09.014>
74. Demigné, C., Bloch-Faure, M., Picard, N., Sabboh, H., Besson, C., Rémésy, C., Geoffroy, V., Gaston, A. T., Nicoletti, A., Hagège, A., Ménard, J., y Meneton, P. (2006). Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. *European journal of nutrition*, *45*(5), 298–306. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0599-6>
75. Denbow D. M. (1989). Peripheral and central control of food intake. *Poultry science*, *68*(7), 938–947. <https://doi.org/10.3382/ps.0680938>
76. Dendy, R., Stinson, E. J., Guerithault, N., y Gluck, M. E. (2019). Brain Stimulation to Modulate Food Intake and Eating Behavior. *Current diabetes reports*, *19*(12), 152. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1250-2>
77. Denison, H. J., Cooper, C., Sayer, A. A., y Robinson, S. M. (2015). Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older

- people. *Clinical interventions in aging*, 10, 859–869.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S55842>
78. Dennison, E. M., Syddall, H. E., Aihie Sayer, A., Craighead, S., Phillips, D. I., y Cooper, C. (2004). Type 2 diabetes mellitus is associated with increased axial bone density in men and women from the Hertfordshire Cohort Study: evidence for an indirect effect of insulin resistance?. *Diabetologia*, 47(11), 1963–1968.
<https://doi.org/10.1007/s00125-004-1560-y>
79. Diaz-Tocados, J. M., Peralta-Ramirez, A., Rodríguez-Ortiz, M. E., Raya, A. I., Lopez, I., Pineda, C., Herencia, C., Montes de Oca, A., Vergara, N., Steppan, S., Pendon-Ruiz de Mier, M. V., Buendía, P., Carmona, A., Carracedo, J., Alcalá-Díaz, J. F., Frazao, J., Martínez-Moreno, J. M., Canalejo, A., Felsenfeld, A., Rodriguez, M., ... Muñoz-Castañeda, J. R. (2017). Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney international*, 92(5), 1084–1099. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.04.011>
80. Dimitri, P., Bishop, N., Walsh, J. S., y Eastell, R. (2012). Obesity is a risk factor for fracture in children but is protective against fracture in adults: a paradox. *Bone*, 50(2), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.05.011>
81. Dimitriadis, G. D., Maratou, E., Kountouri, A., Board, M., y Lambadiari, V. (2021). Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent

- Mechanisms: An Integrative Approach. *Nutrients*, 13(1), 159.
<https://doi.org/10.3390/nu13010159>
82. Ding, C., Parameswaran, V., Udayan, R., Burgess, J., y Jones, G. (2008). Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(5), 1952–1958.
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-2325>
83. Disthabanchong, S., y Srisuwarn, P. (2019). Mechanisms of Vascular Calcification in Kidney Disease. *Advances in chronic kidney disease*, 26(6), 417–426. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.08.014>
84. Donate-Correa, J., Martín-Núñez, E., Ferri, C., Hernández-Carballo, C., Tagua, V. G., Delgado-Molinos, A., López-Castillo, Á., Rodríguez-Ramos, S., Cerro-López, P., López-Tarruella, V. C., Arévalo-González, M. A., Pérez-Delgado, N., Mora-Fernández, C., y Navarro-González, J. F. (2019). FGF23 and Klotho Levels are Independently Associated with Diabetic Foot Syndrome in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of clinical medicine*, 8(4), 448. <https://doi.org/10.3390/jcm8040448>
85. Efeyan, A., Comb, W. C., y Sabatini, D. M. (2015). Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature*, 517(7534), 302–310.
<https://doi.org/10.1038/nature14190>
86. Ensrud, K. E., Vo, T. N., Burghardt, A. J., Schousboe, J. T., Cauley, J. A., Taylor, B. C., Hoffman, A. R., Orwoll, E. S., Lane, N. E., Langsetmo, L., y

- Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group (2018). Weight loss in men in late life and bone strength and microarchitecture: a prospective study. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 29(7), 1549–1558. <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4489-6>
87. Erben R. G. (2018). α -Klotho's effects on mineral homeostasis are fibroblast growth factor-23 dependent. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 27(4), 229–235. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000415>
88. Eriau, E., Paillet, J., Kroemer, G., y Pol, J. G. (2021). Metabolic Reprogramming by Reduced Calorie Intake or Pharmacological Caloric Restriction Mimetics for Improved Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(6), 1260. <https://doi.org/10.3390/cancers13061260>
89. Esquinas, P., Rios, R., Raya, A. I., Pineda, C., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E., y Lopez, I. (2020). Structural and ultrastructural renal lesions in rats fed high-fat and high-phosphorus diets. *Clinical kidney journal*, 14(3), 847–854. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa009>
90. Estepa, J. C., Aguilera-Tejero, E., Lopez, I., Almaden, Y., Rodriguez, M., y Felsenfeld, A. J. (1999). Effect of phosphate on parathyroid hormone secretion in vivo. *Journal of bone and mineral research: the official*

- journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(11), 1848–1854. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.11.1848>
91. Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Stevanovic Dokic, A., Colin, D. J., y Trajkovski, M. (2016). Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. *Cell metabolism*, 24(3), 434–446. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.023>
92. Faitg, J., Leduc-Gaudet, J. P., Reynaud, O., Ferland, G., Gaudreau, P., y Gouspillou, G. (2019). Effects of Aging and Caloric Restriction on Fiber Type Composition, Mitochondrial Morphology and Dynamics in Rat Oxidative and Glycolytic Muscles. *Frontiers in physiology*, 10, 420. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00420>
93. Felsenfeld, A. J., Levine, B. S., y Rodriguez, M. (2015). Pathophysiology of Calcium, Phosphorus, and Magnesium Dysregulation in Chronic Kidney Disease. *Seminars in dialysis*, 28(6), 564–577. <https://doi.org/10.1111/sdi.12411>
94. Ferrari, S. L., Bonjour, J. P., y Rizzoli, R. (2005). Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(3), 1519–1524. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1039>
95. Ferreira-Marques, M., Carvalho, A., Cavadas, C., y Azeleira, C. A. (2021). PI3K/AKT/MTOR and ERK1/2-MAPK signaling pathways are involved in

- autophagy stimulation induced by caloric restriction or caloric restriction mimetics in cortical neurons. *Aging*, 13(6), 7872–7882.
<https://doi.org/10.18632/aging.202805>
96. Fisher, F. M., y Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annual review of physiology*, 78, 223–241.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105339>
97. Forouhi, N. G., Luan, J., Cooper, A., Boucher, B. J., y Wareham, N. J. (2008). Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes*, 57(10), 2619–2625.
<https://doi.org/10.2337/db08-0593>
98. Friedman, A. N., Chambers, M., Kamendulis, L. M., y Temmerman, J. (2013). Short-term changes after a weight reduction intervention in advanced diabetic nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 8(11), 1892–1898.
<https://doi.org/10.2215/CJN.04010413>
99. Friedrichsen, M., Mortensen, B., Pehmøller, C., Birk, J. B., y Wojtaszewski, J. F. (2013). Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Molecular and cellular endocrinology*, 366(2), 204–214.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.013>

-
100. Frommelt, L., Bielohuby, M., Stoehr, B. J., Menhofer, D., Bidlingmaier, M., y Kienzle, E. (2014). Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(7-8), 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.017>
101. Frontera W. R. (2017). Physiologic Changes of the Musculoskeletal System with Aging: A Brief Review. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*, 28(4), 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2017.06.004>
102. Frontera, W. R., y Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
103. Fujita, Y., y Maki, K. (2016). High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC obesity*, 3, 1. <https://doi.org/10.1186/s40608-016-0082-8>
104. Galusca, B., Verney, J., Meugnier, E., Ling, Y., Edouard, P., Feasson, L., Ravelojaona, M., Vidal, H., Estour, B., y Germain, N. (2018). Reduced fibre size, capillary supply and mitochondrial activity in constitutional thinness' skeletal muscle. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 224(3), e13097. <https://doi.org/10.1111/apha.13097>
105. Ganapathy, A., y Nieves, J. W. (2020). Nutrition and Sarcopenia-What Do We Know?. *Nutrients*, 12(6), 1755. <https://doi.org/10.3390/nu12061755>

106. Garcia, D., y Shaw, R. J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular cell*, 66(6), 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>
107. Garcia, M., Seelaender, M., Sotiropoulos, A., Coletti, D., y Lancha, A. H., Jr (2019). Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 60, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.09.031>
108. García Castro, G. R., Alonso Montes, C., Gómez Alonso, C., Martín Carro, B., Suárez Hevia, M. A., Fernández Gómez, J. M., Suárez Fernández, M. L., Cannata Andía, J. B., Fernández Martín, J. L., y Rodríguez García, M. (2020). Impacto de la calcificación vascular en la mortalidad y salud ósea en pacientes con trasplante renal. *Revista de Osteoporosis & Metabolismo Mineral*, 12(2), 53-61. Epub 05 de octubre de 2020. <https://dx.doi.org/10.4321/s1889-836x2020000200004>
109. Garnham, J. O., Roberts, L. D., Espino-Gonzalez, E., Whitehead, A., Swoboda, P. P., Koshy, A., Gierula, J., Paton, M. F., Cubbon, R. M., Kearney, M. T., Egginton, S., Bowen, T. S., y Witte, K. K. (2020). Chronic heart failure with diabetes mellitus is characterized by a severe skeletal muscle pathology. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 11(2), 394–404. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12515>
110. Giachelli C. M. (2009). The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney international*, 75(9), 890–897.

- <https://doi.org/10.1038/ki.2008.644>
111. Gibbons, J. J., Abraham, R. T., y Yu, K. (2009). Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Seminars in oncology*, *36 Suppl 3*, S3–S17. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2009.10.011>
112. Giordani, I., Malandrucco, I., Donno, S., Picconi, F., Di Giacinto, P., Di Flaviani, A., Chioma, L., y Frontoni, S. (2014). Acute caloric restriction improves glomerular filtration rate in patients with morbid obesity and type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism*, *40*(2), 158–160. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.12.006>
113. Giuseppe di, R., Kühn, T., Hirche, F., Buijsse, B., Dierkes, J., Fritsche, A., Kaaks, R., Boeing, H., Stangl, G. I., y Weikert, C. (2015). Potential Predictors of Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations: Cross-Sectional Analysis in the EPIC-Germany Study. *PloS one*, *10*(7), e0133580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133580>
114. Glosse, P., Fajol, A., Hirche, F., Feger, M., Voelkl, J., Lang, F., Stangl, G. I., y Föller, M. (2018). A high-fat diet stimulates fibroblast growth factor 23 formation in mice through TNF α upregulation. *Nutrition & diabetes*, *8*(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0037-x>
115. Glosse, P., Feger, M., Mutig, K., Chen, H., Hirche, F., Hasan, A. A., Gaballa, M., Hocher, B., Lang, F., y Föller, M. (2018). AMP-activated

- kinase is a regulator of fibroblast growth factor 23 production. *Kidney international*, 94(3), 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.03.006>
116. Gnudi, S., Sitta, E., y Lisi, L. (2009). Relationship of body mass index with main limb fragility fractures in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral metabolism*, 27(4), 479–484.
<https://doi.org/10.1007/s00774-009-0056-8>
117. Gobin, B., Battaglia, S., Lanel, R., Chesneau, J., Amiaud, J., Rédini, F., Ory, B., y Heymann, D. (2014). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, inhibits osteosarcoma cell proliferation and tumor development in vivo with an improved survival rate. *Cancer letters*, 344(2), 291–298.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.017>
118. Gordon, J., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J. A., Womble, M., y Young, K. A. (2013). Muscle Tissue: Types of Muscle Fibers. En: *Anatomy & Physiology* (1st ed., p. 427). Openstax. <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>
119. Gouspillou, G., Picard, M., Godin, R., Burelle, Y., y Hepple, R. T. (2013). Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) in denervation-induced atrophy in aged muscle: facts and hypotheses. *Longevity & healthspan*, 2(1), 13.
<https://doi.org/10.1186/2046-2395-2-13>
120. Graham, L. S., Tintut, Y., Parhami, F., Kitchen, C. M., Ivanov, Y., Tetradis, S., y Effros, R. B. (2010). Bone density and hyperlipidemia: the

- T-lymphocyte connection. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(11), 2460–2469. <https://doi.org/10.1002/jbmr.148>
121. Granic, A., Sayer, A. A., y Robinson, S. M. (2019). Dietary Patterns, Skeletal Muscle Health, and Sarcopenia in Older Adults. *Nutrients*, 11(4), 745. <https://doi.org/10.3390/nu11040745>
122. Greco, D.S., y Stabenfeldt, G. H. (2017). Endocrinología: Metabolismo calcio y fosfatos. En: B. G., Klein (Ed.). *Cunningham. Fisiología veterinaria* (5ª ed., p. 400-404). Elsevier.
123. Greco, E. A., Lenzi, A., y Migliaccio, S. (2015). The obesity of bone. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 6(6), 273–286. <https://doi.org/10.1177/2042018815611004>
124. Guerrero-Romero, F., Rascón-Pacheco, R. A., Rodríguez-Morán, M., de la Peña, J. E., y Wacher, N. (2008). Hypomagnesaemia and risk for metabolic glucose disorders: a 10-year follow-up study. *European journal of clinical investigation*, 38(6), 389–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01957.x>
125. Gutiérrez O. M. (2013). Sodium- and phosphorus-based food additives: persistent but surmountable hurdles in the management of nutrition in chronic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*, 20(2), 150–156. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2012.10.008>

126. Gutiérrez-Casado, E., Khraiwesh, H., López-Domínguez, J. A., Montero-Guisado, J., López-Lluch, G., Navas, P., de Cabo, R., Ramsey, J. J., González-Reyes, J. A., y Villalba, J. M. (2019). The Impact of Aging, Calorie Restriction and Dietary Fat on Autophagy Markers and Mitochondrial Ultrastructure and Dynamics in Mouse Skeletal Muscle. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 74(6), 760–769. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly161>
127. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., y Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(3), 753–xi. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.07.002>
128. Hall, J. (2016). Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y el fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En: *Guyton y Hall. Compendio de Fisiología Médica*. (13ª ed., p. 1001-1016). Elsevier.
129. Hämmäläinen, N., y Pette, D. (1995). Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. *Microscopy research and technique*, 30(5), 381–389. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070300505>
130. Hamano T. (2015). Klotho upregulation by rapamycin protects against vascular disease in CKD. *Kidney international*, 88(4), 660–662. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.223>
131. Hamasaki H. (2017). Lower Extremity Skeletal Muscle Mass, but Not Upper Extremity Skeletal Muscle Mass, Is Inversely Associated with

- Hospitalization in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of diabetes research*, 2017, 2303467. <https://doi.org/10.1155/2017/2303467>
132. Hamrahian, S. M., y Falkner, B. (2017). Hypertension in Chronic Kidney Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, 956, 307–325. https://doi.org/10.1007/5584_2016_84
133. Hanks, L. J., Casazza, K., Judd, S. E., Jenny, N. S., y Gutiérrez, O. M. (2015). Associations of fibroblast growth factor-23 with markers of inflammation, insulin resistance and obesity in adults. *PloS one*, 10(3), e0122885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122885>
134. Hardie D. G. (2011). Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 70(1), 92–99. <https://doi.org/10.1017/S0029665110003915>
135. Hasegawa, H., Nagano, N., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Iijima, K., Fujita, T., Yamashita, T., Fukumoto, S., y Shimada, T. (2010). Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney international*, 78(10), 975–980. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.313>
136. Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., y Jurutka, P. W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of bone and mineral research: the*

- official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13(3), 325–349. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.3.325>
137. Haut, L. L., Alfrey, A. C., Guggenheim, S., Buddington, B., y Schrier, N. (1980). Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney international*, 17(6), 722–731. <https://doi.org/10.1038/ki.1980.85>
138. Hearn, M. A., Hammond, K. M., Fell, J. M., y Morton, J. P. (2018). Regulation of Muscle Glycogen Metabolism during Exercise: Implications for Endurance Performance and Training Adaptations. *Nutrients*, 10(3), 298. <https://doi.org/10.3390/nu10030298>
139. Heitman, J., Movva, N. R., y Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5022), 905–909. <https://doi.org/10.1126/science.1715094>
140. Hepple, R. T., Qin, M., Nakamoto, H., y Goto, S. (2008). Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle: implications for sarcopenia. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(4), R1231–R1237. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90478.2008>
141. Herzig, S., y Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(2), 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
142. Hoek van den, A. M., Zondag, G., Verschuren, L., Ruiter de, C., Attema, J., Wit de, E. C., Schwerk, A., Guigas, B., Lek, S., Rietman, A., Strijker,

- R., y Kleemann, R. (2019). A novel nutritional supplement prevents muscle loss and accelerates muscle mass recovery in caloric-restricted mice. *Metabolism: clinical and experimental*, 97, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.05.012>
143. Holick M. F. (2017). The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 18(2), 153–165. <https://doi.org/10.1007/s11154-017-9424-1>
144. Holloszy J. O. (2000). The biology of aging. *Mayo Clinic proceedings*, 75 Suppl, S3–S9. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(19\)30634-2](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(19)30634-2)
145. Holsen, L. M., Savage, C. R., Martin, L. E., Bruce, A. S., Lepping, R. J., Ko, E., Brooks, W. M., Butler, M. G., Zarcone, J. R., y Goldstein, J. M. (2012). Importance of reward and prefrontal circuitry in hunger and satiety: Prader-Willi syndrome vs simple obesity. *International journal of obesity (2005)*, 36(5), 638–647. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.204>
146. Hoppeler, H., y Flück, M. (2002). Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *The Journal of experimental biology*, 205(Pt 15), 2143–2152.
147. Huang S. (2020). mTOR Signaling in Metabolism and Cancer. *Cells*, 9(10), 2278. <https://doi.org/10.3390/cells9102278>
148. Ingram, D. K., y de Cabo, R. (2017). Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing research reviews*, 39, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.05.008>

149. Instituto Nacional de Estadística (INE) (2020, 10 de Diciembre). *Defunciones según la Causa de Muerte. Avance enero-mayo de 2019 y de 2020*. Instituto Nacional de Estadística.
https://www.ine.es/prensa/edcm_ene_may_19_20.pdf
150. Janzen, N. R., Whitfield, J., y Hoffman, N. J. (2018). Interactive Roles for AMPK and Glycogen from Cellular Energy Sensing to Exercise Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3344.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113344>
151. Jean, G., Souberbielle, J. C., y Chazot, C. (2017). Vitamin D in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients. *Nutrients*, 9(4), 328.
<https://doi.org/10.3390/nu9040328>
152. Judd, S. E., y Tangpricha, V. (2009). Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *The American journal of the medical sciences*, 338(1), 40–44. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181aace91>
153. Kabadi, S. M., Lee, B. K., y Liu, L. (2012). Joint effects of obesity and vitamin D insufficiency on insulin resistance and type 2 diabetes: results from the NHANES 2001-2006. *Diabetes care*, 35(10), 2048–2054.
<https://doi.org/10.2337/dc12-0235>
154. Kalantar-Zadeh, K., Rhee, C. M., Chou, J., Ahmadi, S. F., Park, J., Chen, J. L., y Amin, A. N. (2017). The Obesity Paradox in Kidney Disease: How to Reconcile it with Obesity Management. *Kidney international reports*, 2(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2017.01.009>

-
155. Kanbay, M., Vervloet, M., Cozzolino, M., Siriopol, D., Covic, A., Goldsmith, D., y Solak, Y. (2017). Novel Faces of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23): Iron Deficiency, Inflammation, Insulin Resistance, Left Ventricular Hypertrophy, Proteinuria and Acute Kidney Injury. *Calcified tissue international*, 100(3), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0206-7>
156. Kaur, G., Singh, J., y Kumar, J. (2019). Vitamin D and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 34(12), 2509–2522. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4088-y>
157. Kawai, M., Kinoshita, S., Ozono, K., y Michigami, T. (2016). Inorganic Phosphate Activates the AKT/mTORC1 Pathway and Shortens the Life Span of an α -Klotho-Deficient Model. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 27(9), 2810–2824. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015040446>
158. Kawai, M., Kinoshita, S., Ozono, K., y Michigami, T. (2020). Lack of PTEN in osteocytes increases circulating phosphate concentrations by decreasing intact fibroblast growth factor 23 levels. *Scientific reports*, 10(1), 21501. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78692-6>
159. Kawamoto, K., Sakuma, M., Tanaka, S., Masuda, M., Nakao-Muraoka, M., Niida, Y., Nakamatsu, Y., Ito, M., Taketani, Y., y Arai, H. (2020). High-fat diets provoke phosphorus absorption from the small intestine in

- rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 72, 110694.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110694>
160. Kayaniyil, S., Vieth, R., Retnakaran, R., Knight, J. A., Qi, Y., Gerstein, H. C., Perkins, B. A., Harris, S. B., Zinman, B., y Hanley, A. J. (2010). Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes care*, 33(6), 1379–1381.
<https://doi.org/10.2337/dc09-2321>
161. Kazama, J. J., Iwasaki, Y., y Fukagawa, M. (2013). Uremic osteoporosis. *Kidney international supplements*, 3(5), 446–450.
<https://doi.org/10.1038/kisup.2013.93>
162. Kempe, D. S., Dërmaku-Sopjani, M., Fröhlich, H., Sopjani, M., Umbach, A., Puchchakayala, G., Capasso, A., Weiss, F., Stübs, M., Föller, M., y Lang, F. (2010). Rapamycin-induced phosphaturia. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 25(9), 2938–2944.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfq172>
163. Kestenbaum, B., Sachs, M. C., Hoofnagle, A. N., Siscovick, D. S., Ix, J. H., Robinson-Cohen, C., Lima, J. A., Polak, J. F., Blondon, M., Ruzinski, J., Rock, D., y de Boer, I. H. (2014). Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular disease in the general population: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation. Heart failure*, 7(3), 409–417.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000952>

164. Kestenbaum, B., Sampson, J. N., Rudser, K. D., Patterson, D. J., Seliger, S. L., Young, B., Sherrard, D. J., y Andress, D. L. (2005). Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(2), 520–528. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004070602>
165. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group (2009). KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney international. Supplement*, (113), S1–S130. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.188>
166. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work Group (2017). KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney international supplements*, 7(1), 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.04.001>
167. Kir, S., Komaba, H., Garcia, A. P., Economopoulos, K. P., Liu, W., Lanske, B., Hodin, R. A., y Spiegelman, B. M. (2016). PTH/PTHrP Receptor Mediates Cachexia in Models of Kidney Failure and Cancer. *Cell metabolism*, 23(2), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.003>
168. Kovesdy, C. P., Anderson, J. E., y Kalantar-Zadeh, K. (2007). Inverse association between lipid levels and mortality in men with chronic kidney

- disease who are not yet on dialysis: effects of case mix and the malnutrition-inflammation-cachexia syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(1), 304–311.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006060674>
169. Kraut, J. A., y Madias, N. E. (2016). Metabolic Acidosis of CKD: An Update. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 67(2), 307–317.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.08.028>
170. Książek, A., Zagrodna, A., y Słowińska-Lisowska, M. (2019). Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes-A Narrative Review. *Nutrients*, 11(8), 1800.
<https://doi.org/10.3390/nu11081800>
171. Ku, E., Kopple, J. D., Johansen, K. L., McCulloch, C. E., Go, A. S., Xie, D., Lin, F., Hamm, L. L., He, J., Kusek, J. W., Navaneethan, S. D., Ricardo, A. C., Rincon-Choles, H., Smogorzewski, M., Hsu, C. Y., y CRIC Study Investigators (2018). Longitudinal Weight Change During CKD Progression and Its Association With Subsequent Mortality. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 71(5), 657–665. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.09.015>
172. Kuhla, A., Hahn, S., Butschkau, A., Lange, S., Wree, A., y Vollmar, B. (2014). Lifelong caloric restriction reprograms hepatic fat metabolism in

- mice. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69(8), 915–922. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt160>
173. Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., y Hall, M. N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*, 73(3), 585–596.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90144-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90144-f)
174. Lang, F., Leibrock, C., Pandyra, A. A., Stournaras, C., Wagner, C. A., y Föller, M. (2018). Phosphate Homeostasis, Inflammation and the Regulation of FGF-23. *Kidney & blood pressure research*, 43(6), 1742–1748. <https://doi.org/10.1159/000495393>
175. Laplante, M., y Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
176. Larsson, L., Degens, H., Li, M., Salviati, L., Lee, Y. I., Thompson, W., Kirkland, J. L., y Sandri, M. (2019). Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiological reviews*, 99(1), 427–511.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2017>
177. Lee, D., y Goldberg, A. L. (2013). SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *The Journal of biological chemistry*, 288(42), 30515–30526.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489716>
178. Lee, G. D., Wilson, M. A., Zhu, M., Wolkow, C. A., de Cabo, R., Ingram, D. K., y Zou, S. (2006). Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 5(6), 515–524.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00241.x>
179. Lee, S. J., Lee, I. K., y Jeon, J. H. (2020). Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2685. <https://doi.org/10.3390/ijms21082685>
180. Lee, Y. R., Chen, M., y Pandolfi, P. P. (2018). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(9), 547–562.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>
181. Li, Y., y Chen, Y. (2019). AMPK and Autophagy. *Advances in experimental medicine and biology*, 1206, 85–108.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_4
182. Liao, C. D., Chen, H. C., Huang, S. W., y Liou, T. H. (2019). The Role of Muscle Mass Gain Following Protein Supplementation Plus Exercise Therapy in Older Adults with Sarcopenia and Frailty Risks: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis of Randomized Trials. *Nutrients*, 11(8), 1713. <https://doi.org/10.3390/nu11081713>
183. Lim, K., Lu, T. S., Molostvov, G., Lee, C., Lam, F. T., Zehnder, D., y Hsiao, L. L. (2012). Vascular Klotho deficiency potentiates the

- development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation*, 125(18), 2243–2255. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.053405>
184. Lin, S. C., y Hardie, D. G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell metabolism*, 27(2), 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009>
185. Lindberg, K., Amin, R., Moe, O. W., Hu, M. C., Erben, R. G., Östman Wernerson, A., Lanske, B., Olauson, H., y Larsson, T. E. (2014). The kidney is the principal organ mediating klotho effects. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(10), 2169–2175. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013111209>
186. Lopez, I., Mendoza, F. J., Guerrero, F., Almaden, Y., Henley, C., Aguilera-Tejero, E., y Rodriguez, M. (2009). The calcimimetic AMG 641 accelerates regression of extraosseous calcification in uremic rats. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(6), F1376–F1385. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90737.2008>
187. Lopez, I., Pineda, C., Raya, A. I., Rodriguez-Ortiz, M. E., Diaz-Tocados, J. M., Rios, R., Rodriguez, J. M., Aguilera-Tejero, E., y Almaden, Y. (2017). Leptin directly stimulates parathyroid hormone secretion. *Endocrine*, 56(3), 675–678. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1207-z>

188. Lopez, I., Rodríguez-Ortiz, M. E., Almaden, Y., Guerrero, F., de Oca, A. M., Pineda, C., Shalhoub, V., Rodriguez, M., y Aguilera-Tejero, E. (2011). Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney international*, 80(5), 475–482. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.107>
189. Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
190. Lu, Y., Bradley, J. S., McCoski, S. R., Gonzalez, J. M., Ealy, A. D., y Johnson, S. E. (2017). Reduced skeletal muscle fiber size following caloric restriction is associated with calpain-mediated proteolysis and attenuation of IGF-1 signaling. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 312(5), R806–R815. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00400.2016>
191. Mace, M. L., Olgaard, K., y Lewin, E. (2020). New Aspects of the Kidney in the Regulation of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and Mineral Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8810. <https://doi.org/10.3390/ijms21228810>
192. Machuca-Gayet, I., Quinaux, T., Bertholet-Thomas, A., Gaillard, S., Claramunt-Taberner, D., Acquaviva-Bourdain, C., y Bacchetta, J. (2020). Bone Disease in Nephropathic Cystinosis: Beyond Renal

- Osteodystrophy. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3109.
<https://doi.org/10.3390/ijms21093109>
193. Maciejewski-Duval, A., Comarmond, C., Leroyer, A., Zaidan, M., Le Joncour, A., Desbois, A. C., Fouret, J. P., Koskas, F., Cluzel, P., Garrido, M., Cacoub, P., y Saadoun, D. (2018). mTOR pathway activation in large vessel vasculitis. *Journal of autoimmunity*, 94, 99–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.07.013>
194. Mak, R. H., y Cheung, W. (2006). Energy homeostasis and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 21(12), 1807–1814. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0194-3>
195. Mak, R. H., Cheung, W. W., y Gertler, A. (2014). Exploiting the therapeutic potential of leptin signaling in cachexia. *Current opinion in supportive and palliative care*, 8(4), 352–357.
<https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000092>
196. Makki, K., Taront, S., Molendi-Coste, O., Bouchaert, E., Neve, B., Eury, E., Lobbens, S., Labalette, M., Duez, H., Staels, B., Dombrowicz, D., Froguel, P., y Wolowczuk, I. (2014). Beneficial metabolic effects of rapamycin are associated with enhanced regulatory cells in diet-induced obese mice. *PloS one*, 9(4), e92684.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092684>
197. Maljaars, J., Peters, H. P., y Masclee, A. M. (2007). Review article: The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food

- intake. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26 Suppl 2, 241–250.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03550.x>
198. Malvi, P., Piprode, V., Chaube, B., Pote, S. T., Mittal, M., Chattopadhyay, N., Wani, M. R., y Bhat, M. K. (2014). High fat diet promotes achievement of peak bone mass in young rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 455(1-2), 133–138.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.131>
199. Mani, B. K., Shankar, K., y Zigman, J. M. (2019). Ghrelin's Relationship to Blood Glucose. *Endocrinology*, 160(5), 1247–1261.
<https://doi.org/10.1210/en.2019-00074>
200. Mansouri, L., Lundwall, K., Moshfegh, A., Jacobson, S. H., Lundahl, J., y Spaak, J. (2017). Vitamin D receptor activation reduces inflammatory cytokines and plasma MicroRNAs in moderate chronic kidney disease - a randomized trial. *BMC nephrology*, 18(1), 161.
<https://doi.org/10.1186/s12882-017-0576-8>
201. Marsell, R., Mirza, M. A., Mallmin, H., Karlsson, M., Mellström, D., Orwoll, E., Ohlsson, C., Jonsson, K. B., Ljunggren, O., y Larsson, T. E. (2009). Relation between fibroblast growth factor-23, body weight and bone mineral density in elderly men. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 20(7), 1167–1173. <https://doi.org/10.1007/s00198-008-0780-2>

-
202. Martin, A., y Freyssenet, D. (2021). Phenotypic features of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass and function: lessons from human and animal studies. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 12(2), 252–273. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12678>
203. Martin, A. M., Sun, E. W., y Keating, D. J. (2019). Mechanisms controlling hormone secretion in human gut and its relevance to metabolism. *The Journal of endocrinology*, 244(1), R1–R15. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0399>
204. Masuyama, R., Stockmans, I., Torrekens, S., Van Looveren, R., Maes, C., Carmeliet, P., Bouillon, R., y Carmeliet, G. (2006). Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *The Journal of clinical investigation*, 116(12), 3150–3159. <https://doi.org/10.1172/JCI29463>
205. McKiernan, S. H., Bua, E., McGorray, J., y Aiken, J. (2004). Early-onset calorie restriction conserves fiber number in aging rat skeletal muscle. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(3), 580–581. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0667fje>
206. McKiernan, S. H., Colman, R. J., Lopez, M., Beasley, T. M., Aiken, J. M., Anderson, R. M., y Weindruch, R. (2011). Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Experimental gerontology*, 46(1), 23–29.

- <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.09.011>
207. Mejia, E., y Pearlman, M. (2019). Natural Alternative Sweeteners and Diabetes Management. *Current diabetes reports*, 19(12), 142.
<https://doi.org/10.1007/s11892-019-1273-8>
208. Meléndez-Hevia, E. (2011, 07 de Febrero). *Metabolismo energético*. Instituto del metabolismo celular.
<https://www.metabolismo.biz/web/metabolismo-energetico/>
209. Merz, K. E., y Thurmond, D. C. (2020). Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. *Comprehensive Physiology*, 10(3), 785–809. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190029>
210. Migliaccio, S., Greco, E. A., Fornari, R., Donini, L. M., y Lenzi, A. (2011). Is obesity in women protective against osteoporosis?. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 4, 273–282.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S11920>
211. Minetto, M. A., Giannini, A., McConnell, R., Busso, C., Torre, G., y Massazza, G. (2020). Common Musculoskeletal Disorders in the Elderly: The Star Triad. *Journal of clinical medicine*, 9(4), 1216.
<https://doi.org/10.3390/jcm9041216>
212. Moe, S., Drüeke, T., Cunningham, J., Goodman, W., Martin, K., Olgaard, K., Ott, S., Sprague, S., Lameire, N., Eknoyan, G., y Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (2006). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney

- Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international*, 69(11), 1945–1953. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000414>
213. Molina, P., Carrero, J. J., Bover, J., Chauveau, P., Mazzaferro, S., Torres, P. U., y European Renal Nutrition (ERN) and Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Working Groups of the European Renal Association-European Dialysis Transplant Association (ERA-EDTA) (2017). Vitamin D, a modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 8(5), 686–701. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12218>
214. Montenegro, K. R., Cruzat, V., Carlessi, R., y Newsholme, P. (2019). Mechanisms of vitamin D action in skeletal muscle. *Nutrition research reviews*, 32(2), 192–204. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000064>
215. Morales, E., Valero, M. A., León, M., Hernández, E., y Praga, M. (2003). Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 41(2), 319–327. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2003.50039>
216. Morley, J. E., Thomas, D. R., y Wilson, M. M. (2006). Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *The American journal of clinical nutrition*, 83(4), 735–743. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.4.735>

217. Most, J., Tosti, V., Redman, L. M., y Fontana, L. (2017). Calorie restriction in humans: An update. *Ageing research reviews*, 39, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.005>
218. Mujika, I., Rønnestad, B. R., y Martin, D. T. (2016). Effects of Increased Muscle Strength and Muscle Mass on Endurance-Cycling Performance. *International journal of sports physiology and performance*, 11(3), 283–289. <https://doi.org/10.1123/IJSPP.2015-0405>
219. Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., y Hu, W. S. (2016). Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends in biotechnology*, 34(8), 638–651. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.012>
220. Munday, M. R., Campbell, D. G., Carling, D., y Hardie, D. G. (1988). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry*, 175(2), 331–338. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14201.x>
221. Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., y Kato, S. (1999). Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology*, 140(5), 2224–2231. <https://doi.org/10.1210/endo.140.5.6691>

222. Navarro-González, J. F., Donate-Correa, J., Muros de Fuentes, M., Pérez-Hernández, H., Martínez-Sanz, R., y Mora-Fernández, C. (2014). Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Heart (British Cardiac Society)*, *100*(1), 34–40.
<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304746>
223. Nemoto, Y., Kumagai, T., Ishizawa, K., Miura, Y., Shiraishi, T., Morimoto, C., Sakai, K., Omizo, H., Yamazaki, O., Tamura, Y., Fujigaki, Y., Kawachi, H., Kuro-O, M., Uchida, S., y Shibata, S. (2019). Phosphate binding by sucroferric oxyhydroxide ameliorates renal injury in the remnant kidney model. *Scientific reports*, *9*(1), 1732.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38389-3>
224. Noce, A., Marrone, G., Ottaviani, E., Guerriero, C., Daniele di, F., Pietroboni Zaitseva, A., y Daniele di, N. (2021). Uremic Sarcopenia and Its Possible Nutritional Approach. *Nutrients*, *13*(1), 147.
<https://doi.org/10.3390/nu13010147>
225. Obici, S., y Rossetti, L. (2003). Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology*, *144*(12), 5172–5178. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0999>
226. Omodei, D., y Fontana, L. (2011). Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS letters*, *585*(11), 1537–1542.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.015>

227. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2019). *The Heavy Burden of Obesity: The Economics of Prevention*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/67450d67-en>
228. Ortiz, A., Sanchez-Niño, M. D., Crespo-Barrio, M., De-Sequera-Ortiz, P., Fernández-Giráldez, E., García-Maset, R., Macía-Heras, M., Pérez-Fontán, M., Rodríguez-Portillo, M., Salgueira-Lazo, M., Sánchez-Álvarez, E., Santamaría-Olmo, R., Simal-Blanco, F., y Pino-Pino, M. D. (2019). The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. *Nefrología*, 39(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.09.002>
229. Panwar, B., Jenny, N. S., Howard, V. J., Wadley, V. G., Muntner, P., Kissela, B. M., Judd, S. E., y Gutiérrez, O. M. (2015). Fibroblast growth factor 23 and risk of incident stroke in community-living adults. *Stroke*, 46(2), 322–328. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007489>
230. Park, B. S., Henning, P. C., Grant, S. C., Lee, W. J., Lee, S. R., Arjmandi, B. H., y Kim, J. S. (2013). HMB attenuates muscle loss during sustained energy deficit induced by calorie restriction and endurance exercise. *Metabolism: clinical and experimental*, 62(12), 1718–1729. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.06.005>

231. Park, S. Y., Choi, G. H., Choi, H. I., Ryu, J., Jung, C. Y., y Lee, W. (2005). Calorie restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Archives of biochemistry and biophysics*, 436(2), 276–284.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.01.010>
232. Peacock M. (2010). Calcium metabolism in health and disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 5 Suppl 1, S23–S30. <https://doi.org/10.2215/CJN.05910809>
233. Peacock M. (2021). Phosphate Metabolism in Health and Disease. *Calcified tissue international*, 108(1), 3–15.
<https://doi.org/10.1007/s00223-020-00686-3>
234. Pelton, K., Krieder, J., Joiner, D., Freeman, M. R., Goldstein, S. A., y Solomon, K. R. (2012). Hypercholesterolemia promotes an osteoporotic phenotype. *The American journal of pathology*, 181(3), 928–936.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.05.034>
235. Pena-Leon, V., Perez-Lois, R., y Seoane, L. M. (2020). mTOR Pathway is Involved in Energy Homeostasis Regulation as a Part of the Gut-Brain Axis. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5715.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165715>
236. Peng, H., Liu, J., Sun, Q., Chen, R., Wang, Y., Duan, J., Li, C., Li, B., Jing, Y., Chen, X., Mao, Q., Xu, K. F., Walker, C. L., Li, J., Wang, J., y

- Zhang, H. (2013). mTORC1 enhancement of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ entry constrains tuberous sclerosis complex-related tumor development. *Oncogene*, 32(39), 4702–4711.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.481>
237. Peralta-Ramírez, A., Montes de Oca, A., Raya, A. I., Pineda, C., López, I., Guerrero, F., Diez, E., Muñoz-Castañeda, J. R., Martínez, J., Almaden, Y., Rodríguez, M., y Aguilera-Tejero, E. (2014). Vitamin E protection of obesity-enhanced vascular calcification in uremic rats. *American journal of physiology. Renal physiology*, 306(4), F422–F429.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00355.2013>
238. Phillips, T., y Leeuwenburgh, C. (2005). Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6), 668–670.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2870fje>
239. Pineda, C., Rios, R., Raya, A. I., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E., y Lopez, I. (2018). Hypocaloric Diet Prevents the Decrease in FGF21 Elicited by High Phosphorus Intake. *Nutrients*, 10(10), 1496.
<https://doi.org/10.3390/nu10101496>
240. Pons, V., Riera, J., Capó, X., Martorell, M., Sureda, A., Tur, J. A., Drobnic, F., y Pons, A. (2018). Calorie restriction regime enhances physical performance of trained athletes. *Journal of the International*

- Society of Sports Nutrition*, 15, 12. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0214-2>
241. Poret, J. M., Souza-Smith, F., Marcell, S. J., Gaudet, D. A., Tzeng, T. H., Braymer, H. D., Harrison-Bernard, L. M., y Primeaux, S. D. (2018). High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *International journal of obesity (2005)*, 42(3), 535–541. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.280>
242. Prakriya, M., y Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological reviews*, 95(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
243. Prescod, A. L., Halliday, W. C., y Taylor, C. G. (2011). Protein deficiency, but not zinc deficiency, reduces recovery of type 1 and type 2 muscle fibre diameters in the gastrocnemius muscle of growing rats. *The British journal of nutrition*, 106(5), 675–682. <https://doi.org/10.1017/S0007114511000699>
244. Puente Yagüe de la, M., Collado Yurrita, L., Ciudad Cabañas, M. J., y Cuadrado Cenzual, M. A. (2020). Role of Vitamin D in Athletes and Their Performance: Current Concepts and New Trends. *Nutrients*, 12(2), 579. <https://doi.org/10.3390/nu12020579>
245. Puthuchery, Z. A., Astin, R., Mcphail, M., Saeed, S., Pasha, Y., Bear, D. E., Constantin, D., Velloso, C., Manning, S., Calvert, L., Singer, M.,

- Batterham, R. L., Gomez-Romero, M., Holmes, E., Steiner, M. C., Atherton, P. J., Greenhaff, P., Edwards, L. M., Smith, K., Harridge, S. D., ... Montgomery, H. E. (2018). Metabolic phenotype of skeletal muscle in early critical illness. *Thorax*, *73*(10), 926–935.
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211073>
246. Raya, A. I., Rios, R., Pineda, C., Rodriguez-Ortiz, M. E., Diez, E., Almaden, Y., Muñoz-Castañeda, J. R., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E., y Lopez, I. (2016). Energy-dense diets increase FGF23, lead to phosphorus retention and promote vascular calcifications in rats. *Scientific reports*, *6*, 36881. <https://doi.org/10.1038/srep36881>
247. Rios, R., Pineda, C., Lopez, I., Muñoz-Castañeda, J., Rodriguez, M., Aguilera-Tejero, E., y Raya, A. I. (2018). Phosphorus restriction does not prevent the increase in fibroblast growth factor 23 elicited by high fat diet. *PloS one*, *13*(6), e0198481.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198481>
248. Rios, R., Raya, A. I., Pineda, C., Rodriguez, M., Lopez, I., y Aguilera-Tejero, E. (2017). Vitamin E protects against extraskeletal calcification in uremic rats fed high fat diets. *BMC nephrology*, *18*(1), 374.
<https://doi.org/10.1186/s12882-017-0790-4>
249. Ritter R. C. (2004). Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiology & behavior*, *81*(2), 249–273.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.012>

250. Rivero, J. L., Talmadge, R. J., y Edgerton, V. R. (1999). Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry and cell biology*, *111*(4), 277–287. <https://doi.org/10.1007/s004180050358>
251. Robinson, S. M., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., Shaw, S. C., Kanis, J. A., Bautmans, I., Bischoff-Ferrari, H., Bruyère, O., Cesari, M., Dawson-Hughes, B., Fielding, R. A., Kaufman, J. M., Landi, F., Malafarina, V., Rolland, Y., van Loon, L. J., Vellas, B., Visser, M., Cooper, C., y ESCEO working group (2018). Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia?. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *37*(4), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.08.016>
252. Rodelo-Haad, C., Pendón-Ruiz de Mier, M. V., Díaz-Tocados, J. M., Martin-Malo, A., Santamaria, R., Muñoz-Castañeda, J. R., y Rodríguez, M. (2020). The Role of Disturbed Mg Homeostasis in Chronic Kidney Disease Comorbidities. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 543099. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.543099>
253. Rodelo-Haad, C., Santamaria, R., Muñoz-Castañeda, J. R., Pendón-Ruiz de Mier, M. V., Martin-Malo, A., y Rodríguez, M. (2019). FGF23, Biomarker or Target?. *Toxins*, *11*(3), 175. <https://doi.org/10.3390/toxins11030175>
254. Rodríguez, A., Catalán, V., Becerril, S., Gil, M. J., Mugueta, C., Gómez-Ambrosi, J., y Frühbeck, G. (2008). Impaired adiponectin-AMPK

- signalling in insulin-sensitive tissues of hypertensive rats. *Life sciences*, 83(15-16), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.07.022>
255. Rodríguez, M., López, I., Muñoz, J., Aguilera-Tejero, E., y Almaden, Y. (2012). FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 32(3), 275–278. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012.Mar.11415>
256. Rodriguez, M., Martin-Malo, A., Martinez, M. E., Torres, A., Felsenfeld, A. J., y Llach, F. (1991). Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of phosphorus and its effect on calcitriol. *Kidney international*, 40(6), 1055–1062. <https://doi.org/10.1038/ki.1991.314>
257. Rodríguez-Ortiz, M. E., Díaz-Tocados, J. M., Muñoz-Castañeda, J. R., Herencia, C., Pineda, C., Martínez-Moreno, J. M., Montes de Oca, A., López-Baltanás, R., Alcalá-Díaz, J., Ortiz, A., Aguilera-Tejero, E., Felsenfeld, A., Rodríguez, M., y Almadén, Y. (2020). Inflammation both increases and causes resistance to FGF23 in normal and uremic rats. *Clinical science (London, England: 1979)*, 134(1), 15–32. <https://doi.org/10.1042/CS20190779>
258. Rodríguez-Ortiz, M. E., y Rodríguez, M. (2020). Recent advances in understanding and managing secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-1077. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22636.1>

259. Roubenoff, R., y Castaneda, C. (2001). Sarcopenia-understanding the dynamics of aging muscle. *JAMA*, 286(10), 1230–1231.
<https://doi.org/10.1001/jama.286.10.1230>
260. Roy, T. A., Blackman, M. R., Harman, S. M., Tobin, J. D., Schragger, M., y Metter, E. J. (2002). Interrelationships of serum testosterone and free testosterone index with FFM and strength in aging men. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 283(2), E284–E294.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00334.2001>
261. Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., y Abraham, R. T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 270(2), 815–822.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.815>
262. Salam, S. N., Eastell, R., y Khwaja, A. (2014). Fragility fractures and osteoporosis in CKD: pathophysiology and diagnostic methods. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 63(6), 1049–1059. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.12.016>
263. Santamaría, R., Díaz-Tocados, J. M., Pendón-Ruiz de Mier, M. V., Robles, A., Salmerón-Rodríguez, M. D., Ruiz, E., Vergara, N., Aguilera-Tejero, E., Raya, A., Ortega, R., Felsenfeld, A., Muñoz-Castañeda, J. R., Martín-Malo, A., Aljama, P., y Rodríguez, M. (2018). Increased

- Phosphaturia Accelerates The Decline in Renal Function: A Search for Mechanisms. *Scientific reports*, 8(1), 13701.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32065-2>
264. Saponaro, F., Saba, A., y Zucchi, R. (2020). An Update on Vitamin D Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6573.
<https://doi.org/10.3390/ijms21186573>
265. Sarathy, S., Sullivan, C., Leon, J. B., y Sehgal, A. R. (2008). Fast food, phosphorus-containing additives, and the renal diet. *Journal of renal nutrition: the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, 18(5), 466–470.
<https://doi.org/10.1053/j.jrn.2008.05.007>
266. Saunders, R. N., Metcalfe, M. S., y Nicholson, M. L. (2001). Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney international*, 59(1), 3–16. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00460.x>
267. Savastano, S., Barrea, L., Savanelli, M. C., Nappi, F., Di Somma, C., Orio, F., y Colao, A. (2017). Low vitamin D status and obesity: Role of nutritionist. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 18(2), 215–225.
<https://doi.org/10.1007/s11154-017-9410-7>
268. Savvidis, C., Tournis, S., y Dede, A. D. (2018). Obesity and bone metabolism. *Hormones (Athens, Greece)*, 17(2), 205–217.
<https://doi.org/10.1007/s42000-018-0018-4>

269. Schiaffino S. (2018). Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *The FEBS journal*, 285(20), 3688–3694. <https://doi.org/10.1111/febs.14502>
270. Schiaffino, S., y Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
271. Schoell, S. L., Weaver, A. A., Beavers, D. P., Lenchik, L., Marsh, A. P., Rejeski, W. J., Stitzel, J. D., y Beavers, K. M. (2018). Development of Subject-Specific Proximal Femur Finite Element Models Of Older Adults with Obesity to Evaluate the Effects of Weight Loss on Bone Strength. *Journal of osteoporosis and physical activity*, 6(1), 213. <https://doi.org/10.4172/2329-9509.1000213>
272. Schoor van, N. M., Visser, M., Pluijm, S. M., Kuchuk, N., Smit, J. H., y Lips, P. (2008). Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. *Bone*, 42(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.11.002>
273. Scialla, J. J., Xie, H., Rahman, M., Anderson, A. H., Isakova, T., Ojo, A., Zhang, X., Nessel, L., Hamano, T., Grunwald, J. E., Raj, D. S., Yang, W., He, J., Lash, J. P., Go, A. S., Kusek, J. W., Feldman, H., Wolf, M., y Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Investigators (2014). Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(2), 349–360. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013050465>

274. Shafie, A., Rahimi, A. M., Ahmadi, I., Nabavizadeh, F., Ranjbaran, M., y Ashabi, G. (2020). High-protein and low-calorie diets improved the anti-aging Klotho protein in the rats' brain: the toxic role of high-fat diet. *Nutrition & metabolism*, 17, 86. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00508-1>
275. Shalhoub, V., Shatzen, E. M., Ward, S. C., Davis, J., Stevens, J., Bi, V., Renshaw, L., Hawkins, N., Wang, W., Chen, C., Tsai, M. M., Cattley, R. C., Wronski, T. J., Xia, X., Li, X., Henley, C., Eschenberg, M., y Richards, W. G. (2012). FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2543–2553. <https://doi.org/10.1172/JCI61405>
276. Shapses, S. A., y Sukumar, D. (2012). Bone metabolism in obesity and weight loss. *Annual review of nutrition*, 32, 287–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104655>
277. Shapses, S. A., y Riedt, C. S. (2006). Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns?. *The Journal of nutrition*, 136(6), 1453–1456. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1453>
278. Shen, G., Ren, H., Qiu, T., Zhang, Z., Zhao, W., Yu, X., Huang, J., Tang, J., Liang, D., Yao, Z., Yang, Z., y Jiang, X. (2018). Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in osteoporosis. *Journal of cellular physiology*, 233(5), 3929–3944. <https://doi.org/10.1002/jcp.26161>

279. Sheu, Y., y Cauley, J. A. (2011). The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism. *Current osteoporosis reports*, 9(2), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s11914-011-0051-6>
280. Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S., y Yamashita, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19(3), 429–435. <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301264>
281. Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., y Yamashita, T. (2004). Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 113(4), 561–568. <https://doi.org/10.1172/JCI19081>
282. Silver, J., y Naveh-Many, T. (2009). Phosphate and the parathyroid. *Kidney international*, 75(9), 898–905. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.642>
283. Singh, G., y Krishan, P. (2019). Dietary restriction regimens for fighting kidney disease: Insights from rodent studies. *Experimental gerontology*, 128, 110738. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110738>

284. Slee A. D. (2012). Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & metabolism*, 9(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-36>
285. Sood, S., Chen, Y., McIntire, K., y Rabkin, R. (2014). Acute acidosis attenuates leucine stimulated signal transduction and protein synthesis in rat skeletal muscle. *American journal of nephrology*, 40(4), 362–370. <https://doi.org/10.1159/000366524>
286. Speakman, J. R., y Mitchell, S. E. (2011). Caloric restriction. *Molecular aspects of medicine*, 32(3), 159–221. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.07.001>
287. Speakman, J. R., y Westerterp, K. R. (2010). Reverse epidemiology, obesity and mortality in chronic kidney disease: modelling mortality expectations using energetics. *Blood purification*, 29(2), 150–157. <https://doi.org/10.1159/000245642>
288. Steinberg, G. R., y Carling, D. (2019). AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(7), 527–551. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0019-2>
289. St-Jean-Pelletier, F., Pion, C. H., Leduc-Gaudet, J. P., Sgarioto, N., Zovilé, I., Barbat-Artigas, S., Reynaud, O., Alkaterji, F., Lemieux, F. C., Grenon, A., Gaudreau, P., Hepple, R. T., Chevalier, S., Belanger, M., Morais, J. A., Aubertin-Leheudre, M., y Gousspillou, G. (2017). The impact of ageing, physical activity, and pre-frailty on skeletal muscle phenotype,

- mitochondrial content, and intramyocellular lipids in men. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 8(2), 213–228.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12139>
290. Stockinger, J., Maxwell, N., Shapiro, D., deCabo, R., y Valdez, G. (2017). Caloric Restriction Mimetics Slow Aging of Neuromuscular Synapses and Muscle Fibers. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 73(1), 21–28. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx023>
291. Sun, M., Wu, X., Yu, Y., Wang, L., Xie, D., Zhang, Z., Chen, L., Lu, A., Zhang, G., y Li, F. (2020). Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Proteomics/Metabolomics-Based Research. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 576110.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576110>
292. Takashi, Y., y Fukumoto, S. (2018). FGF23 beyond Phosphotropic Hormone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 29(11), 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.08.006>
293. Takashi, Y., y Fukumoto, S. (2020). Phosphate-sensing and regulatory mechanism of FGF23 production. *Journal of endocrinological investigation*, 43(7), 877–883. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01205-9>
294. Takeda, E., Yamamoto, H., Yamanaka-Okumura, H., y Taketani, Y. (2014). Increasing dietary phosphorus intake from food additives: potential for negative impact on bone health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 5(1), 92–97. <https://doi.org/10.3945/an.113.004002>

295. Tataranni, T., Biondi, G., Cariello, M., Mangino, M., Colucci, G., Rutigliano, M., Ditunno, P., Schena, F. P., Gesualdo, L., y Grandaliano, G. (2011). Rapamycin-induced hypophosphatemia and insulin resistance are associated with mTORC2 activation and Klotho expression. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(8), 1656–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03590.x>
296. Thorens B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
297. Timper, K., y Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease models & mechanisms*, 10(6), 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
298. Ting, S. M., Nair, H., Ching, I., Taheri, S., y Dasgupta, I. (2009). Overweight, obesity and chronic kidney disease. *Nephron. Clinical practice*, 112(3), c121–c127. <https://doi.org/10.1159/000214206>
299. Titchenell, P. M., Lazar, M. A., y Birnbaum, M. J. (2017). Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(7), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>

300. Tokunaga, C., Yoshino, K., y Yonezawa, K. (2004). mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(2), 443–446.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.07.019>
301. Toprak, O., Kurt, H., Sarı, Y., Şarkış, C., Us, H., y Kırık, A. (2017). Magnesium Replacement Improves the Metabolic Profile in Obese and Pre-Diabetic Patients with Mild-to-Moderate Chronic Kidney Disease: A 3-Month, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Kidney & blood pressure research*, 42(1), 33–42. <https://doi.org/10.1159/000468530>
302. Tremblay, A., y Gilbert, J. A. (2011). Human obesity: is insufficient calcium/dairy intake part of the problem?. *Journal of the American College of Nutrition*, 30(5 Suppl 1), 449S–53S.
<https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719989>
303. Tsuji, K., Maeda, T., Kawane, T., Matsunuma, A., y Horiuchi, N. (2010). Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(8), 1711–1723.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.65>
304. Ureña-Torres, P., D'Marco, L., Raggi, P., García-Moll, X., Brandenburg, V., Mazzaferro, S., Lieber, A., Guirado, L., y Bover, J. (2020). Valvular heart disease and calcification in CKD: more common than

- appreciated. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 35(12), 2046–2053. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz133>
305. Valdez, G., Tapia, J. C., Kang, H., Clemenson, G. D., Jr, Gage, F. H., Lichtman, J. W., y Sanes, J. R. (2010). Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002220107>
306. Valentine, R. J., Coughlan, K. A., Ruderman, N. B., y Saha, A. K. (2014). Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser^{485/491} through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Archives of biochemistry and biophysics*, 562, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.013>
307. Veronese, N., Stubbs, B., Crepaldi, G., Solmi, M., Cooper, C., Harvey, N. C., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., Civitelli, R., Schofield, P., Maggi, S., y Lamb, S. E. (2017). Relationship Between Low Bone Mineral Density and Fractures With Incident Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 32(5), 1126–1135. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3089>

308. Vervloet M. (2019). Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. *Nature reviews. Nephrology*, 15(2), 109–120. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0087-2>
309. Viegas, C., Araújo, N., Marreiros, C., y Simes, D. (2019). The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in Chronic Kidney Disease (CKD): challenging old concepts with new facts. *Aging*, 11(12), 4274–4299. <https://doi.org/10.18632/aging.102046>
310. Vila Cuenca, M., Ferrantelli, E., Meinster, E., Pouw, S. M., Kovačević, I., de Menezes, R. X., Niessen, H. W., Beelen, R., Hordijk, P. L., y Vervloet, M. G. (2018). Vitamin D Attenuates Endothelial Dysfunction in Uremic Rats and Maintains Human Endothelial Stability. *Journal of the American Heart Association*, 7(17), e008776. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.008776>
311. Villareal, D. T., Fontana, L., Das, S. K., Redman, L., Smith, S. R., Saltzman, E., Bales, C., Rochon, J., Pieper, C., Huang, M., Lewis, M., Schwartz, A. V., y CALERIE Study Group (2016). Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-Obese Younger Adults: A Randomized Clinical Trial. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 31(1), 40–51. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2701>
312. Villareal, D. T., Fontana, L., Weiss, E. P., Racette, S. B., Steger-May, K., Schechtman, K. B., Klein, S., y Holloszy, J. O. (2006). Bone mineral

- density response to caloric restriction-induced weight loss or exercise-induced weight loss: a randomized controlled trial. *Archives of internal medicine*, 166(22), 2502–2510.
<https://doi.org/10.1001/archinte.166.22.2502>
313. Villareal, D. T., Kotyk, J. J., Armamento-Villareal, R. C., Kenguva, V., Seaman, P., Shahar, A., Wald, M. J., Kleerekoper, M., y Fontana, L. (2011). Reduced bone mineral density is not associated with significantly reduced bone quality in men and women practicing long-term calorie restriction with adequate nutrition. *Aging cell*, 10(1), 96–102.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00643.x>
314. Villa-Bellosta, R., Bogaert, Y. E., Levi, M., y Sorribas, V. (2007). Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(5), 1030–1036.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.132266>
315. Villa-Bellosta, R., Millan, A., y Sorribas, V. (2011). Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(1), C210–C220. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00229.2010>
316. Vimalaswaran, K. S., Berry, D. J., Lu, C., Tikkanen, E., Pilz, S., Hiraki, L. T., Cooper, J. D., Dastani, Z., Li, R., Houston, D. K., Wood, A. R., Michaëlsson, K., Vandenput, L., Zgaga, L., Yerges-Armstrong, L. M.,

- McCarthy, M. I., Dupuis, J., Kaakinen, M., Kleber, M. E., Jameson, K., ... Hyppönen, E. (2013). Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS medicine*, *10*(2), e1001383.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001383>
317. Vogt, I., Haffner, D., y Leifheit-Nestler, M. (2019). FGF23 and Phosphate-Cardiovascular Toxins in CKD. *Toxins*, *11*(11), 647.
<https://doi.org/10.3390/toxins11110647>
318. Vranić, L., Mikolašević, I., y Milić, S. (2019). Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity?. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *55*(9), 541. <https://doi.org/10.3390/medicina55090541>
319. Walrand, S., Zangarelli, A., Guillet, C., Salles, J., Soulier, K., Giraudet, C., Patrac, V., y Boirie, Y. (2011). Effect of fast dietary proteins on muscle protein synthesis rate and muscle strength in ad libitum-fed and energy-restricted old rats. *The British journal of nutrition*, *106*(11), 1683–1690.
<https://doi.org/10.1017/S0007114511002182>
320. Wang, S., Deng, Z., Ma, Y., Jin, J., Qi, F., Li, S., Liu, C., Lyu, F. J., y Zheng, Q. (2020). The Role of Autophagy and Mitophagy in Bone Metabolic Disorders. *International journal of biological sciences*, *16*(14), 2675–2691. <https://doi.org/10.7150/ijbs.46627>

321. Wang, S. Y., Cai, G. Y., y Chen, X. M. (2018). Energy restriction in renal protection. *The British journal of nutrition*, 120(10), 1149–1158.
<https://doi.org/10.1017/S0007114518002684>
322. Wang, Z. M., Pierson, R. N., Jr, y Heymsfield, S. B. (1992). The five-level model: a new approach to organizing body-composition research. *The American journal of clinical nutrition*, 56(1), 19–28.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/56.1.19>
323. Weiss, E. P., y Fontana, L. (2011). Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(4), H1205–H1219.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00685.2011>
324. Westenfeld, R., Schäfer, C., Krüger, T., Haarmann, C., Schurgers, L. J., Reutelingsperger, C., Ivanovski, O., Druke, T., Massy, Z. A., Ketteler, M., Floege, J., y Jahn-Dechent, W. (2009). Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(6), 1264–1274.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2008060572>
325. Wickman, C., y Kramer, H. (2013). Obesity and kidney disease: potential mechanisms. *Seminars in nephrology*, 33(1), 14–22.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.12.006>
326. Wimalawansa S. J. (2018). Associations of vitamin D with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *The Journal*

- of steroid biochemistry and molecular biology*, 175, 177–189.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.09.017>
327. Wojcik, M., Janus, D., Dolezal-Oltarzewska, K., Drozd, D., Sztefko, K., y Starzyk, J. B. (2012). The association of FGF23 levels in obese adolescents with insulin sensitivity. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*, 25(7-8), 687–690. <https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0064>
328. Wolfe, R. R., Klein, S., Carraro, F., y Weber, J. M. (1990). Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *The American journal of physiology*, 258(2 Pt 1), E382–E389. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1990.258.2.E382>
329. Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Ahmad, F., y Ima-Nirwana, S. (2018). Effects of metabolic syndrome on bone mineral density, histomorphometry and remodelling markers in male rats. *PloS one*, 13(2), e0192416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192416>
330. World Health Organization (WHO) (2020, 9 de Diciembre). *The top 10 causes of death*. WHO's Global Health Estimates. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
331. World Health Organization (2021, 11 de Junio). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. WHO's Global Health Estimates. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

332. Wortsman, J., Matsuoka, L. Y., Chen, T. C., Lu, Z., y Holick, M. F. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 72(3), 690–693. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.690>
333. Wu, M., Rementer, C., y Giachelli, C. M. (2013). Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcified tissue international*, 93(4), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9712-z>
334. Xie, K., Neff, F., Markert, A., Rozman, J., Aguilar-Pimentel, J. A., Amarie, O. V., Becker, L., Brommage, R., Garrett, L., Henzel, K. S., Hölter, S. M., Janik, D., Lehmann, I., Moreth, K., Pearson, B. L., Racz, I., Rathkolb, B., Ryan, D. P., Schröder, S., Treise, I., ... Ehninger, D. (2017). Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nature communications*, 8(1), 155. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00178-3>
335. Xu, F., Du, Y., Hang, S., Chen, A., Guo, F., y Xu, T. (2013). Adipocytes regulate the bone marrow microenvironment in a mouse model of obesity. *Molecular medicine reports*, 8(3), 823–828. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1572>
336. Xu, J., Ji, J., y Yan, X. H. (2012). Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(5), 373–381. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500245>

337. Xu, T., Sun, D., Chen, Y., y Ouyang, L. (2020). Targeting mTOR for fighting diseases: A revisited review of mTOR inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, *199*, 112391.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112391>
338. Xu, X. M., Cai, G. Y., Bu, R., Wang, W. J., Bai, X. Y., Sun, X. F., y Chen, X. M. (2015). Beneficial Effects of Caloric Restriction on Chronic Kidney Disease in Rodent Models: A Meta-Analysis and Systematic Review. *PloS one*, *10*(12), e0144442.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144442>
339. Yamada, S., y Giachelli, C. M. (2017). Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone*, *100*, 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.11.012>
340. Yamashita, T., Yoshioka, M., y Itoh, N. (2000). Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochemical and biophysical research communications*, *277*(2), 494–498.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3696>
341. Yan, Y., Zhou, X. E., Xu, H. E., y Melcher, K. (2018). Structure and Physiological Regulation of AMPK. *International journal of molecular sciences*, *19*(11), 3534. <https://doi.org/10.3390/ijms19113534>
342. Yoshida, S., Yamahara, K., Kume, S., Koya, D., Yasuda-Yamahara, M., Takeda, N., Osawa, N., Chin-Kanasaki, M., Adachi, Y., Nagao, K.,

- Maegawa, H., y Araki, S. I. (2018). Role of dietary amino acid balance in diet restriction-mediated lifespan extension, renoprotection, and muscle weakness in aged mice. *Aging cell*, 17(4), e12796.
<https://doi.org/10.1111/accel.12796>
343. Young, G. S., y Kirkland, J. B. (2007). Rat models of caloric intake and activity: relationships to animal physiology and human health. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 32(2), 161–176. <https://doi.org/10.1139/h06-082>
344. Zhang, B., Yan, J., Umbach, A. T., Fakhri, H., Fajol, A., Schmidt, S., Salker, M. S., Chen, H., Alexander, D., Spichtig, D., Daryadel, A., Wagner, C. A., Föller, M., y Lang, F. (2016). NFκB-sensitive Orai1 expression in the regulation of FGF23 release. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 94(5), 557–566. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1370-3>
345. Zhang, R., y Naughton, D. P. (2010). Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutrition journal*, 9, 65. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-65>
346. Zhao, S., Zhu, Y., Schultz, R. D., Li, N., He, Z., Zhang, Z., Caron, A., Zhu, Q., Sun, K., Xiong, W., Deng, H., Sun, J., Deng, Y., Kim, M., Lee, C. E., Gordillo, R., Liu, T., Odle, A. K., Childs, G. V., Zhang, N., ... Scherer, P. E. (2019). Partial Leptin Reduction as an Insulin Sensitization and Weight Loss Strategy. *Cell metabolism*, 30(4), 706–719.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.005>

-
347. Zhao, Y., Zhao, M. M., Cai, Y., Zheng, M. F., Sun, W. L., Zhang, S. Y., Kong, W., Gu, J., Wang, X., y Xu, M. J. (2015). Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney international*, 88(4), 711–721. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.160>
348. Zierath, J. R., y Hawley, J. A. (2004). Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS biology*, 2(10), e348. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020348>
349. Zununi Vahed, S., Mostafavi, S., Hosseiniyan Khatibi, S. M., Shoja, M. M., y Ardalan, M. (2020). Vascular Calcification: An Important Understanding in Nephrology. *Vascular health and risk management*, 16, 167–180. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S242685>

Producción científica

ARTÍCULO 1. Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR

Vidal A, Rios R, Pineda C, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, Raya AI. Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 1795. doi: 10.1038/s41598-020-58663-7.

OPEN

Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR

Angela Vidal^{1,2}, Rafael Rios^{1,2}, Carmen Pineda^{1,2}, Ignacio Lopez^{1,2},
Juan R. Muñoz-Castañeda^{1,2}, Mariano Rodríguez², Escolastico Aguilera-Tejero^{1,2,3*} &
Ana I. Raya^{1,2,3}

To test the hypothesis that fibroblast growth factor 23 (FGF23) is directly regulated by energy intake, *in vivo* and *in vitro* experiments were conducted. Three groups of rats were fed diets with high (HC), normal (NC) and low (LC) caloric content that resulted in different energy intake. *In vitro*, UMR106 cells were incubated in high (HG, 4.5 g/l) or low glucose (LG, 1 g/l) medium. Additional treatments included phosphorus (P), mannitol, rapamycin and everolimus. Intestinal absorption of P and plasma P concentrations were similar in the three groups of rats. As compared with NC, plasma FGF23 concentrations were increased in HC and decreased in the LC group. A significant correlation between energy intake and plasma FGF23 concentrations was observed. *In vitro*, mRNA FGF23 was significantly higher in UMR106 cells cultured in HG than in LG. When exposed to high P, mRNA FGF23 increased but only when cells were cultured in HG. Cells incubated with HG and mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibitors expressed low mRNA FGF23, similar to the values obtained in LG. In conclusion, this study shows a direct regulation of FGF23 production by energy availability and demonstrates that the mTOR signaling pathway plays a central role in this regulatory system.

Fibroblast growth factor 23 (FGF23) is a phosphaturic hormone secreted by osteocytes/osteoblasts that plays a major role in the regulation of mineral metabolism¹. The interaction of FGF23 with its receptor, FGFR1c, and its co-receptor, klotho, produces two distinct effects in the kidneys: (a) FGF23 increases phosphaturia by inducing internalization of the sodium-dependent phosphate (P) transporters (NaPi2a and NaPi2c)²; and, (b) FGF23 modulates vitamin D metabolism through downregulation of 1- α -hydroxylase (CYP27B1) and upregulation of 24-hydroxylase (CYP24A1), thus leading to a decrease in circulating calcitriol concentrations³.

Increased levels of FGF23, usually found in patients with renal failure, have been reported as a risk factor of cardiovascular mortality⁴. The relationship between high FGF23 and mortality is not restricted to patients with kidney disease but has also been identified in the general population^{4,5}.

Synthesis and secretion of FGF23 is regulated mainly by dietary P and increased P balance is thought to be the main stimulus for FGF23 secretion⁶. In addition, FGF23 production is under hormonal control by calcitriol, that decreases FGF23 synthesis⁷. Moreover, parathyroid hormone⁸, inflammation⁹ and iron deficiency¹⁰ have been reported to influence FGF23 production.

Epidemiological studies have suggested that FGF23 might be regulated by energy intake. FGF23 has been shown to be elevated in obese people¹¹ and increased energy intake has been identified as a potential predictor of plasma FGF23 concentrations¹². In addition, metabolites involved in the regulation of energy metabolism have been recently reported to regulate FGF23 production, although the results are somewhat contradictory since increases in both insulin, that is typically associated to energy repletion, and AMP-activated kinase (AMPK), which is activated by energy depletion, have been reported to decrease FGF23 synthesis^{13,14}.

Experimental work has shown that feeding hypercaloric diets to rodents results in a consistent increase in plasma and bone FGF23^{15,16}. In these studies, energy density of food was increased by elevating the fat content of the diet. In addition to the effect of increased caloric intake, high fat feeding may elicit systemic inflammation¹⁷.

¹Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, Campus Universitario Rabanales, Cordoba, Spain. ²Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain. ³These authors contributed equally: Escolastico Aguilera-Tejero and Ana I. Raya. *email: eaguilera@uco.es

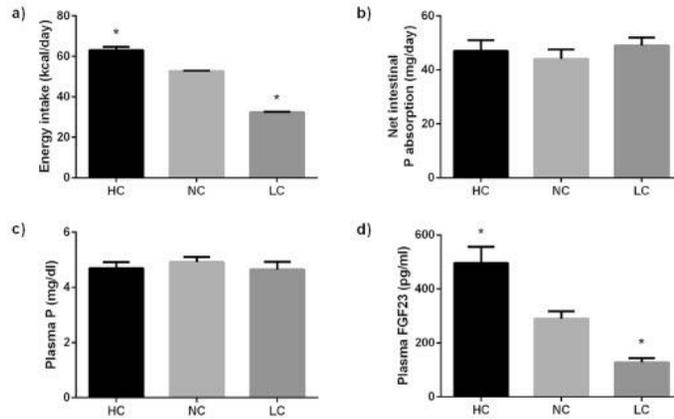


Figure 1. Energy intake (a), net intestinal absorption of P (b), plasma P concentrations (c) and plasma FGF23 concentrations (d) in rats ($n=9$ per group) fed diets with a high (HC), normal (NC) or low (LC) caloric content. * $p < 0.05$ vs NC; one-way ANOVA with Fisher LSD post-hoc test.

and renal injury¹⁸ which could also influence FGF23¹⁸, thus a direct relationship between energy intake and FGF23 has not been clearly established.

The mechanistic (previously mammalian) target of rapamycin (mTOR) pathway controls cellular signaling in response to nutrients and mitogens, and inhibition of mTOR has been shown to mimic caloric restriction²⁰. mTOR is a protein kinase that belongs to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinase family and interacts with several proteins to form two distinct multiprotein complexes: mTORC1 and mTORC2²¹. Only mTORC1, which is a key sensor of energy availability and nutritional status, is inhibited by rapamycin²².

The aim of this work was to test the hypothesis that FGF23 is directly regulated by energy intake. To this purpose we investigated, *in vivo*, the effect of increased and reduced energy intake on FGF23. In addition, the effect of energy availability on FGF23 production by bone cells was studied *in vitro* and the involvement of the mTOR signaling pathway in the regulation of FGF23 production was evaluated.

Results

***In vivo* studies.** As expected, energy intake was significantly ($p < 0.001$) higher in the HC group, 63.0 ± 1.7 kcal/day, than in the NC group, 52.6 ± 0.3 kcal/day. Differences in energy intake in the HC group were not as high as would be predicted from the energy content of the diets because these rats, that were fed ad libitum, voluntarily reduced their food consumption to 12.0 ± 0.3 g/day, when compared with the NC group, 14.9 ± 0.1 g/day. Rats fed LC had their food supply adjusted to 24.7 ± 0.3 g/day and energy intake was much lower ($p < 0.0001$) in LC rats, 32.4 ± 0.3 kcal/day, than in NC rats (Fig. 1a). Plasma glucose concentrations were not influenced by caloric intake and similar values were obtained in rats fed NC, 124.6 ± 5.7 mg/dl, and LC, 126.9 ± 4.7 mg/dl; rats fed HC had slightly lower glucose concentrations, 113.0 ± 8.3 mg/dl, but the differences with NC and LC were not significant.

Even though all diets had the same P concentration (0.6%), P intake was modulated by food intake. Thus, the HC group ingested slightly less P, 72.2 ± 2.0 mg/day, than the NC group, 89.7 ± 0.6 mg/day, while rats fed LC ingested more P ($p < 0.0001$) than the other groups, 148.3 ± 1.5 mg/day. To assess whether P absorption was different between groups, fecal P was measured and net intestinal absorption of P was calculated. As shown in Fig. 1b, there were no major differences in the amount of P absorbed between the study groups: NC, 44.0 ± 3.6 mg/day, HC, 47.0 ± 4.0 mg/day, and LC, 49.0 ± 3.0 mg/day.

Plasma P concentration was not influenced by caloric intake and values were slightly lower in the HC group, 4.7 ± 0.2 mg/dl, and in the LC group, 4.7 ± 0.3 mg/dl, than the NC group, 5.0 ± 0.2 mg/dl (Fig. 1c).

Plasma FGF23 concentrations in NC rats were 289 ± 28 pg/ml. A significant ($p = 0.001$) increase in plasma FGF23 was observed in the HC group, 496 ± 60 pg/ml. In contrast, rats in the LC group had lower ($p = 0.009$) FGF23 concentrations, 127 ± 17 pg/ml, than rats in the NC group (Fig. 1d). A strong correlation between energy intake and plasma FGF23 was observed ($r = 0.705$, $p < 0.0001$) (Fig. 2a); however, FGF23 did not correlate with the intestinal absorption of P ($r = -0.125$, $p = 0.535$) (Fig. 2b) or with plasma P concentration ($r = -0.154$, $p = 0.493$) (Fig. 2c).

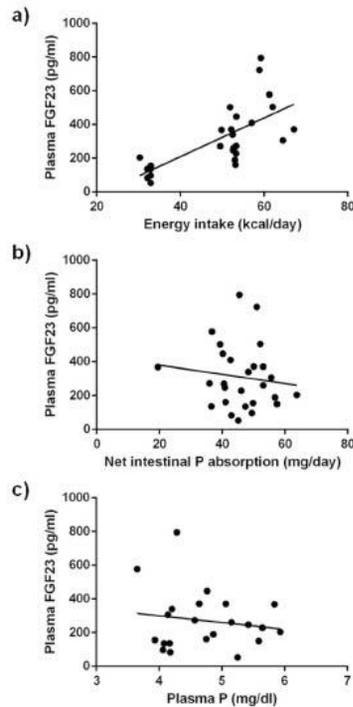


Figure 2. Correlation between: (a) plasma FGF23 concentrations and energy intake ($r=0.705$, $p<0.0001$), (b) plasma FGF23 concentrations and net intestinal absorption of P ($r=-0.124$, $p=0.535$), and (c) plasma FGF23 and plasma P concentrations ($r=-0.154$, $p=0.493$) in rats fed diets with a high (HC), normal (NC) or low (LC) caloric content. Pearson correlation test.

As compared with the NC group, 98.4 ± 17.8 pg/ml, plasma calcitriol levels were reduced ($p=0.0003$) in the rats fed HC, 22.4 ± 8.2 pg/ml, whereas they were increased in the LC group, 185.6 ± 7.7 pg/ml, ($p<0.0001$ vs NC) (Fig. 3a). Plasma calcitriol and FGF23 concentrations were inversely correlated ($r=-0.803$, $p<0.0001$) (Fig. 3b).

In vitro studies. FGF23 mRNA expression was significantly higher ($p<0.0001$) in UMR 106 cells cultured for 6 days in HG, 1.02 ± 0.09 , than in UMR 106 cells cultured in LG, 0.59 ± 0.03 . However, a shorter exposure to LG or a moderate decrease in glucose concentration did not reduce mRNA FGF23 (Suppl. Fig. 1). When osmolality of the LG medium was increased to the same level than the HG medium by adding mannitol, mRNA FGF23 was not affected and remained lower ($p=0.002$) in cells incubated in LG + Man, 0.56 ± 0.11 , than in cells incubated in HG, 1.02 ± 0.09 (Fig. 4).

UMR 106 cells increased FGF23 mRNA expression when exposed to HP but only if they were cultured in HG, 1.66 ± 0.18 vs 1.02 ± 0.09 ($p<0.0001$). However, cells cultured in LG exposed to HP or NP had comparable FGF23 mRNA expression, 0.50 ± 0.02 and 0.59 ± 0.03 , respectively (Fig. 5).

Expression of osteogenic genes in UMR 106 cells was not modulated by changes in glucose concentration in the culture medium. Thus, neither mRNA RunX2, 1.03 ± 0.12 vs 0.92 ± 0.06 , nor mRNA Osterix, 1.00 ± 0.04 vs 0.96 ± 0.04 , changed their expression when cultured in either HG or LG (Fig. 6).

The addition of rapamycin to UMR 106 cells cultured in HG caused a marked reduction of FGF23 mRNA, from 1.02 ± 0.09 to 0.45 ± 0.03 ($p=0.001$), reaching values similar to those observed in cells incubated in LG, 0.59 ± 0.03 . Addition of DMSO (rapamycin solvent) to the HG medium did not affect FGF23 mRNA, 1.05 ± 0.14 vs 1.02 ± 0.09 (Fig. 7). Dose response and time response to incubation with rapamycin are shown in Suppl. Fig. 1.

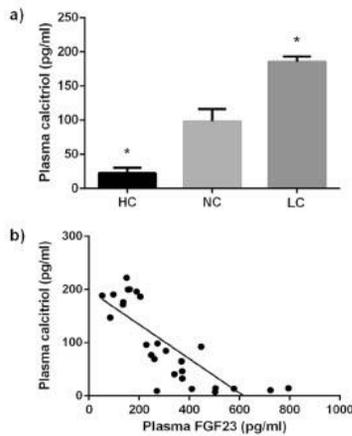


Figure 3. (a) Plasma calcitriol concentrations in rats ($n = 9$ per group) fed diets with a high (HC), normal (NC) or low (LC) caloric content. * $p < 0.05$ vs NC; one-way ANOVA with Fisher LSD post-hoc test. (b) Correlation between plasma FGF23 and plasma calcitriol concentrations ($r = -0.803$, $p < 0.0001$) in rats fed diets with a high (HC), normal (NC) or low (LC) caloric content. Pearson correlation test.

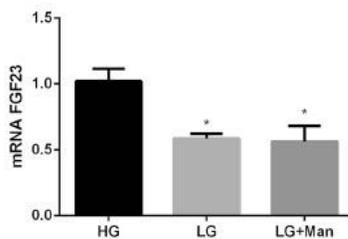


Figure 4. mRNA FGF23 vs Tbp expression (arbitrary units) by UMR 106 cells cultured in medium with high glucose (HG), low glucose (LG) and low glucose + mannitol (LG + Man). * $p < 0.05$ vs HG; one-way ANOVA with Fisher LSD post-hoc test.

When UMR 106 cells were incubated with another mTOR inhibitor, everolimus, FGF23 mRNA was also reduced, from 1.02 ± 0.09 to 0.62 ± 0.04 ($p = 0.005$) (Fig. 7).

UMR 106 cells incubated with rapamycin decreased the expression of stromal interaction molecule 1 (STIM1); thus, after treatment with rapamycin, STIM1 mRNA decreased from 1.01 ± 0.05 to 0.79 ± 0.05 ($p = 0.004$). Moreover, incubation with everolimus also decreased STIM1 expression from 1.01 ± 0.05 to 0.82 ± 0.06 ($p = 0.02$) (Fig. 8).

Discussion

This study was designed to investigate the influence of energy intake on FGF23. Our results demonstrate a direct relationship between these two parameters. Thus, *in vivo*, an increase in energy intake was associated to higher FGF23 concentrations and a reduction in energy intake resulted in lower FGF23 levels. In addition, *in vitro*, energy availability also modulated FGF23 expression by bone cells, which decreased when the glucose concentration in the culture medium was reduced. Moreover, *in vitro* studies indicate that the mTOR signaling pathway is involved in the regulation of FGF23 by energy intake.

The present study confirms previous reports describing that high calorie intake results in increased FGF23 concentrations^{15,16}. A problem when linking high caloric intake with FGF23 is that energy-dense diets have a high

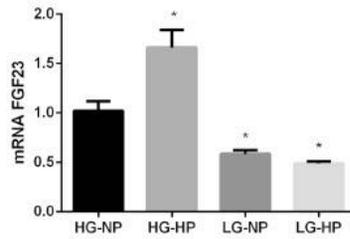


Figure 5. mRNA FGF23 vs Tbp expression (arbitrary units) by UMR 106 cells cultured in medium with high glucose and normal P (HG-NP), high glucose and high P (HG-HP), low glucose and normal P (LG-NP) and low glucose and high P (LG-HP). * $p < 0.05$ vs HG-NP; one-way ANOVA with Fisher LSD post-hoc test.

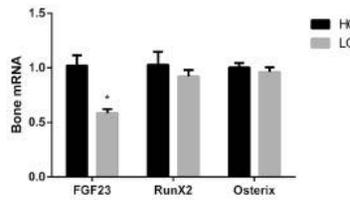


Figure 6. mRNA FGF23 vs Tbp, RunX2 vs Tbp and Osterix vs Tbp expression (arbitrary units) by UMR 106 cells cultured in medium with high glucose (HG, black bars) and low glucose (LG, grey bars). * $p < 0.05$ vs HG; Student's t-test.

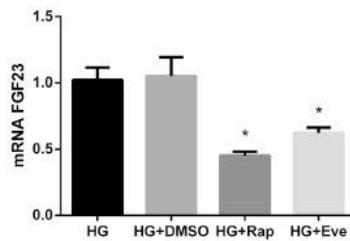


Figure 7. mRNA FGF23 vs Tbp expression (arbitrary units) by UMR 106 cells cultured in medium with high glucose (HG), high glucose + DMSO (HG + DMSO), HG + Rapamycin 10 nM (HG + Rap) and HG + Everolimus 10 nM (HG + Eve). * $p < 0.05$ vs HG; one-way ANOVA with Fisher LSD post-hoc test.

fat content and there are unavoidable collateral effects of high fat diets on the kidneys and on systemic inflammation that may result in indirect increases of FGF23. High fat diet is known to produce kidney damage¹⁴ and acute kidney injury is sufficient to increase FGF23 even in the absence of hyperphosphatemia²³. High fat diets also promote inflammation¹⁷ which not only can contribute to kidney damage but may also have independent effects on FGF23²⁴. Two recent studies have identified a link between elevations in TNF α secondary to feeding high fat and increases in FGF23^{14,25}.

To further clarify the role of energy intake on FGF23 concentrations we studied energy deprived rats that were fed a diet with a very low caloric content. Energy deprived rats had reduced FGF23 concentrations when compared with energy repleted animals. To our knowledge, FGF23 has not been previously studied in animals subjected to energy deprivation. The reduction in FGF23 in calorie deprived rats reinforces the contention that energy intake directly regulates FGF23. Moreover, when data from all the animals used in the study were pooled,

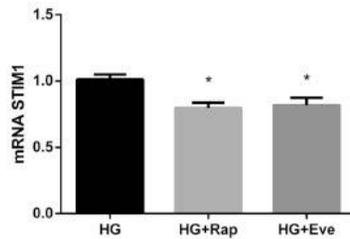


Figure 8. mRNA STIM1 vs Tbp expression (arbitrary units) by UMR 106 cells cultured in medium with high glucose (HG), HG + Rapamycin 10 nM (HG + Rap) and HG + Everolimus 10 nM (HG + Eve). * $p < 0.05$ vs HG; one-way ANOVA with Fisher LSD post-hoc test.

a highly significant correlation between energy intake and FGF23 was observed. Since elevated FGF23 concentrations are associated to cardiovascular morbidity and mortality²⁻⁵ reducing energy intake may have advantages on cardiovascular health that could be mediated by a decrease in FGF23.

The modulation of FGF23 concentrations by energy intake was independent of changes in intestinal P absorption and in plasma P concentrations. It is important to emphasize the quantification of absorbed P, instead of the P that was eaten because, even though efforts were made to avoid different P load, dietary modifications change feeding behaviour in rodents and thus it is difficult to adjust with precision the amount of ingested P. Moreover, it is important to evaluate absorbed P because the composition of the diet (e.g. fat content) may modify intestinal absorption of P²⁶. The possibility that P intake may have influenced FGF23 by a mechanism independent of intestinal P absorption is unlikely. At any rate, if this were the case, the effect of caloric intake on FGF23 would have been underestimated since the rats that ate more P were in the LC group which also had the lower FGF23 concentrations. In conclusion, rats with equivalent P load, similar plasma P concentrations but with very different energy intake showed changes in FGF23 levels that correlated with energy intake.

In addition to P, FGF23 is hormonally regulated by calcitriol⁷. In the rats under study plasma calcitriol changed in opposite direction to plasma FGF23 and a strong inverse correlation between both parameters was identified. The regulation of calcitriol and FGF23 is bidirectional -calcitriol stimulates FGF23 production⁷ while FGF23 inhibits calcitriol synthesis⁸. Since the correlation was inverse, it seems that the changes in FGF23 were driving calcitriol production. Therefore, energy intake can modulate calcitriol production through changes in FGF23. Given the important repercussions of vitamin D on cardiovascular²⁷ and bone²⁸ health the indirect regulation of calcitriol, through changes in FGF23, associated to energy intake may be highly relevant.

In vitro studies support the effect of energy availability on FGF23 expression by bone cells. UMR 106 cells cultured in HG medium consistently expressed more mRNA FGF23 than UMR 106 cells cultured in LG medium. It is important to note that even though energy availability was limited in the LG medium, the cells cultured in LG grew almost at the same rate than the cells cultured in HG medium. In fact the time to reach confluence was not different for cells cultured in HG, 120.0 ± 0.5 hours, and in LG, 127.6 ± 4.6 hours. Thus, the cells cultured in LG were able to maintain their physiologic processes but reduced FGF23 expression. This contention was further supported by the study of osteogenic genes which were not affected by the glucose content of the culture medium.

Since HG medium has higher osmolality than LG medium, and data in the literature support the influence of osmolality on bone cell biology²⁹, experiments were conducted adding mannitol to LG medium to reach the same osmolality of the HG medium. The cells cultured in LG + Man also expressed lower levels of mRNA FGF23 than the cells cultured in HG, thus ruling out any interfering effect related to changes in osmolality.

It is interesting to note that blood glucose was not altered in the *in vivo* studies, in fact plasma glucose levels were slightly lower in the rats fed HC diet. Thus, glucose, per se, is not the likely triggering factor in the response to nutrient availability. The contention that what drives the regulation of FGF23 seems to be sustained energy availability rather than glucose concentration is further supported by *in vitro* experiments in which short time changes in glucose concentration in the medium did not modify FGF23 expression.

As expected, UMR 106 cells incubated in HG increased mRNA FGF23 in response to elevated P concentrations. However, when the cells were incubated in LG they did not increase FGF23 expression even in the presence of very high P concentrations. These data are in line with previous studies that have reported that P restriction does not prevent the increase in FGF23 associated to high caloric intake¹⁶ and, in conjunction with the *in vivo* data reported in the present study, would argue for a preferential regulation of FGF23 by nutrient/energy availability rather than by P.

To provide a mechanistic explanation to the regulation of FGF23 by energy availability, the mTOR signaling pathway was explored, because inhibition of mTOR has been shown to mimic calorie restriction³⁰. Two mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2, are known, but only mTORC1 is rapamycin sensitive. mTORC1, which is suppressed by energy deprivation (low ATP-to-AMP ratio), is a downstream target of AMPK³⁰. In an elegant study, Glosse *et al.* demonstrated that AMPK activation decreases FGF23 and that the effect of AMPK on FGF23 was mediated, at least in part, by downregulation of the calcium channel Orail involving store-operated calcium entry (SOCE)¹⁴. Both AMPK and rapamycin have an inhibitory effect on mTOR, but the fact that rapamycin by

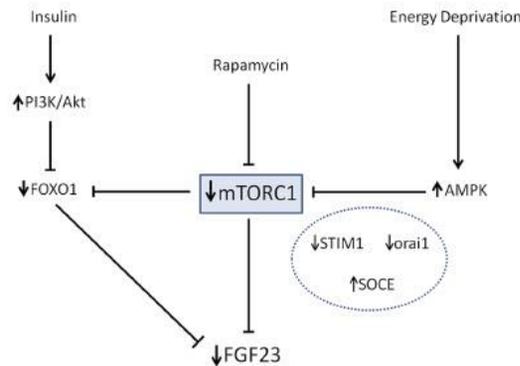


Figure 9. Proposed model integrating the actions of energy deprivation, rapamycin and insulin on FGF23 production. Energy deprivation stimulates AMPK and, like rapamycin, inhibits mTORC1. The increase in AMPK and the decrease in mTORC1 reduce FGF23 through an increase in SOCE mediated by down regulation of STIM1 and orai1. Both inhibition of mTORC1 and insulin signaling through PI3K/Akt inhibit FOXO1 and this also decreases FGF23 production.

Itself is able to decrease FGF23 production focus the signaling of energy-sensing that regulates FGF23 on mTOR. The involvement of the mTOR pathway was corroborated by the response to a different mTOR inhibitor, everolimus. It is interesting to note that a tendency to decreased FGF23 has also been reported in mice treated with rapamycin³¹ lending further support to the involvement of the mTOR pathway in FGF23 production.

Like AMPK, mTORC1 signaling has also been shown to enhance SOCE and mTORC1 inhibition by rapamycin has been reported to suppress STIM1, a protein necessary for SOCE activation³². Our data also confirm a decrease in STIM1 expression in UMR 106 cells incubated with rapamycin and everolimus. Thus, both AMPK, through orai1 inhibition, and mTORC1, through STIM1 downregulation, can lead to SOCE activation that results in a decrease in FGF23 production.

Bar *et al.* have reported that insulin suppresses the production of FGF23 by inhibition of FOXO1 transcription factor¹⁵, and these results have been reproduced in our laboratory (data not shown). Since insulin is known to inhibit AMPK activity³³ the data from Bar *et al.* and Glosse *et al.* could be considered contradictory. However, our results showing involvement of the mTOR pathway may help to harmonize the information provided by these two studies. Both insulin signaling, through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/Akt) pathway, and mTOR inhibition by rapamycin (or by energy restriction) are able to inactivate FOXO1^{15,34}. Thus, as shown in Fig. 9, we propose that mTOR is a central molecule in the regulation of FGF23 by energy availability since it integrates two signaling pathways which are dependent on insulin and energy availability, respectively.

In conclusion, this study shows a direct regulation of FGF23 production, both *in vivo* and *in vitro*, by energy availability and demonstrates that the mTOR signaling pathway plays a central role in this regulatory system.

Material and Methods

Ethics. All experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Cordoba and by Junta de Andalucía (Spain) (Ethical Code Number 30/10/2017/148, date 08/11/2017). All protocols were carried out in accordance with the approved guidelines. They followed the guiding principle laid down by the Higher Council of Scientific Research of Spain following the normal procedures directing animal welfare and adhered to the recommendations included in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (US Department of Health and Human Services, NIH) and European laws (Art. 41.1, Real Decreto 53/2013, 01/02 Dec 2012/707/UE) and regulations on protection of animals, under the advice of specialized personnel.

***In vivo* experiments. Animals and diets.** Female Wistar rats, aged 2 months at the beginning of the studies, were used in the experiments. Rats were provided by the Animal Housing Facilities of the University of Cordoba (Cordoba, Spain) and were housed with a 12h/12h light/dark cycle. Appropriate measures were taken to ensure animal welfare and to address the basic behavioral and physiological needs of rats.

Three diets were used in the experiments: a) diet with normal caloric (NC) content, Metabolizable Energy = 3518 kcal/kg, (Altromin C 1090-10, AltrominSpezialfutter GmbH, Germany); b) diet with high caloric (HC) content, Metabolizable Energy = 5241 kcal/kg (Altromin C 1090-60, AltrominSpezialfutter GmbH, Germany); and c) diet with low caloric (LC) content, Metabolizable Energy = 1314 kcal/kg (Altromin C 1012,

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
FGF23	TGGCCATGTAGACGGAAACAC	GGCCCTATATCACTACGGAG
RunX2	CGGGAATGATGAGAACTACTC	GCGGTACAGAGAACAACCTAGGT
Osterix	GTACGGCAAGGCTTCGCATCTGA	TCAAAGTGGTCGCTTCGGGTAAAG
STIM1	CAGTACTACAACATCAAGAAGC	TTTTTATTTTCTCAGCCCCC
Tbp	ACTCCTGCCACACAGCC	GGTCAAAGTTTACAGCCAAGATTCA

Table 1. Sequences of the primers used for real-time RT-PCR. All primers were purchased from Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Germany except STIM1 which was purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. FGF23, fibroblast growth factor 23; RunX2, Runt-related transcription factor 2; STIM1, Stromal interaction molecule 1; Tbp, TATA sequence binding protein.

AltrominSpezialfutter GmbH, Germany). All diets contained normal amounts of calcium (Ca), P and vitamin D: 0.6% of Ca, 0.6% of P and 500 IU/g of vitamin D.

Experimental design. Rats were allotted to 3 groups (n = 9 per group) that received the study diets for 30 days. Rats in Group 1 (Control) were fed NC diet ad libitum. Rats in Group 2 received HC diet ad libitum. Rats in Group 3 were fed LC diet. To prevent overeating, the amount of food made available to the rats on the LC diet was adjusted to achieve a caloric intake that was reduced by 35% when compared with the NC group.

During the last week of the study the rats were housed in metabolic cages, allowing daily control of food and water intake and collection of feces. At the end of the experiments, rats were sacrificed by exsanguination under general anesthesia (inhaled isoflurane).

Blood chemistries. Blood was collected from the abdominal aorta at the time of sacrifice. Blood glucose was measured immediately after collection with a blood glucose meter (Bayer Consumer Care AG, Basel, Switzerland). Afterwards, plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C until assayed. Plasma concentrations of P were measured by spectrophotometry (BioSystems SA, Barcelona, Spain). ELISA tests were used to quantify intact plasma FGF23 (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan). Radioimmunoassay (Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, UK) was used in plasma samples to determine 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol).

Fecal chemistries. Fecal samples were dried, ashed and demineralized with 0.6 mmol/l HNO_3 solution. Fecal P was measured by inductively coupled plasma mass spectrophotometry (ICP-MS, Perkin Elmer Elan DRC-e, Waltham, Massachusetts, USA). Net intestinal absorption of P was calculated as follows:

$$P \text{ net absorption (mg/day)} = P \text{ intake} - P \text{ fecal excretion}$$

In vitro experiments. Cell culture. Rat osteosarcoma cell line UMR 106 (ATCC, Manassas, VA, USA) was used for all *in vitro* experiments. UMR 106 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Riverside, MO, USA), 100 mg/l streptomycin (Normon, Madrid, Spain), 100 IU/ml penicillin (ERN, Barcelona, Spain), 0.29 mg/l fungizone (Teva, Madrid, Spain), 2 mM ultra-glutamine (Lonza, Walkersville, MD, USA) and 1 mM sodium pyruvate (Lonza, Walkersville, MD, USA) at 5% CO_2 , 37°C temperature and water saturated atmosphere. Cells were seeded in 6 wells plates with 10,000 cells/cm² and maintained in DMEM up to 90% confluence. Once confluence was reached, as UMR 106 cells do not easily express FGF23, FGF23 production was stimulated by adding calcitriol (10^{-8} M) (Kern pharma, Barcelona, Spain) for twenty-four hours as previously reported¹³. Culture medium was changed every other day. Cells in passage six were used for all experiments. To study the effect of energy availability, cells were incubated until they reached confluence in either DMEM with high glucose (HG, 4.5 g/l), DMEM with intermediate glucose (2 g/l) or DMEM with low glucose (LG, 1 g/l). Further studies were carried out in which cells that had grown in HG medium were exposed to LG medium for shorter periods of time. Additional experiments were performed to assess the influence of osmolality. In these studies, mannitol (Man, 19.42 mOsmol/l) (Presenius Kabi España, Barcelona, Spain) was added to the LG medium to achieve the same osmolality the HG medium. To evaluate the effect of P, both HG and LG groups were incubated for 6 days with standard DMEM (NP, 1 mM) or with DMEM with high P concentration (HP, 4 mM) in which $\text{PO}_4\text{HNa}_2/\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added in a ratio 1/2. To explore the involvement of the mTOR signaling pathway 5 nM and 10 nM rapamycin (Rap) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) was added to the HG medium and Rap was maintained in the medium during the 6 days that lasted the experiment. Since Rap needs to be dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), an additional control group was included. In this group (HG + DMSO) the HG culture medium contained the same amount of DMSO, 0.009%, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) used to dissolve Rap. Further studies were carried out with cells grown in HG medium that were exposed to rapamycin for shorter periods of time. Additional experiments were performed adding 10 nM everolimus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to cells cultured in HG medium.

RNA extraction and real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated using TRIzol reagent protocol (Invitrogen) and a treatment with DNase I amplification Grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was done according to the manufacturer's instruction. Quantification was performed by

spectrophotometry (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The sequence of primers used for RT-PCR is shown in Table 1. Quantification was done using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) for 50 µg of RNA and 1 µl of primer. The mRNA expression was analyzed in the Light Cycler thermal cycler system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and the relative expression of the target genes was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistics. Values are expressed as the mean \pm standard error (SE). The difference between means for two different groups was determined by t-tests; the difference between means for three or more groups was assessed by ANOVA. Fisher LSD test was used as a post-hoc procedure. A correlation study was carried out using the Pearson test. A $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.01 software.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 10 May 2019; Accepted: 20 January 2020;

Published online: 04 February 2020

References

- Vervloet, M. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. *Nat. Rev. Nephrol.* 15, 109–120 (2019).
- Shimada, T. et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 19, 429–435 (2004).
- Scialla, J. J. et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 349–360 (2014).
- Kestenbaum, B. et al. Fibroblast Growth Factor-23 and Cardiovascular Disease in the General Population: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ. Hear. Fail.* 7, 409–417 (2014).
- Panwar, B. et al. Fibroblast growth factor 23 and risk of incident stroke in community-living adults. *Stroke* 46, 322–328 (2015).
- Ferrari, S. L., Bonjour, J. P. & Rizzoli, R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1519–1524 (2005).
- Masuyama, R. et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 116, 3150–3159 (2006).
- López, I. et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 *in vivo*. *Kidney Int.* 80, 475–482 (2011).
- David, V. et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 89, 135–146 (2016).
- Bozenowicz-Wikarek, M. et al. Plasma fibroblast growth factor 23 concentration and iron status. Does the relationship exist in the elderly population? *Clin. Biochem.* 48, 431–436 (2015).
- Marsell, R. et al. Relation between fibroblast growth factor-23, body weight and bone mineral density in elderly men. *Osteoporos. Int.* 20, 1167–1173 (2009).
- di Giuseppe, R. et al. Potential predictors of plasma fibroblast growth factor 23 concentrations: Cross-sectional analysis in the epic-Germany study. *PLoS One.* 10, e0133580, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133580> (2015).
- Bär, L. et al. Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 5804–5809 (2018).
- Glosse, P. et al. AMP-activated kinase is a regulator of fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 94, 491–501 (2018).
- Raya, A. I. et al. Energy-dense diets increase FGF23, lead to phosphorus retention and promote vascular calcifications in rats. *Sci. Rep.* 6, 36881 (2016).
- Ricos, R. et al. Phosphorus restriction does not prevent the increase in fibroblast growth factor 23 elicited by high fat diet. *PLoS One.* 13, e0198481, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198481> (2018).
- Foret, J. M. et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Int. J. Obes. (London)* 42, 535–541 (2018).
- Wickmann, C. & Kramer, H. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. *Semin. Nephrol.* 33, 14–22 (2013).
- Kanbay, M. et al. Novel faces of fibroblast growth factor 23 (FGF23): Iron deficiency, inflammation, insulin resistance, left ventricular hypertrophy, proteinuria and acute kidney injury. *Calcif. Tissue. Int.* 100, 217–228 (2017).
- de Cavangh, E. M. V., Insera, F. & Ferder, L. Angiotensin II blockade: how its molecular targets may signal to mitochondria and slow aging. Coincides with calorie restriction and mTOR inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H15–H44 (2015).
- Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149, 274–293 (2012).
- Tokunaga, C., Yoshino, K. & Yonezawa, K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 443–446 (2004).
- Christov, M. et al. Plasma FGF23 levels increase rapidly after acute kidney injury. *Kidney Int.* 84, 776–785 (2013).
- Hanks, L. J., Casazza, K., Judd, S. E., Jenny, N. S. & Gutiérrez, O. M. Associations of fibroblast growth factor-23 with markers of inflammation, insulin resistance and obesity in adults. *PLoS One.* 10, e0122885, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122885> (2015).
- Glosse, P. et al. A high-fat diet stimulates fibroblast growth factor 23 formation in mice through TNF α upregulation. *Nutr. Diabetes.* 8, 36 (2018).
- Frommelt, L. et al. Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition.* 30, 869–875 (2014).
- Kaur, G., Singh, J. & Kumar, J. Vitamin D and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.*, <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4088-y> (2018).
- van Schoor, N. M. et al. Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. *Bone.* 42, 260–266 (2008).
- Botolin, S. & McCabe, L. R. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J. Cell Biochem.* 99, 411–424 (2006).
- Xu, J., Ji, J. & Yan, X. H. Cross-Talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 373–381 (2012).
- Keups, D. S. et al. Rapamycin-induced phosphaturia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 2938–2944 (2010).
- Peng, H. et al. mTORC1 enhancement of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ entry constrains tuberous sclerosis complex-related tumor development. *Oncogene.* 32, 4702–4711 (2013).

33. Valentine, R. J., Coughlan, K. A., Ruderman, N. B. & Saha, A. K. Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 562, 62–69 (2014).
34. Abdelnour-Berchtold, E. *et al.* Rapamycin-mediated FOXO1 inactivation reduces the anticancer efficacy of rapamycin. *Anticancer Res.* 30, 799–804 (2010).

Acknowledgements

The work reported here was supported by a Spanish Government Grant from the Instituto de Salud Carlos III (PI17/00169) with co-financing from European Funds.

Author contributions

E.A.-T. conceived and designed the study; A.V., R.R., C.P., I.L. and A.I.R. performed experiments; A.V., R.R., J.R.M.-C., M.R. and A.I.R. analyzed data; A.V. and E.A.-T. drafted manuscript; A.V., R.R., C.P., I.L., J.R.M.-C., M.R., E.A.-T. and A.I.R. edited and revised manuscript; A.V., R.R., C.P., I.L., J.R.M.-C., M.R., E.A.-T. and A.I.R. approved final version of manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58663-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.A.-T.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR

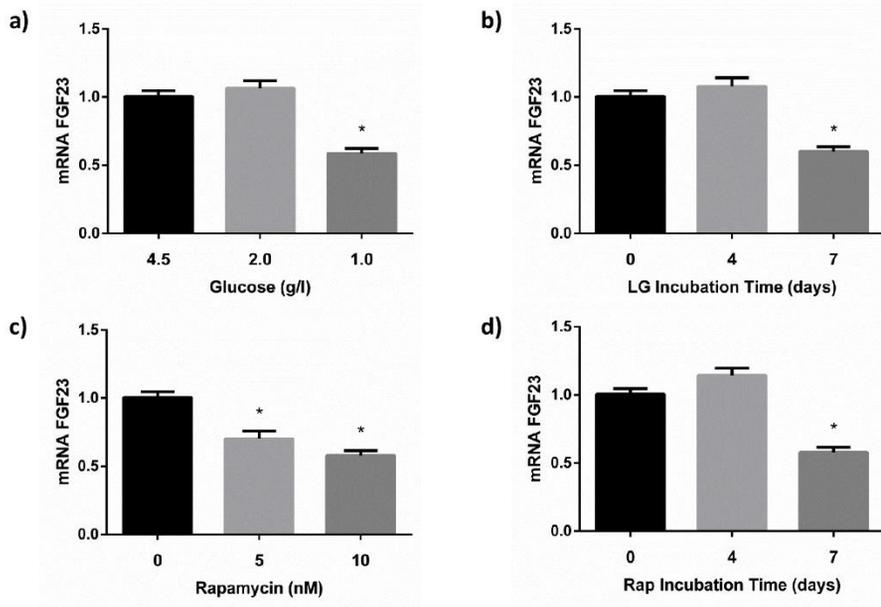
Angela Vidal^{1,2}, Rafael Rios^{1,2}, Carmen Pineda^{1,2}, Ignacio Lopez^{1,2}, Juan R. Muñoz-Castañeda², Mariano Rodriguez², Escolastico Aguilera-Tejero^{1,2,*}, Ana I. Raya^{1,2,*}

¹Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, Campus Universitario Rabanales, Cordoba, Spain

²Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain

*Corresponding author. Correspondence and requests for materials should be addressed to Escolastico Aguilera-Tejero (E A-T).
Dept. Medicina y Cirugía Animal, University of Cordoba. Ctra. Madrid-Cádiz, Km 396, 14014, Cordoba, Spain
E-mail: eaquilera@uco.es

*These authors contributed equally to this work.



Supplementary Figure 1. a) Dose response of mRNA FGF23 production by UMR 106 cells to incubation for 6 days with different concentrations of glucose. b) Time dependence of mRNA FGF23 production by UMR 106 cells incubated with low glucose (LG, 1 g/l). c) Dose response of mRNA FGF23 production by UMR 106 cells to incubation for 6 days with different concentrations of rapamycin. d) Time dependence of mRNA FGF23 production by UMR 106 cells incubated with rapamycin (Rap, 10 nM).

ARTÍCULO 2. Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification

Vidal A, Rios R, Pineda C, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, Raya AI. Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020; 318(5): F1188-F1198. doi: 10.1152/ajprenal.00009.2020.

RESEARCH ARTICLE

Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification

Angela Vidal,^{1,2*} Rafael Rios,^{1,2*}  Carmen Pineda,^{1,2} Ignacio Lopez,^{1,2} Mariano Rodriguez,² Escolastico Aguilera-Tejero,^{1,2*} and Ana I. Raya^{1,2*}

¹Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, Campus Universitario Rabanales, Cordoba, Spain; and

²Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba, Reina Sofía University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain

Submitted 8 January 2020; accepted in final form 26 March 2020

Vidal A, Rios R, Pineda C, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, Raya AI. Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification. *Am J Physiol Renal Physiol* 318: F1188–F1198, 2020. First published April 6, 2020; doi:10.1152/ajprenal.00009.2020.—Caloric restriction (CR) is known to have multiple beneficial effects on health and longevity. To study the effect of CR on phosphorus metabolism and vascular calcification (VC), rats were fed normal or restricted calories (67% of normal). The phosphorus content of the diets was adjusted to provide equal phosphorus intake independent of the calories ingested. After 50 days of CR, rats had negative phosphorus balance, lower plasma phosphorus, glucose, triglycerides, and leptin, and higher adiponectin than rats fed normal calories. Uremia was induced by 5/6 nephrectomy (Nx). After Nx, rats were treated with calcitriol (80 ng/kg ip every other day) and high-phosphorus diets (1.2% and 1.8%). No differences in aortic calcium content were observed between rats that ate normal or restricted calories before Nx in either rats that received 1.2% phosphorus (11.5 ± 1.7 vs. 10.9 ± 2.1 mg/g tissue) or in rats that received 1.8% phosphorus (12.5 ± 2.3 vs. 12.0 ± 2.9 mg/g of tissue). However, mortality was significantly increased in rats subjected to CR before Nx in both the 1.2% phosphorus groups (75% vs. 25%, $P = 0.019$) and 1.8% phosphorus groups (100% vs. 45%, $P < 0.001$). After calcitriol administration was stopped and phosphorus intake was normalized, VC regressed rapidly, but no significant differences in aortic calcium were detected between rats that ate normal or restricted calories during the regression phase (5.7 ± 2.7 and 5.2 ± 1.5 mg/g tissue). In conclusion, CR did not prevent or ameliorate VC and increased mortality in uremic rats.

caloric restriction; rats; vascular calcification

INTRODUCTION

Uremic calcifications, affecting the vasculature and other soft tissues, are a common feature in patients with chronic kidney disease (CKD) (28). Moreover, vascular calcification (VC) is an important contributor to the high rate of cardiovascular mortality associated to CKD (3). The inability to eliminate phosphorus and the subsequent development of hyperphosphatemia play a major role in the development of VC in patients with uremia (7). Phosphate promotes VC through

several mechanisms, including increased serum calcium × phosphorus product, which leads to the precipitation of calcium salts, and phenotypic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to osteogenic cells (11, 30).

Phosphate metabolism and uremic VC are influenced by obesity and by the caloric content of the diet. When subjected to reduction of renal mass, obese Zucker rats develop more severe VC than lean Zucker rats (22). In addition, we have recently reported that VC is more prominent in uremic rats fed high-fat diets than in their counterparts fed normal-fat diets (24). Phosphorus retention, secondary to renal klotho and fibroblast growth factor 23 (FGF23) dysregulation, seems to be implicated in the procalcifying effect of high-fat diet (23).

Caloric restriction (CR) has been shown to have multiple beneficial effects on health in a variety of animal models ranging from invertebrates to primates and humans (6, 15, 19). CR is known to retard aging and to increase lifespan (20) by modulating energy metabolism and preventing organ deterioration at multiple levels, including the kidneys (31). Moreover, CR has been reported to improve vascular health and retard vascular aging (8). However, to our knowledge, the effect of CR on the development of uremic VC has not been explored.

We hypothesized that CR may modulate not only energy metabolism but also phosphorus metabolism and that CR may be beneficial to prevent the development of uremic VC and to accelerate their regression. Thus, the objectives of the present study were to 1) evaluate the effect of CR on energy and phosphorus metabolism, 2) determine whether rats subjected to CR were protected against VC, and 3) study the influence of CR on regression of VC.

MATERIALS AND METHODS

Ethics. All experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Cordoba (Cordoba, Spain). All protocols were carried out in accordance with the approved guidelines. They followed the guiding principles laid down by the Higher Council of Scientific Research of Spain, following the normal procedures directing animal welfare (Real Decreto 223/88, BOE of March 18, 1998) and adhered to the recommendations included in the National Institutes of Health *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* and European laws and regulations on the protection of animals, under the advice of specialized personnel.

Animals and diets. Two-month-old female Wistar rats, provided by the Animal Housing Facilities of the University of Cordoba (Cordoba, Spain), were housed in individual cages with a 12:12-h light-dark

* A. Vidal and R. Rios contributed equally to this work; *E. Aguilera-Tejero and A. I. Raya contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: E. Aguilera-Tejero, Dept. Medicina y Cirugía Animal, Univ. of Cordoba, Ctra, Madrid-Cádiz, Km 396, Cordoba 14014, Spain (e-mail: eaguilera@uco.es).

cycle. The control diet (Altromin C1090-10, Altromin Spezialfutter) provided metabolizable energy = 3,528 kcal/kg and contained 0.6% calcium and 0.6% phosphorus. Additional diets of identical composition to the control diet but containing varying levels of calcium and phosphorus (0.9% calcium, 0.9% phosphorus; 0.6% calcium, 1.2% phosphorus; and 0.9% calcium, 1.8% phosphorus) were also used in the experiments. All diets contained 500 IU/g vitamin D. Food intake was recorded daily for each rat. Rats subjected to CR always ate the whole amount of food provided (10 g/day), and in control rats the leftovers (if any) of the 15 g/day of food were weighed. Caloric intake and phosphorus intake were calculated by multiplying the amount of food consumed (g) by the energy (kcal/g) and phosphorus (mg/g) concentrations of the diet. In the course of the experiments, rats were weighed at 10- to 15-day intervals.

Induction of uremia, sampling, and euthanasia. Uremia was induced by 5/6 nephrectomy (Nx), a two-step procedure that reduces the original renal mass by five-sixths (24). Briefly, animals were anesthetized using inhaled isoflurane (Isovet, Braun, Barcelona, Spain). For the first step of Nx, a 5- to 8-mm incision was made on the left mediolateral surface of the abdomen. The left kidney was exposed, and the two poles (2/3 of renal mass) were ablated. The kidney was inspected and returned to an anatomically neutral position within the peritoneal cavity. The abdominal wall and skin incisions were closed with sutures, and the rat was placed back into its home cage. After 1 wk of recovery, in the second step, the animal was reanesthetized, and a 5- to 8-mm incision was made on the right mediolateral surface of

the abdomen. The right kidney was exposed and unencapsulated, the renal pedicle was clamped and ligated, and the kidney was removed. The ligated pedicle was returned to a neutral anatomic position, and the abdomen and skin incisions were closed with suture materials. Fentanyl (0.2 mg/kg ip, Fentanest, Kern Pharma, Barcelona, Spain) was used as an analgesic agent. At the end of the experiment, rats were euthanized by exsanguination under general anesthesia (inhaled isoflurane) to obtain blood samples (from the abdominal aorta) and tissue samples (aorta, kidney, and visceral fat).

Experimental design. As shown in Fig. 1, rats were allotted to eight experimental groups.

Groups 1 and 2 were designed to study the influence of CR on energy and phosphorus metabolism. Rats in *group 1* (n = 10) were fed 15 g/day of the control diet (0.6% calcium and 0.6% phosphorus). This is the amount of food that a normal 2-mo-old rat eats when fed ad libitum. Rats in *group 2* (n = 11) were calorie restricted and fed 10 g/day of a diet with 0.9% calcium and 0.9% phosphorus. Thus, the daily phosphorus intake should be identical in *groups 1* and *2*. During the last 3 days of the experiment, rats from *groups 1* and *2* were housed in metabolic cages to obtain urine and feces for calculation of phosphorus balance. After eating the diets for 50 days, rats were euthanized.

Groups 3–6 were designed to determine the influence of CR on the development of uremic calcifications. In all groups, uremia was induced by Nx. After surgery, the phosphorus content of the diet was

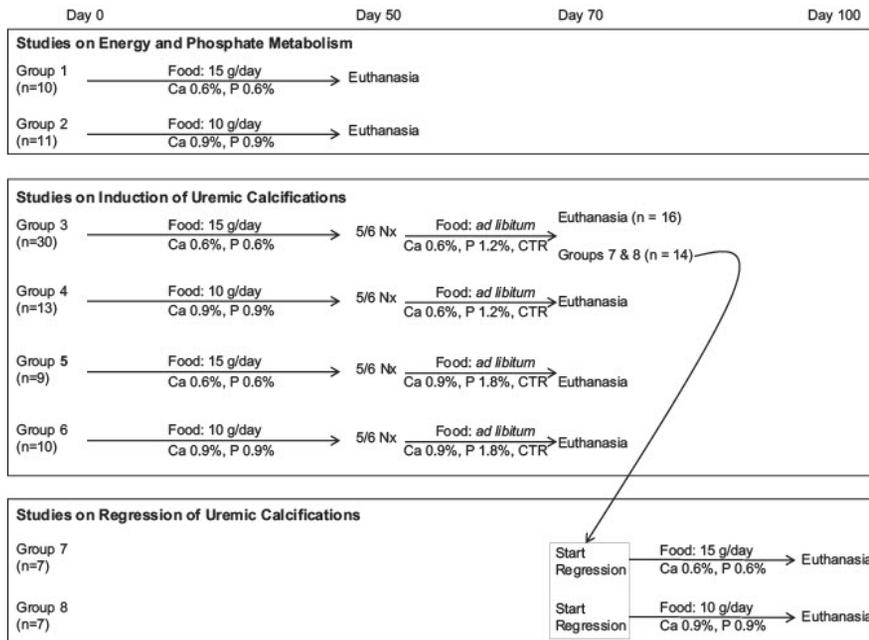


Fig. 1. Experimental design. Ca, calcium; P, phosphorus; Nx, nephrectomy; CTR, calcitriol.

increased and rats were supplemented with 80 ng/kg ip calcitriol every other day (Kern Pharma).

Rats in group 3 ($n = 30$) were fed 15 g/day of control diet (0.6% calcium and 0.6% phosphorus) for 45 days before Nx. After Nx was completed, they were fed ad libitum a diet with 0.6% calcium and 1.2% phosphorus. Two weeks later, 14 rats were allotted to the experiments of regression (groups 7 and 8), and the rest of the rats ($n = 16$) were euthanized (group 3).

Rats in group 4 ($n = 13$) were calorie restricted before Nx and thus were fed 10 g/day of a diet with 0.9% calcium and 0.9% phosphorus for 45 days. They were then subjected to Nx and fed ad libitum a diet with 0.6% calcium and 1.2% phosphorus. Rats were euthanized 14 days after Nx.

Rats in group 5 ($n = 9$) were fed like rats in group 3 before Nx, but after Nx they were fed ad libitum a diet with 0.9% calcium and 1.8% phosphorus. Rats were euthanized 14 days after Nx.

Rats in group 6 ($n = 10$) were calorie restricted before Nx, as in group 4, and after Nx they were fed ad libitum a diet with 0.9% calcium and 1.8% phosphorus. Rats were euthanized 14 days after Nx.

Groups 7 and 8 were designed to study the effect of CR on regression of calcifications. In both groups ($n = 7$ each), rats received the same treatment as group 3. After rats had been uremic for 14 days, calcitriol administration was stopped and the diet was changed. From this point on, rats in group 7 were fed 15 g/day of control diet with 0.6% calcium and 0.6% phosphorus, and rats in group 8 were fed 10 g/day of the diet with 0.9% calcium and 0.9% phosphorus. This would result in different energy intake and similar phosphorus load. After 30 days on these diets, rats were euthanized.

Blood chemistry. After blood collection, plasma was separated by centrifugation (3,500 rpm for 10 min at 4°C) and stored at -20°C until assayed. Plasma total cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, albumin, calcium, and phosphorus were measured by spectrophotometry (BioSystems, Barcelona, Spain). Plasma glucose was determined using a blood glucose meter (Bayer Consumer Care, Basel, Switzerland). ELISA tests were used to quantify plasma FGF23 (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan), leptin, and adiponectin (EMD Millipore).

Urine and feces analysis. Urine produced in 24 h was collected, centrifuged (1,500 rpm for 5 min at 4°C), and frozen at -20°C. Feces produced for 3 days were collected, pooled, and frozen at -20°C. Fecal samples were digested by adding 0.5 g feces to 3 mL HNO₃ and 5 mL H₂O at room temperature. The sample was then introduced in a digestion block (Digester SPB, Elan DRC-e, Waltham, MA), heated at $\approx 125^\circ\text{C}$ for 2 h, and maintained at this temperature for additional 3 h. Trace fecal phosphorus was measured by inductively coupled plasma mass spectrophotometry (ICP-MS, Perkin-Elmer Elan DRC-e, Waltham, MA). Urinary phosphorus was measured by spectrophotometry (BioSystems).

Net intestinal absorption (Eq. 1) and phosphorus balance (Eq. 2) were calculated as follows:

$$\text{Phosphorus net absorption (mg/day)} = \text{phosphorus intake} - \text{phosphorus fecal excretion} \quad (1)$$

and

$$\text{Phosphorus balance (mg/day)} = \text{net absorption} - \text{phosphorus urinary excretion} \quad (2)$$

Assessment of VC. Following euthanasia, the thoracic aorta was dissected and processed to study mineral content. VC was studied by histology and by measuring tissue calcium content. Samples of the thoracic aorta were fixed in 10% buffered formalin and subsequently sectioned and stained for mineralization by the Von Kossa method. Another portion of the aorta was demineralized in 10% formic acid, and arterial tissue calcium content was measured in the supernatant.

Quantification of tissue mineral content was performed as previously described (16).

RNA extraction and real-time RT-PCR. Kidney tissue was disrupted using liquid nitrogen and grinded thoroughly with a mortar. Renal total RNA was extracted using chloroform and the isopropanol precipitation method and a treatment with DNase I amplification grade (Sigma-Aldrich) and quantified by spectrophotometry (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Fifty nanograms of total RNA were used to analyze mRNA expression in the Light Cycler thermal cycler system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). RT-PCR was performed in one step with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Rat primers for membrane klotho were designed with free Oligo 7 software (<http://www.oligo.net/>), and the sequence was as follows: 5'-CTCTGAAAGCCTACGTTGG-3' (forward) and 5'-TAG-AAACGAGATGAAGGCCAG-3' (reverse). Results were normalized to that of GAPDH. The primer sequence for GAPDH was as follows: 5'-AGGGCTGCCTTCTTTGTGAC-3' (forward) and 5'-TGGG-TAGATCATACTGGAAACATGTAG-3' (reverse). Quantification of relative expression was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (where C_T is threshold cycle).

Protein extraction and Western blot analysis. Proteins were isolated from renal tissue using lysis buffer containing HEPES (10 mmol/l), KCl (10 mmol/l), EDTA (0.1 mmol/l), EGTA (0.1 mmol/l), dithiothreitol (1 mmol/l), PMSF (0.5 mmol/l), protease inhibitor cocktail (70 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and I-Gepal CA-630 (0.6%) at pH 7.9 (Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined by the Bradford method. For Western blot analysis, 50–100 μg protein was electrophoresed on a 10% SDS-polyacrilamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) and electrophoretically transferred (Transfer Systems, Bio-Rad, Hercules, CA) from the gels onto nitrocellulose membranes (Invitrogen). The following steps were performed with gentle shaking. Membranes were incubated in Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) solution [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.2% Tween 20, and 150 mM NaCl, Sigma-Aldrich) and 5% nonfat dry milk (Bio-Rad) at room temperature for 1 h to avoid nonspecific binding. Membranes were then washed with TBST buffer (same composition as TBST without nonfat dry milk) and incubated overnight at 4°C with anti- α -klotho antibody (0.5 mg/mL, Transgenic, Kobe, Japan). Membranes were then washed with TBST buffer and immunolabeled using peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Finally, they were revealed on autoradiographic film using ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Piscataway, NJ). GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)

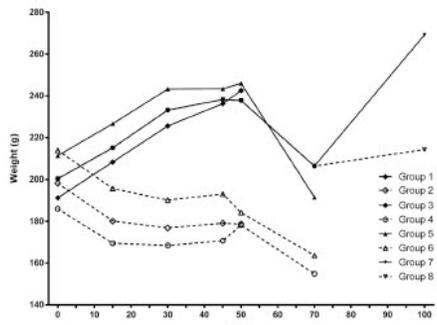


Fig. 2. Evolution of body weight in the different study groups during the experiments.

Table 1. Energy and phosphorus intake in the eight experimental groups at each stage of the experiment

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Energy intake pre-Nx, kcal/day	52.6 ± 0.3 ^a	35.1 ± 0.2 ^b	52.7 ± 0.1 ^a	35.4 ± 0.1 ^b	52.8 ± 0.2 ^a	35.8 ± 0.1 ^b		
Phosphorus intake pre-Nx, mg/day	90.8 ± 0.1 ^a	91.6 ± 0.2 ^a	89.8 ± 0.2 ^a	90.6 ± 0.2 ^a	90.0 ± 0.3 ^a	91.6 ± 0.3 ^a		
Energy intake post-Nx, kcal/day			27.8 ± 1.7 ^{ab}	18.9 ± 1.0 ^{ab}	23.6 ± 0.9 ^{ab}	23.9 ± 1.2 ^{ab}		
Phosphorus intake post-Nx, mg/day			94.7 ± 5.8 ^a	64.4 ± 3.4 ^{ab}	120.9 ± 4.6 ^{ab}	122.2 ± 6.2 ^{ab}		
Energy intake, regression phase, kcal/day							51.7 ± 1.8 ^a	35.8 ± 0.2 ^b
Phosphorus intake regression phase, mg/day							88.1 ± 3.1 ^a	91.4 ± 0.4 ^a

Values are means ± SE. Nx, nephrectomy. ^{a,b,c}Intergroup differences are indicated by superscripted letters; any values with the same superscripted letter are not significantly different, whereas any two values with different superscripted letters are significantly ($P < 0.05$) different. *Intragroup differences that indicate significant differences ($P < 0.05$) with data obtained pre-Nx.

was used as a housekeeping protein to ensure equal loading of the gels. Protein levels were quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Statistics. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA). Values are expressed as means ± SE. The difference between means for two different groups was determined by a *t* test; the difference between means for three or more groups was assessed by ANOVA. Fisher's least significant difference test was used as a post hoc procedure. Kaplan-Meier curves and a log-rank test were used for survival analysis. Pearson's test was used to study correlation. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Experiments on energy and phosphorus metabolism. As intended, energy intake was reduced in CR groups by ~33%. Thus, energy intake in group 2 was 35.1 ± 0.2 kcal/day versus 52.6 ± 0.3 kcal/day in group 1 ($P < 0.001$). This reduction in energy intake impacted on body weight; therefore, whereas rats in group 1 gained 51.3 ± 3.1 g during the experiment, rats in group 2 lost 19.5 ± 4.6 g ($P < 0.001$; Fig. 2). Visceral fat was practically absent in CR rats (0.6 ± 0.2 g, $P < 0.001$, vs. 8.5 ± 1.0 g in group 1). Phosphorus intake during the whole experiment was almost identical in groups 1 and 2 (Table 1).

Significant decreases in plasma concentrations of glucose, triglycerides, and leptin, as well as a significant increase in the plasma concentration of adiponectin, were found in group 2 compared with group 1. No significant differences in plasma concentrations of urea, creatinine, or albumin were observed between group 1 and group 2 (Table 2).

Phosphorus balance in groups 1 and 2 is shown in Table 3. Phosphorus balance was within normal limits (slightly below zero) in rats from group 1. CR rats in group 2 had a more negative phosphorus balance, although due to data dispersion,

significant differences were not found when we compared them with group 1. In addition, plasma phosphorus was significantly lower in group 2 than in group 1, even though plasma 1,25(OH)₂ vitamin D was higher in CR rats.

Although phosphorus intake during the whole experiment was similar in groups 1 and 2 (Table 1), rats fed restricted calories showed consistently lower plasma FGF23 concentrations (217.4 ± 17.9 pg/mL) than rats fed normal calories (289.0 ± 28.5 pg/mL, $P < 0.05$). Changes in renal α-klotho were inversely correlated with changes in plasma FGF23 concentrations, and a significant increase in renal α-klotho was identified in group 2 at both mRNA and protein levels. Thus, CR increased α-klotho mRNA from 1.10 ± 0.08 to 1.44 ± 0.15 ($P < 0.05$) and α-klotho protein from 0.99 ± 0.11 to 1.34 ± 0.12 ($P < 0.05$; Fig. 3).

Experiments on the induction of uremic calcification. As in groups 1 and 2, before Nx, caloric intake was much lower in CR rats (groups 4 and 6) than in rats that ate normal calories (groups 3 and 5); however, phosphorus intake was almost identical in the four groups. After Nx, rats in all groups reduced food intake and, consequently, caloric intake. Thus, although the phosphorus content of the diet was increased after Nx, daily phosphorus intake was not increased in groups 3 and 4; however, phosphorus intake was increased in groups 5 and 6 (Table 1). Body weight decreased in all groups during the calcification period (Fig. 2).

Figure 4A shows the Kaplan-Meier survival curves for groups 3–6. In the groups fed 1.2% phosphorus, survival was significantly higher in rats that ate normal calories than in rats that were subjected to energy restriction (75% vs. 25%, $P = 0.019$). Mortality was higher in rats fed 1.8% phosphorus than in rats fed 1.2% phosphorus. Again, in the 1.8% phosphorus groups, survival was much higher ($P < 0.001$) in rats that ate normal calories (55%) than in CR rats (0%). In the course of

Table 2. Plasma concentrations of metabolites related to energy metabolism and renal function in rats

	Group 1	Group 2
Glucose, mg/dL	124.6 ± 5.7	100.0 ± 6.9*
Triglycerides, mg/dL	41.6 ± 4.0	29.6 ± 1.7*
Cholesterol, mg/dL	70.4 ± 6.1	66.0 ± 6.2
Leptin, ng/mL	1.9 ± 0.3	0.5 ± 0.1*
Adiponectin, ng/mL	7.0 ± 0.5	11.7 ± 0.7*
Creatinine, mg/dL	0.8 ± 0.03	0.7 ± 0.02
Urea, mg/dL	34.7 ± 1.5	33.2 ± 1.4
Albumin, g/dL	2.1 ± 0.05	2.1 ± 0.03

Values are means ± SE. Group 1, rats fed normal calories; group 2, rats subjected to caloric restriction. * $P < 0.05$ vs. group 1.

Table 3. Parameters related to phosphorus balance obtained during the 3-day trial on metabolic cages

	Group 1	Group 2
Phosphorus intake, mg/day	89.4 ± 0.5	90.1 ± 1.5
Fecal phosphorus, mg/day	46.8 ± 3.7	60.0 ± 5.3
Absorbed phosphorus, mg/day	42.6 ± 3.3	30.1 ± 4.6
Urine phosphorus, mg/day	44.3 ± 3.4	44.7 ± 5.5
Phosphorus balance, mg/day	-1.7 ± 6.2	-14.6 ± 6.8
Plasma phosphorus, mg/dL	5.1 ± 0.1	4.6 ± 0.1*
Plasma 1,25(OH) ₂ vitamin D, pg/mL	73.4 ± 7.8	99.1 ± 10.5

Values are means ± SE. Group 1, rats fed normal calories; group 2, rats subjected to caloric restriction. * $P < 0.05$ vs. group 1.

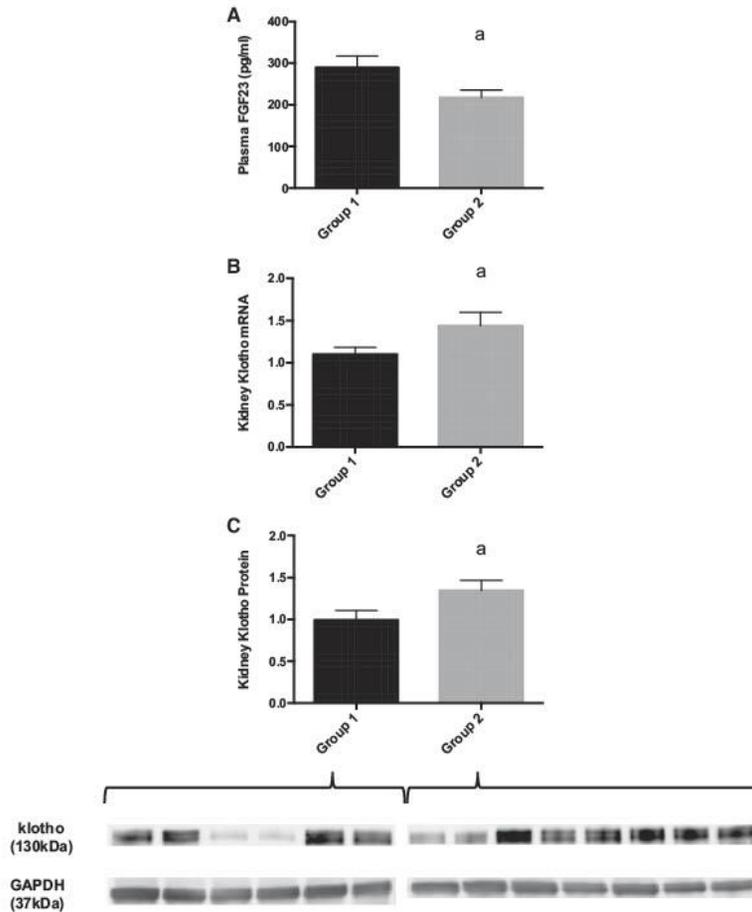


Fig. 3. A: circulating concentrations of fibroblast growth factor 23 (FGF23). B: mRNA expression of α -klotho (relative to GAPDH) in the kidneys. C: protein levels (vs. GAPDH) of α -klotho in the kidneys. Group 1, rats fed normal calories ($n = 10$); group 2, rats subjected to caloric restriction ($n = 11$). $^aP < 0.05$ vs. group 1 by Student's t test.

the study, some rats died and some rats were euthanized for humane reasons before the end of the experiments. Rats were euthanized before their scheduled time when they stopped eating and were unresponsive to external stimuli. We feel confident that these rats were about to die, and, therefore, they have been counted as dead rats in the survival analysis. To make sure that we were not introduc-

ing any bias, we also analyzed the results using only the rats that died without human intervention, and the results were similar (Fig. 4B). Survival was well correlated with the body weight of the rats before the induction of calcification ($r = 0.5627$, $P < 0.0001$; Fig. 4C).

Rats in groups 3–6 had high plasma concentrations of urea, creatinine, and phosphorus and low plasma concentrations of

CALORIC RESTRICTION AND VASCULAR CALCIFICATION

F1193

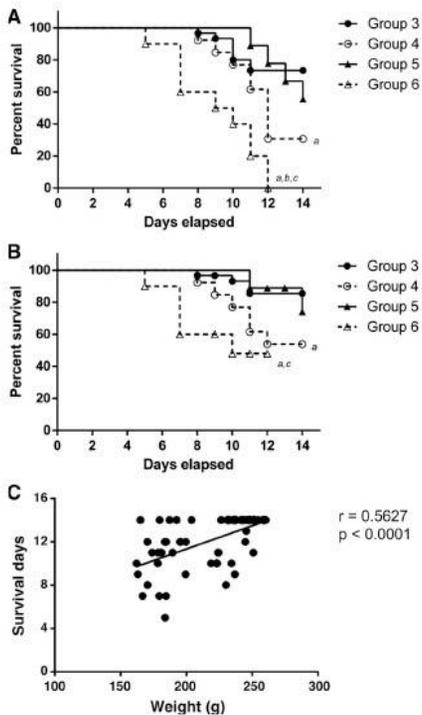


Fig. 4. A: Kaplan-Meier survival curves in uremic rats, including the animals that were euthanized for humanitarian reasons. B: Kaplan-Meier survival curves in uremic rats, including only animals that died without human intervention. C: correlation between body weight at the beginning of the calcification period (day 50) and survival days. Group 3, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 16$); group 4, rats fed restricted calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 13$); group 5, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.8% phosphorus after nephrectomy ($n = 9$); group 6, rats fed restricted calories before nephrectomy and 1.8% phosphorus after nephrectomy ($n = 10$). * $P < 0.05$ vs. group 3; ^b $P < 0.05$ vs. group 4; ^c $P < 0.05$ vs. group 5. Kaplan-Meier curves and a log-rank test were used for survival analysis.

calcium. No intergroup differences were found in any of these parameters (Table 4).

Plasma FGF23 concentrations were extremely high in groups 3–6. Rats in groups 3 and 4 had FGF23 concentrations in the range of 7,000–8,000 pg/mL, whereas rats in groups 5 and 6 had even higher FGF23 concentrations, with a mean range of 16,000–23,000 pg/mL. CR tended to decrease plasma FGF23, but significant differences were observed only between group 6 (15,985 ± 2,367 pg/mL) and group 5 (22,958 ± 683 pg/mL, $P < 0.05$; Fig. 5A). Uremia resulted in a marked

Table 4. Plasma concentrations of calcium, phosphorus, creatinine, and urea in 5/6 nephrectomized rats

	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Calcium, mg/dL	7.8 ± 1.2	7.7 ± 1.2	7.8 ± 1.0	6.8 ± 1.1
Phosphorus, mg/dL	20.7 ± 3.6	20.5 ± 2.0	24.8 ± 4.7	30.9 ± 2.4
Creatinine, mg/dL	2.3 ± 0.12	2.8 ± 0.24	2.7 ± 0.24	2.6 ± 0.43
Urea, mg/dL	325.7 ± 60.8	370.7 ± 47.3	398.8 ± 82.4	490.0 ± 43.2

Values are means ± SE. Group 3, rats fed diet with 1.2% phosphorus and normal calories; group 4, rats fed diet with 1.2% phosphorus and restricted calories; group 5, rats fed diet with 1.8% phosphorus and normal calories; group 6, rats fed diet with 1.8% phosphorus and restricted calories. No significant intergroup differences were found in any parameter.

decrease in renal α -klotho. Rats in groups 3–6 had renal mRNA α -klotho-to-GAPDH ratios in the range of 0.05–0.15. These values were significantly different from those obtained in nonuremic rats from groups 1 and 2 (range: 1.10–1.44). Rats in groups 3 and 4 had higher mRNA α -klotho-to-GAPDH ratios (0.12 ± 0.02 and 0.15 ± 0.04, respectively) than rats in groups 5 and 6 (0.05 ± 0.01 and 0.05 ± 0.02, respectively).

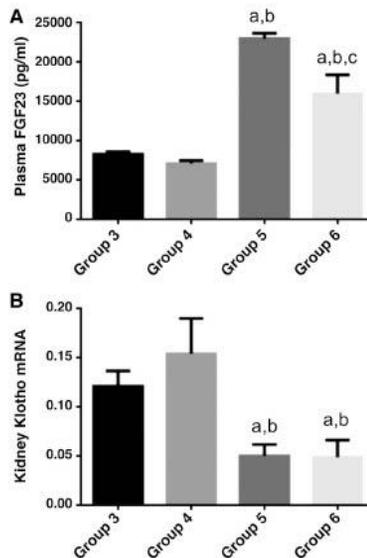


Fig. 5. A: circulating concentrations of fibroblast growth factor 23 (FGF23). B: mRNA expression of α -klotho (relative GAPDH) in the kidneys. Group 3, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 16$); group 4, rats fed restricted calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 13$); group 5, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.8% phosphorus after nephrectomy ($n = 9$); group 6, rats fed restricted calories before nephrectomy and 1.8% phosphorus after nephrectomy ($n = 10$). * $P < 0.05$ vs. group 3; ^b $P < 0.05$ vs. group 4; ^c $P < 0.05$ vs. group 5. One-way ANOVA with Fisher's least significant difference post hoc test was used.

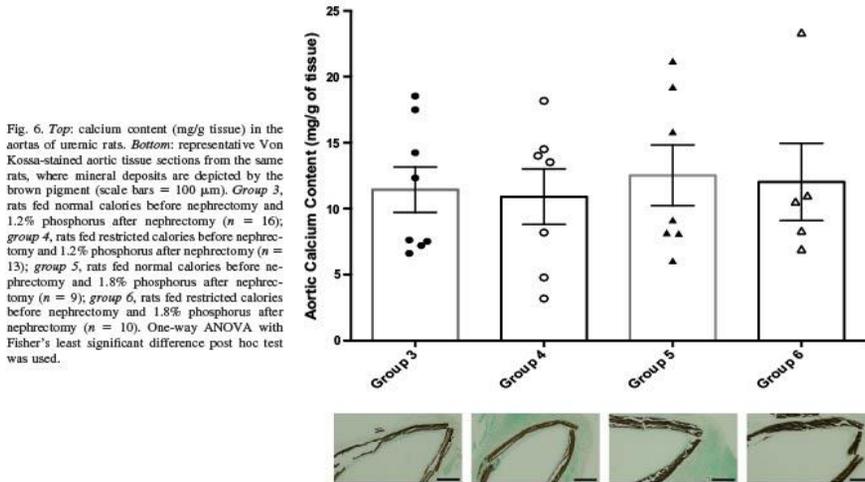


Fig. 6. Top: calcium content (mg/g tissue) in the aortas of uremic rats. Bottom: representative Von Kossa-stained aortic tissue sections from the same rats, where mineral deposits are depicted by the brown pigment (scale bars = 100 μ m). Group 3, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 16$); group 4, rats fed restricted calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 13$); group 5, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.8% phosphorus after nephrectomy ($n = 9$); group 6, rats fed restricted calories before nephrectomy and 1.8% phosphorus after nephrectomy ($n = 10$). One-way ANOVA with Fisher's least significant difference post hoc test was used.

CR did not result in significant differences in mRNA α -klotho-to-GAPDH ratios (Fig. 5B).

Mineral deposition in the aorta is shown in Fig. 6, top. Rats in group 3 had elevated calcium content in the aorta (11.5 ± 1.7 mg/g tissue). The aortic calcium concentration was slightly higher in group 5 (12.5 ± 2.3 mg/g tissue), but the differences with group 3 were not significant. CR groups (groups 4 and 6) only showed very minor decreases in aortic calcium concentration (10.9 ± 2.1 and 12.0 ± 2.9 mg/g tissue, respectively) that did not differ from their counterparts that ingested normal calories before Nx. Von Kossa staining of the aortas showed abundant mineral deposition in the four groups (Fig. 6, bottom).

Experiments on the regression of uremic calcification. After 30 days eating a diet with normal mineral content and without receiving calcitriol, rats in groups 7 and 8 greatly normalized their biochemical profile. Compared with group 3, which would serve as a control group at the end of the calcification period, both regression groups had significantly lower plasma concentrations of urea, creatinine, and phosphorus and significantly higher plasma concentrations of calcium. No significant differences between groups 7 and 8 were found in any of these parameters, although plasma phosphorus tended to be lower in CR rats (Table 5).

Plasma FGF23 was significantly reduced in both group 7 ($5,050 \pm 597$ pg/mL) and group 8 ($4,703 \pm 704$ pg/mL) compared with group 3 ($8,260 \pm 322$ pg/mL; Fig. 7A). Renal α -klotho expression (relative to GAPDH) increased during the regression phase, but significant differences were found only in group 8 (0.24 ± 0.08 , $P < 0.05$) compared with group 3 (0.12 ± 0.02 ; Fig. 7B).

Aortic calcification decreased significantly in groups 7 and 8 after the 30-day regression period (5.7 ± 2.7 and 5.2 ± 1.5 mg/g

tissue, respectively, $P < 0.05$) compared with group 3. However, no significant differences were found when we compared rats that ate normal calories (group 7) and rats that were calorie restricted (group 8) during the regression period (Fig. 8).

DISCUSSION

This study was designed to investigate the influence of CR on energy and phosphorus metabolism and the repercussions that these changes may have in the development and resolution of uremic VC. Our results demonstrate that although CR modulated energy and phosphorus metabolism in a way that could potentially be useful to alleviate VC, it did not prevent or ameliorate calcifications. Moreover, and of great importance, CR significantly increased mortality in uremic rats.

In this study, CR was carried out by reducing the daily amount of food provided to the rats. This is a common method for CR induction and has been amply reported in the literature (34). A problem with this approach is that animals subjected to CR also suffer from phosphorus restriction (i.e., they eat

Table 5. Plasma concentrations of calcium, phosphorus, creatinine, and urea in 5/6 nephrectomized rats

	Group 3	Group 7	Group 8
Calcium, mg/dL	7.8 ± 1.2^a	11.7 ± 0.2^b	11.3 ± 0.1^b
Phosphorus, mg/dL	20.7 ± 3.6^a	5.5 ± 0.3^b	5.1 ± 0.3^b
Creatinine, mg/dL	2.3 ± 0.1^a	1.3 ± 0.07^b	1.4 ± 0.1^b
Urea, mg/dL	325.7 ± 60.8^a	76.4 ± 12.2^b	92.0 ± 11.2^b

Values are means \pm SE. Group 3, control group at the end of the calcification period; group 7, rats fed normal calories for 30 days in the regression phase; group 8, rats fed restricted calories for 30 days in the regression phase. ^{a,b}Groups with different superscripted letters are significantly ($P < 0.05$) different.

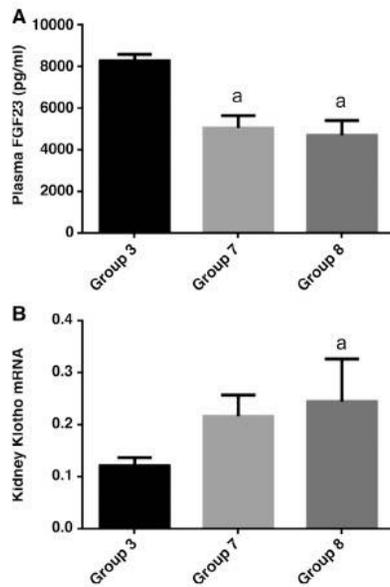


Fig. 7. A: circulating concentrations of fibroblast growth factor 23 (FGF23). B: mRNA expression of α -klotho (relative to GAPDH) in the kidneys. Group 7, rats fed normal calories during the regression period ($n = 7$); group 8, rats fed restricted calories during the regression period ($n = 7$). $^aP < 0.05$ vs. group 3. One-way ANOVA with Fisher's least significant difference post hoc test was used.

proportionally less phosphorus than the control group fed normal calories). This is particularly important when dealing with VC because any protective effect of CR on VC could be due either to a reduction of caloric intake or to a reduction in phosphorus intake. To isolate the effect of reduction in caloric intake, the phosphorus concentration of the diets was adjusted so that animals fed normal calories and restricted calories ingested the same amount of phosphorus. We separated rats in groups of different caloric intake both before Nx (in groups 3–6) and during the regression phase (in groups 7 and 8). However, during the uremic period (the 14 days subsequent to Nx), all rats were fed ad libitum. The decision to feed the rats ad libitum was made because in this period rats substantially decrease their food consumption, which, in fact, is below what we established as CR (10 g/day). Thus, it did not make sense to restrict food access immediately after Nx.

Experiments on energy and phosphorus metabolism. As previously reported in many studies, CR resulted in a significant decrease in body weight without any associated abnormalities (26). CR decreased plasma lipids and leptin, increased plasma adiponectin, and decreased plasma glucose concentrations. These metabolic changes, which are consistent with other studies (4, 21), are just the opposite to what we have

previously reported in rats fed high-fat diets that developed severe VC (24). Thus, the changes in glucose, lipids, and adipokines found after CR could potentially be protective against VC.

CR also resulted in a significant decrease in plasma phosphorus concentration and a tendency to decrease phosphorus balance, which should protect against VC (33). In addition, a significant increase in renal α -klotho expression and a decrease in circulating levels of FGF23 were detected in CR rats. We have previously reported that energy-dense diets decrease renal α -klotho expression (23). The present finding of an increase in α -klotho after CR would reinforce the contention that renal klotho is regulated by caloric intake, although the molecular mechanisms are currently unknown. Changes in FGF23 may be secondary to changes in α -klotho. Thus, in calorie-repleted animals, the decrease in α -klotho would create a state of FGF23 resistance in which more FGF23 is needed to preserve phosphaturia. Conversely, an increase in α -klotho would require less FGF23 to maintain phosphorus homeostasis. Furthermore, very recently we have described that caloric intake may also impact on FGF23 production by acting directly on bone by mechanisms involving the mammalian target of rapamycin signaling pathway (29).

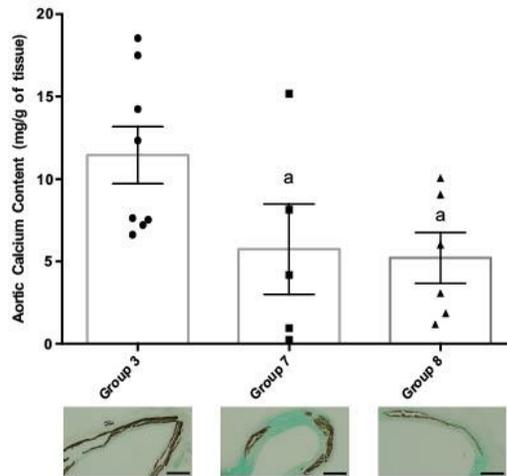
In conclusion, the changes detected in both energy and phosphorus metabolism after CR theoretically would be useful to prevent VC in uremic rats.

Experiments on the induction of uremic calcification. Contrary to our expectations, CR did not ameliorate VC in uremic rats. When this study was conceived, because we anticipated a reduction in uremic calcification in response to CR, the experimental protocol was designed to achieve consistent calcification in rats fed normal calories. This led us to use two different levels of phosphorus in the diet: 1.2%, which is our normal protocol, and a higher level, 1.8%, which would guarantee severe calcification. Aortic mineral deposition was abundant in rats eating both 1.2% and 1.8% phosphorus, but no major differences were found between the different phosphorus levels, probably because after reaching a calcification point the rats started to die. This contention is supported by the fact that mortality was higher in rats fed 1.8% phosphorus. What was interesting is that CR rats did not decrease VC, although the metabolic changes found after CR should be protective.

Additional factors may have influenced the lack of beneficial effect of CR on VC. For instance, fetuin A, a protein that protects against VC (32), has been reported to decrease in CR rats (5). It is also necessary to note that CR and high fat intake do not always have contradictory effects; in fact, they have been reported to have a similar influence on some physiological parameters like birth weight and physical activity of the offspring (9).

CR not only did not ameliorate extraskeletal calcifications, but it did increase mortality in uremic rats. The reasons for the increased mortality are not clear, and this phenomenon is likely to be multifactorial. The decrease in blood lipids observed in CR rats may have played a role since an inverse relationship between plasma lipid levels and mortality has been described in patients with CKD (13). We believe that the decrease in body weight, which may reflect a decrease in energy stores, is an important factor determining mortality. This contention is supported by the correlation found between body weight before the induction of uremia and survival.

Fig. 8. *Top*: calcium content (mg/g of tissue) in the aortas of uremic rats during the regression period. *Bottom*: representative Von Kossa-stained aortic tissue sections from the same rats, where mineral deposits are depicted by the brown pigment (scale bars = 100 μ m). *Group 3*, rats fed normal calories before nephrectomy and 1.2% phosphorus after nephrectomy ($n = 16$), representing the calcification control at the start of the regression phase; *group 7*, rats fed normal calories during the regression period ($n = 7$); *group 8*, rats fed restricted calories during the regression period ($n = 7$). * $P < 0.05$ vs. *group 3*. One-way ANOVA with Fisher's least significant difference post hoc test was used.



Patients with CKD start to lose weight early in the course of the disease, and weight loss is associated with a poor outcome (14). In earlier stages, patients are affected by malnutrition characterized by loss of fat with preservation of lean body mass. As the disease advances, patients may develop cachexia with wasting of lean body tissue and other abnormalities such as anorexia and elevated basal metabolism (17). CR rats in the present study were not cachectic and could be categorized as being on the verge of malnutrition, since apart from being lean they were otherwise healthy and had normal plasma albumin concentrations. Leptin, which tends to be elevated in patients with CKD, has been proposed to mediate cachexia, and leptin signaling antagonists have been proposed to treat cachexia (18). However, our CR rats had lower leptin concentrations than rats fed normal calories.

It is interesting to note that scientific evidence not only indicates that weight loss is prejudicial but also shows that overweight may be beneficial for patients with CKD. This is known as the obesity paradox and is based on the fact that, although obesity is detrimental for the kidney, mortality in patients with CKD is inversely proportional to body weight and body mass index. Thus, while in the general population increases in body mass index from 25 to 40 are accompanied by a steady increase in mortality, the opposite occurs in patients with CKD (1, 12). This is a controversial issue, and several mechanisms have been proposed to explain the paradox. Fat stores may truly prevent patients from wasting, but it has also been argued that fat may sequester uremic toxins, leading to errors in the prescription of hemodialysis, which would artifactually increase mortality in leaner patients (27). In our study, rats differed in body weight and accumulated fat before the induction of renal disease. Thus, this is not exactly the same situation as in the patient with CKD that starts to lose weight as a consequence of CKD. Nonetheless, our data indicate that,

although based on their blood biochemical profile CR rats complied with many criteria of health, they were much more fragile when exposed to renal injury. These data underscore the importance of sufficient energy reserves for the survival of the renal patient.

Experiments on the regression of uremic calcification. We have previously reported that uremic calcification can regress once the calcifying stimuli are under control (2). Moreover, several pharmacological interventions (calcimimetics and magnesium) have been shown to accelerate regression of extraskeletal calcification (10, 16). A major factor to achieve regression of calcifications is to normalize phosphorus metabolism (2). Because CR modulates phosphorus metabolism in a manner that may be useful for resolution of VC, we explored the hypothesis that CR could accelerate regression of VC.

In both regression groups, we found an increase in blood calcium levels, together with normalization of blood phosphorus levels and improvement of renal function. The improvement in renal function seems to be secondary to decreased phosphorus intake and a subsequent reduction of nephrocalcinosis. Two mechanisms are likely to be involved in the increase in blood calcium levels: 1) an improved calcemic response to parathyroid hormone after a reduction of phosphorus intake and blood phosphorus (25) and 2) resorption of calcium deposited in soft tissues (2, 10). Although again CR rats tended to have lower plasma concentrations of phosphorus and FGF23 and increased levels of α -klotho compared with rats that ate normal calories, our results do not show any beneficial effect of CR on the regression of VC.

Conclusions. In conclusion, this research shows that although CR modulated energy and phosphorus metabolism in a way that could potentially be useful to alleviate VC, it did not prevent or ameliorate uremic calcifications. Moreover,

CR was detrimental and resulted in increased mortality in uremic rats.

GRANTS

This work was supported by a Spanish Government Grant from the Instituto de Salud Carlos III (PI17/00169) with co-financing from European Funds.

DISCLAIMERS

Funding sources had no role in study design, conduct, or reporting.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EA.-T. conceived and designed research; A.V., R.R., C.P., I.L., and A.I.R. performed experiments; A.V., R.R., M.R., and A.I.R. analyzed data; A.V. and EA.-T. drafted manuscript; A.V., R.R., C.P., I.L., M.R., EA.-T., and A.I.R. edited and revised manuscript; A.V., R.R., C.P., I.L., M.R., EA.-T., and A.I.R. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Ahmedi SF, Zahmatkesh G, Ahmedi E, Streja E, Rhee CM, Gillen DL, De Nicola L, Mimitolo R, Ricardo AC, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Association of body mass index with clinical outcomes in non-dialysis-dependent chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovascular Med* 6: 37–49, 2016. doi:10.1159/000437277.
- Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 21: 484–490, 2006. doi:10.1359/JBMR.051211.
- Bleck GA, Klesse PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 15: 2208–2218, 2004. doi:10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2.
- Chen JH, Ouyang C, Ding Q, Song J, Cao W, Mao L. A moderate low-carbohydrate low-calorie diet improves lipid profile, insulin sensitivity and adiponectin expression in rats. *Nutrients* 7: 4724–4738, 2015. doi:10.3390/nu7064724.
- Choi KM, Han KA, Ahn HJ, Lee SY, Hwang SY, Kim BH, Hong HC, Choi HY, Yang SJ, Yoo HJ, Baik SH, Choi DS, Min KW. The effects of caloric restriction on fetuin-A and cardiovascular risk factors in rats and humans: a randomized controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 79: 356–363, 2013. doi:10.1111/ceen.12076.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beusley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Waintrub R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201–204, 2009. doi:10.1126/science.1173635.
- Cozzolino M, Ciceri P, Galassi A, Mangano M, Carugo S, Capelli L, Cianciolo G. The key role of phosphate on vascular calcification. *Toxins (Basel)* 11: 213, 2019. doi:10.3390/toxins11040213.
- Császár A, Labinskyy N, Jimenez R, Pinto JT, Ballabh P, Losonczy G, Pearson KJ, de Cabo R, Ugarvari Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev* 130: 518–527, 2009. doi:10.1016/j.mad.2009.06.004.
- Cunha FS, Dalle Molle R, Portella AK, Benetti CS, Noschang C, Goldani MZ, Silveira PP. Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the “Similarities in the Inequalities” model. *PLoS One* 10: e0118586, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0118586.
- Diaz-Tocados JM, Peralta-Ramirez A, Rodriguez-Ortiz ME, Raya AI, Lopez I, Pineda C, Herencia C, Montes de Oca A, Vergara N, Steppan S, Pendon-Ruiz de Mier MV, Buendia P, Carmona A, Carracedo J, Alcalá-Díaz JF, Frazao J, Martínez-Moreno JM, Canalejo A, Felsenfeld A, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, Almadén Y, Muñoz-Castañeda JR. Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int* 92: 1084–1099, 2017. doi:10.1016/j.kint.2017.04.011.
- Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int* 75: 890–897, 2009. doi:10.1038/ki.2008.644.
- Kalantar-Zadeh K, Rhee CM, Chou J, Ahmadi SF, Park J, Chen JL, T, Amlin AN. The obesity paradox in kidney disease: how to reconcile it with obesity management. *Kidney Int Rep* 2: 271–281, 2017. doi:10.1016/j.ekir.2017.01.009.
- Kovesdy CP, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Inverse association between lipid levels and mortality in men with chronic kidney disease who are not yet on dialysis: effects of case mix and the malnutrition-inflammation-cachexia syndrome. *J Am Soc Nephrol* 18: 304–311, 2007. doi:10.1681/ASN.2006060674.
- Ku E, Kopple JD, Johansen KL, McCulloch CE, Go AS, Xie D, Lin F, Hamm LL, He J, Kusek JW, Navaneethan SD, Ricardo AC, Rincon-Choles H, Smogorzewski M, Hsu CY, Appel LJ, Feldman HI, Lash JP, Ojo A, Rahman M, Townsend RR; CRIC Study Investigators. Longitudinal weight change during CKD progression and its association with subsequent mortality. *Am J Kidney Dis* 71: 657–665, 2018. doi:10.1053/j.ajkd.2017.09.015.
- Lee GD, Wilson MA, Zhu M, Wolkow CA, de Cabo R, Ingram DK, Zou S. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5: 515–524, 2006. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00241.x.
- Lopez I, Mendoza FJ, Guerrero F, Almadén Y, Henley C, Aguilera-Tejero E, Rodriguez M. The calcimimetic AMG 641 accelerates regression of extraosseous calcification in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1376–F1385, 2009. doi:10.1152/ajprenal.90737.2008.
- Mak RH, Cheung W. Energy homeostasis and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 21: 1807–1814, 2006. doi:10.1007/s00467-006-0194-3.
- Mak RH, Cheung WW, Gertler A. Exploiting the therapeutic potential of leptin signaling in cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 8: 352–357, 2014. doi:10.1097/SPC.0000000000000092.
- Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Caloric restriction in humans: An update. *Ageing Res Rev* 39: 36–45, 2017. doi:10.1016/j.arr.2016.08.005.
- Omodei D, Fontana L. Caloric restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett* 585: 1537–1542, 2011. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.015.
- Park SY, Choi GH, Choi HI, Ryu J, Jung CY, Lee W. Caloric restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Arch Biochem Biophys* 436: 276–284, 2005. doi:10.1016/j.abb.2005.01.010.
- Peralta-Ramirez A, Montes de Oca A, Raya AI, Pineda C, López I, Guerrero F, Díez E, Muñoz-Castañeda JR, Martínez J, Almadén Y, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, Vitamina E protection of obesity-enhanced vascular calcification in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F422–F429, 2014. doi:10.1152/ajprenal.00355.2013.
- Raya AI, Rios R, Pineda C, Rodríguez-Ortiz ME, Díez E, Almadén Y, Muñoz-Castañeda JR, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, Lopez I. Energy-dense diets increase FGF23, lead to phosphorus retention and promote vascular calcifications in rats. *Sci Rep* 6: 36881, 2016. doi:10.1038/srep36881.
- Rios R, Raya AI, Pineda C, Rodríguez M, Lopez I, Aguilera-Tejero E. Vitamin E protects against extracellular calcification in uremic rats fed high fat diets. *BMC Nephrol* 18: 374, 2017. doi:10.1186/s12882-017-0790-4.
- Rodríguez M, Martín-Malo A, Martínez ME, Torres A, Felsenfeld AJ, Liach F. Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of phosphorus and its effect on calcitriol. *Kidney Int* 40: 1055–1062, 1991. doi:10.1038/ki.1991.314.
- Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 32: 159–221, 2011. doi:10.1016/j.mam.2011.07.001.
- Speakman JR, Westerterp KR. Reverse epidemiology, obesity and mortality in chronic kidney disease: modelling mortality expectations using energetics. *Blood Purif* 29: 150–157, 2010. doi:10.1159/000245642.
- Ureña-Torres P, D'Marco L, Raggi P, García-Moll X, Brandenburg V, Mazzaferro S, Lieber A, Guirado L, Bover J. Valvular heart disease and calcification in CKD: more common than appreciated. *Nephrol Dial Transplant*. In press. doi:10.1093/ndt/gfz133.
- Vidal A, Rios R, Pineda C, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, Raya AI. Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR. *Sci Rep* 10: 1795, 2020. doi:10.1038/s41598-020-58663-7.

F1198

CALORIC RESTRICTION AND VASCULAR CALCIFICATION

30. Villa-Belosta R, Millan A, Sorribas V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C210–C220, 2011. doi:10.1152/ajpcell.00229.2010.
31. Wang SY, Cal GY, Chen XM. Energy restriction in renal protection. *Br J Nutr* 120: 1149–1158, 2018. doi:10.1017/S0007114518002684.
32. Westenfeld R, Schäfer C, Krüger T, Haarmann C, Schurgers LJ, Reutelingsperger C, Ivanovski O, Druke T, Massy ZA, Ketteler M, Floege J, Jahnke-Dechent W. Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol* 20: 1264–1274, 2009. doi:10.1681/ASN.2008060572.
33. Yamada S, Giachelli CM. Vascular calcification in CKD-MBD: roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone* 100: 87–93, 2017. doi:10.1016/j.bone.2016.11.012.
34. Young GS, Kirkland JB. Rat models of caloric intake and activity: relationships to animal physiology and human health. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 161–176, 2007. doi:10.1139/h06-082.



ARTÍCULO 3. Increased 1,25(OH)₂-vitamin D concentrations after energy restriction are associated with changes in skeletal muscle phenotype

Vidal A, Rios R, Pineda C, Lopez I, Raya AI, Aguilera-Tejero E, Rivero JL. Increased 1,25(OH)₂-Vitamin D Concentrations after Energy Restriction Are Associated with Changes in Skeletal Muscle Phenotype. *Nutrients* 2021; 13(2): 607. doi: 10.3390/nu13020607.

Article

Increased 1,25(OH)₂-Vitamin D Concentrations after Energy Restriction are Associated with Changes in Skeletal Muscle Phenotype

Angela Vidal ^{1,2}, Rafael Rios ^{1,2}, Carmen Pineda ^{1,2}, Ignacio Lopez ^{1,2}, Ana I. Raya ^{1,2}, Escolastico Aguilera-Tejero ^{1,2,*†} and Jose-Luis L. Rivero ^{3,†}

¹ Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, 14071 Cordoba, Spain; v92v1ca@uco.es (A.V.); rafariosvaro@me.com (R.R.); v32pimac@uco.es (C.P.); i02lovii@uco.es (I.L.); v82rabea@uco.es (A.I.R.)

² Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, 14004 Cordoba, Spain

³ Department of Comparative Anatomy, Pathological Anatomy, and Toxicology, University of Cordoba, 14071 Cordoba, Spain; anl1lorj@uco.es

* Correspondence: eaguilera@uco.es; Tel.: +34-957-21-8714

† These two authors contributed equally to this work.

Citation: Vidal, A.; Rios, R.; Pineda, C.; Lopez, I.; Raya, A.I.; Aguilera-Tejero, E.; Rivero, J.-L.L. Increased 1,25(OH)₂-Vitamin D Concentrations after Energy Restriction are Associated with Changes in Skeletal Muscle Phenotype. *Nutrients* **2021**, *13*, 607. <https://doi.org/10.3390/nu13020607>

Academic Editor: Tyler Barker
Received: 12 January 2021
Accepted: 9 February 2021
Published: 12 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The influence of energy restriction (ER) on muscle is controversial, and the mechanisms are not well understood. To study the effect of ER on skeletal muscle phenotype and the influence of vitamin D, rats ($n = 34$) were fed a control diet or an ER diet. Muscle mass, muscle somatic index (MSI), fiber-type composition, fiber size, and metabolic activity were studied in tibialis cranialis (TC) and soleus (SOL) muscles. Plasma vitamin D metabolites and renal expression of enzymes involved in vitamin D metabolism were measured. In the ER group, muscle weight was unchanged in TC and decreased by 12% in SOL, but MSI increased in both muscles ($p < 0.0001$) by 55% and 36%, respectively. Histomorphometric studies showed 14% increase in the percentage of type IIA fibers and 13% reduction in type IIX fibers in TC of ER rats. Decreased size of type I fibers and reduced oxidative activity was identified in SOL of ER rats. An increase in plasma 1,25(OH)₂-vitamin D (169.7 ± 6.8 vs. 85.4 ± 11.5 pg/mL, $p < 0.0001$) with kidney up-regulation of CYP27b1 and down-regulation of CYP24a1 was observed in ER rats. Plasma vitamin D correlated with MSI in both muscles ($p < 0.001$), with the percentages of type IIA and type IIX fibers in TC and with the oxidative profile in SOL. In conclusion, ER preserves skeletal muscle mass, improves contractile phenotype in phasic muscles (TC), and reduces energy expenditure in antigravity muscles (SOL). These beneficial effects are closely related to the increases in vitamin D secondary to ER.

Keywords: energy restriction; muscle; vitamin D; rat

1. Introduction

Energy restriction (ER) has been shown to retard aging and to have multiple beneficial effects on health by modulating metabolism and preventing organ deterioration [1]. The effect of ER on skeletal muscle is controversial. Many studies have demonstrated a decrease in skeletal muscle mass after ER, which is explained by activation of metabolic pathways that shift metabolism from anabolism to catabolism and by the use of muscle proteins as a source of energy [2,3]. However, other reports have shown that ER may have benefits on skeletal muscle, particularly in preventing age-related loss of muscle mass [4–7]. A variety of mechanisms have been proposed to explain the beneficial effects of ER on muscle, including: retarding deterioration of neuromuscular function [8], di-

minishing the dysfunction of slow muscles [9], modifying mitochondrial ultrastructure [10], decreasing mitochondrial oxidative damage [11], and increasing skeletal muscle insulin sensitivity [12].

Vitamin D is an essential micronutrient involved in bone and mineral metabolism. Vitamin D is synthesized in the skin or ingested with the diet as cholecalciferol, which subsequently is metabolized in the liver to 25(OH)-cholecalciferol (25(OH)-vitamin D). The 25(OH)-vitamin D is further hydroxylated in the kidney to produce 1,25(OH)₂-cholecalciferol (1,25(OH)₂-vitamin D), which is the major active metabolite of vitamin D [13].

In addition to its bone actions, vitamin D plays an important role in other body systems, including the skeletal muscle [14]. Several studies have found an association between vitamin D deficiency and myopathy or muscle weakness [15–17]. Moreover, many disorders that cause sarcopenia (e.g., aging, chronic kidney disease, obesity/metabolic syndrome) are also associated with vitamin D deficiency [18,19]. Furthermore, vitamin D supplementation has benefits in the treatment of sarcopenia, and adequate vitamin D status helps to prevent loss of muscle mass [20,21].

Vitamin D metabolism is regulated by fibroblast growth factor 23 (FGF23), a hormone produced by bone cells. FGF23 down-regulates 1,25(OH)₂-vitamin D production by the kidney through the inhibition of the enzyme 1- α -hydroxylase (CYP27b1) that metabolizes 25(OH)-vitamin D to 1,25(OH)₂-vitamin D and by stimulation of the catabolic enzyme 24-hydroxylase (CYP24a1) [22]. Recent reports demonstrate that low-calorie diets decrease FGF23 production, which in turn may result in increased 1,25(OH)₂-vitamin D levels [23].

We hypothesized that an increase in 1,25(OH)₂-vitamin D secondary to ER may play a role in the effects of ER on skeletal muscle. Thus, the objectives of this study were (1) to investigate the effect of ER on skeletal muscle histomorphometry and (2) to study the influence of ER on vitamin D metabolism and the relationship between vitamin D metabolites and changes in skeletal muscle mass and phenotype.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Diets

Animals were provided by the Animal Housing Facilities of the University of Córdoba (Córdoba, Spain). Thirty-four female Wistar rats aged two months at the beginning of the study were housed in individual cages with a 12:12 h light/dark cycle. Two diets with identical vitamin D concentration (500 IU/kg) were used in the experiments: control diet containing 3518 Kcal/Kg (Altromin C 1090-10, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Germany) and a diet with a low caloric content, 1314 Kcal/kg (Altromin C 1012, Altromin Spezialfutter GmbH, Germany). Nutrient composition of both diets is shown in Table 1.

Table 1. Analytical composition of the two diets used in the study.

	Control	Energy Restriction
Crude Nutrients (%)		
Nitrogen free extractives	60	24.3
Crude protein	20.7	17.1
Crude fat	4	2
Crude fiber	3.1	44
Crude ash	4.3	5.5
Moisture	7.9	7.1
Metabolized Energy (%)		
Carbohydrates	66	34
Protein	24	52
Fat	10	14

2.2. Experimental Design

Animals were randomly allocated to either a control group or an ER group ($n = 17$ each). Rats allotted to the control group were fed ad libitum the control diet, and rats in the ER group were fed the hypocaloric diet. Food was presented to the rats at 08:00. Since rats fed hypocaloric diet had increased appetite, in this group, food intake was adjusted in order to achieve 40% ER when compared with the control group. The experiments lasted 200 days. At the end of the study, rats were fasted for 12 h (food was withdrawn at 20:00) and sacrificed by exsanguination under general anesthesia (inhaled isoflurane, IsoVet, Braun, Spain) to obtain blood samples from the abdominal aorta and tissue samples from skeletal muscle, abdominal fat, and kidney. Abdominal fat was collected by removing the visceral fat surrounding the intestine and by scraping the inner surface of the abdominal wall.

2.3. Muscle Sampling

Muscles were obtained at the time of sacrifice. Tibialis cranialis (TC) and soleus (SOL) were chosen as representative muscles of fast-twitch and slow-twitch phenotypes, respectively. Both muscles were dissected and wet weighted. Muscle somatic index (MSI), used as a predictor of sarcopenia, was obtained by calculating the muscle weight (mg) to body weight at the time of sacrifice (g) ratio.

After collection, muscles were processed for histomorphometric studies as previously described [24]. Muscle samples were mounted on a cork block by using the Optimal Cutting Temperature (OCT) medium (Tissue-Tek II; Miles Laboratories, Naperville, IL, USA) so that the myofibers were oriented transversely. Thereafter, the samples were frozen by immersion in isopentane for 30 s and immediately transferred to liquid nitrogen to maintain the optimum freezing point. The processed muscles were stored at -80 °C until analyzed.

2.4. Histological Staining and Image Analysis

For histomorphometric studies, muscle samples (SOL and white region of TC) were serially cut in $10\ \mu\text{m}$ sections with a cryostat (Frigocut; Reichert Jung, Nubloch, Germany) at a working temperature of -20 °C. Two histochemical methods previously validated for rat skeletal muscle [25] were used for fiber-type identification: myofibrillar acid-ATPase (mATPase) and succinate dehydrogenase (SDH). These two stains quantify contractile (mATPase) and oxidative (SDH) enzyme activities. Stained sections were digitalized with Pinnacle Studio Software (Pinnacle Systems, version 24.0). A region containing approximately 150 fibers was chosen for morphological analysis using Scion Image Software version 4.0. All images were processed in a greyscale (1 to 255). To assess the oxidative profile, SDH activity was analyzed in optical density (OD) units in a 0 to 0.8 scale. The average fiber OD for the SDH histochemical reaction was determined as the average OD for all pixels within the traced fiber from three sections incubated with substrate (succinic acid) minus the average OD for all pixels of the same fiber from other two sections incubated without substrate. Because a number of factors can influence the reliability of histochemical enzyme activity determinations, the variability on three consecutive sections for the SDH histochemical reaction was checked by repeated measurements of the same individual fibers. Only coefficients of variation for triplicate measurements of ODs below 5% were accepted in the present study; this demonstrated the high analytical precision that can be achieved for the measurement of fiber OD on enzyme histochemical sections.

Since oblique orientation of fibers can occur when cutting muscle samples, both cross sectional area (CSA) and lesser fiber diameter were used to measure fiber size. Lesser fiber diameter is defined as the maximum diameter registered in the region where fiber shows the minor visual size and is designed to avoid the distortion that happens when fibers are not in transversal section. Each measurement was performed manually

using the images from the SDH stain. Pixels were adjusted to micrometers with an appropriate calibrator.

Fiber phenotype was classified in one of the following types: type I, type IIA, type IIX, and type IIB. Hybrid phenotypes were distributed equally to one of its closer types. The percentage of each fiber-type was calculated for both muscles to analyze the fiber-type composition.

2.5. Blood Biochemistry

After blood collection, plasma was separated by centrifugation (3500 rpm for 10 min at 4 °C) and stored at -20 °C until assayed. ELISA test was used to quantify plasma intact FGF23 (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan). Plasma levels of 25(OH)-vitamin D and 1,25(OH)₂-vitamin D were determined by radioimmunoassay (Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK). Assay performance was as follows: 25(OH)-vitamin D: specificity = 100% for 25(OH)-vitamin D₃ and 75% for 25(OH)-vitamin D₂; sensitivity = 1.2 ng/mL. 1,25(OH)₂-vitamin D: specificity = 100% for 1,25(OH)₂-vitamin D₃ and 91% for 1,25(OH)₂-vitamin D₂; sensitivity = 2.1 pg/mL.

2.6. RNA Extraction and Real-Time RT-PCR

Kidney tissue was disrupted using liquid nitrogen and grinded thoroughly with a mortar. Total RNA was isolated using TRIzol reagent protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and a treatment with DNase I amplification Grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was done according to the manufacturer's instruction. Quantification was performed by spectrophotometry (ND1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Fifty nanograms of total RNA were used to analyze mRNA expression in the Light Cycler thermal cycler system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was used for quantification following the manufacturer's protocol. Results were normalized to GAPDH by using the 2^{-ΔΔCt} method. Primers for CYP27b1 and CYP24a1 quantification were purchased from Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Sequences for GAPDH were purchased from Eurofins (Eurofins Genomics, Germany GmbH, Ebersberg, Germany) (Table 2).

Table 2. Sequences of primers used for RT-PCR in renal tissue.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
GAPDH	AGGGCTGCCTTCTCTGTGAC	TGGGTAGAATCATACTGGAACATGTAG
CYP27b1	AAGAGTGATGACTACTGGG	ATAGTATCAAATAGCCGGGG
CYP24a1	AAGTGTGCCATTACAACCT	GTTAACACIGTTCITTTGGG

2.7. Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.01 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Values are expressed as mean ± standard error (SE). The difference between means was determined by Student's t-test. Pearson's test was used for correlation analysis. Differences between means were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Energy Intake, Body Weight, Fat Mass, and Muscle Mass

During the experiments, rats that ate hypocaloric diet lost 12.9% (from 239.0 ± 2.7 to 208.0 ± 3.7 g) of their weight, while control rats gained 31.3% (from 244.6 ± 1.9 to 321.3 ± 7.2 g) of their initial weight, $p < 0.0001$ (Figure 1A). Abdominal fat, weighted at the time of sacrifice, was much lower in ER rats, 1.7 ± 0.2 g, than in controls, 20.4 ± 2.4 g, $p < 0.0001$. Even though rats from the ER group were 35% lighter and had -90% less abdominal fat than rats from the control group, only minor changes in muscle mass were found. ER did

not decrease the weight of TC; however, SOL weighted 12% less in the ER group when compared to the control group, $p = 0.03$ (Figure 1B). MSI, which quantifies the muscle mass related to body weight, was significantly increased in both TC and SOL of rats fed the hypocaloric diet, 55% and 35.5%, respectively, $p < 0.0001$ (Figure 1C).

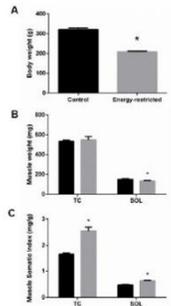


Figure 1. (A) Body weight at the time of sacrifice. (B) Tibialis cranialis (TC) and soleus (SOL) muscle weight, and (C) muscle somatic index. Student's t-test between control (black bars) and energy-restricted (grey bars) groups. * $p < 0.05$ vs. control.

3.2. Muscle Histomorphometry

3.2.1. Fiber-Type Composition

Four muscle fiber-types were identified in TC: types I, IIA, IIX, and IIB. As seen in Figure 2A, when compared with the control group, the TC of rats subjected to ER had a higher proportion of type IIA fibers that were increased by 13.8%, $p = 0.001$, while the percentage of type IIX fibers decreased by 12.8%, $p = 0.006$. ER did not modify the proportion of type I and type IIB fibers in TC. SOL was composed only of type I and type IIA fibers, with a clear predominance of type I fibers. A small reduction in the percentage of type I (2.2%) with a corresponding increase in the percentage of type IIA (2.2%) fibers was observed in SOL of rats from the ER group when compared to control rats (Figure 2B).

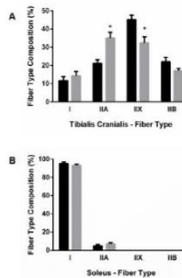


Figure 2. Fiber-type composition of (A) tibialis cranialis (TC) and (B) soleus (SOL) muscles. Student's t-test between control (black bars) and energy-restricted (grey bars) groups. * $p < 0.05$ vs. control.

3.2.2. Muscle Fiber Size

Excellent agreement was found between CSA and lesser fiber diameter, thus all results are reported as CSA. ER resulted in mild generalized atrophy of muscle fibers. In TC, atrophy was more evident in type II fibers than in type I, but the differences did not reach statistical significance in any type of fiber (Figure 3A). By contrast, muscle fiber CSA was significantly decreased in SOL of ER rats, $3313 \pm 245 \mu\text{m}^2$, when compared with controls, $4181 \pm 222 \mu\text{m}^2$, $p = 0.015$. This decrease in fiber size affected mainly type I fibers 3395 ± 260 vs. $4234 \pm 234 \mu\text{m}^2$ in controls, $p = 0.025$ (Figure 3B).

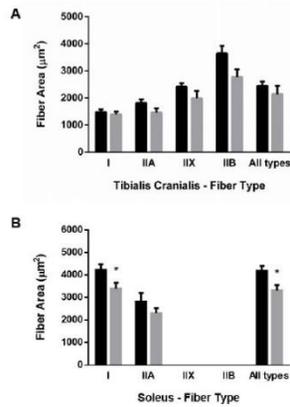


Figure 3. Mean fiber cross-sectional area of (A) tibialis cranialis and (B) soleus muscles. Student's t-test between control (black bars) and energy-restricted (grey bars) groups. * $p < 0.05$ vs. control.

3.2.3. Muscle Oxidative Profile

As shown in Figure 4A, the oxidative profile of muscle fibers, measured by SDH activity, did not change in TC. In contrast, in SOL, SDH activity was reduced in type I fibers of rats from the ER group, 0.41 ± 0.01 vs. 0.47 ± 0.01 OD units in the control group, $p < 0.001$ (Figure 4B).

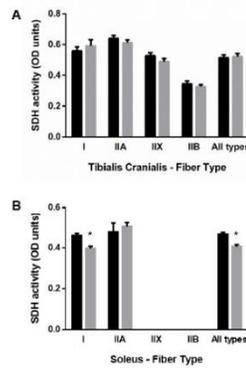


Figure 4. Mean fiber succinate dehydrogenase (SDH) activity in (A) tibialis cranialis and (B) soleus muscles. Student’s t-test between control (black bars) and energy-restricted (grey bars) groups. * $p < 0.05$ vs. control.

3.3. Studies on Vitamin D and Related Metabolites

Plasma 25(OH)-vitamin D concentration was not different between groups, 19.9 ± 1.7 vs. 23.2 ± 1.8 ng/mL, $p = 0.181$ (Figure 5A), but plasma 1,25(OH)₂-vitamin D concentration was higher in energy-restricted rats, 169.7 ± 6.8 pg/mL, than in controls, 85.4 ± 11.5 pg/mL, $p < 0.0001$ (Figure 5B). The increase in 1,25(OH)₂-vitamin D levels was consistent with the results of mRNA assays, which showed an increase in the renal expression (mRNA/GAPDH) of CYP27b1, 3.01 ± 0.78 vs. 1.24 ± 0.31 , $p = 0.027$ (Figure 5C) and a decrease in the renal expression of CYP24a1, 0.14 ± 0.11 vs. 1.30 ± 0.31 , $p = 0.011$ (Figure 5D) in ER rats. ER rats also had lower plasma concentrations of FGF23, 151.2 ± 14.1 pg/mL, than control rats, 324.5 ± 16.8 pg/mL, $p < 0.0001$ (Figure 5E).

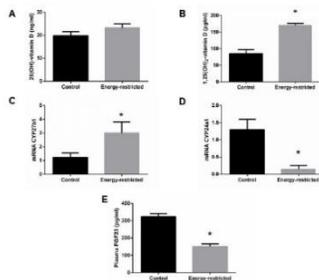


Figure 5. (A) Plasma concentrations of 25(OH)-vitamin D and (B) 1,25(OH)₂-vitamin D, (C) kidney mRNA expression of the enzymes CYP27b1 and (D) CYP24a1 relative to GAPDH, and (E) plasma concentrations of fibroblast growth factor 23 (FGF23). Student’s t-test between control (black bars) and energy-restricted (grey bars) groups. * $p < 0.05$ vs. control.

The increase in plasma 1,25(OH)₂-vitamin D was positively correlated with the increase in MSI observed in rats from the ER group in both muscles, TC and SOL (Figure 6). Changes of fiber-type composition in TC were also well correlated to plasma 1,25(OH)₂-vitamin D concentration; the increase in 1,25(OH)₂-vitamin D after ER was positively correlated with the percentage of type II A fibers ($r = 0.772$, $p < 0.001$) and inversely correlated with the percentage of type IIX fibers ($r = -0.638$, $p = 0.004$). In addition, a significant inverse correlation between plasma 1,25(OH)₂-vitamin D and SDH activity was observed in SOL ($r = -0.491$, $p = 0.009$).

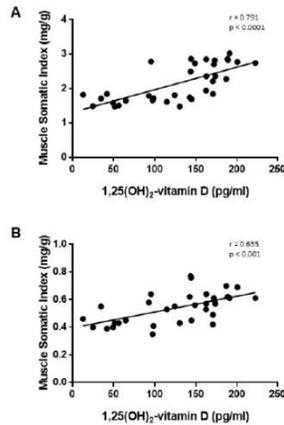


Figure 6. Correlation study (Pearson test) between plasma concentrations of 1,25(OH)₂-vitamin D vs. muscle somatic index in (A) tibialis cranialis and (B) soleus muscles of control and energy-restricted rats.

4. Discussion

This study was designed to investigate the effect of ER on skeletal muscle phenotype and the influence of vitamin D on these changes. Our results demonstrate that, although ER promoted lack of continuous growth of postural muscles, the MSI was, in fact, increased. Moreover, after ER, fast-twitch muscles tended to evolve to a slower phenotype. These skeletal muscle changes were strongly correlated with the increase in plasma concentrations of 1,25(OH)₂-vitamin D found in ER rats.

The protocols that are more widely used for ER in rodents involve a reduction of the total amount of food provided to the animals, either by decreasing daily food intake or, less frequently, by alternate day feeding [26,27]. These protocols not only reduce energy intake but also protein intake, which is essential for maintenance of muscle growth and function [28,29]. To avoid this limitation and to isolate the effect of energy intake on muscle, in the present study, rats were fed a hypocaloric diet that provided normal amount of proteins but reduced calories. In fact, in our effort to prevent protein restriction, ER rats ended up ingesting slightly more proteins than controls throughout the experiments (798 vs. 670 g, $p < 0.05$), and this may have had some partly anti-catabolic effect on muscle. Previous studies have shown that adequate intake of high-quality pro-

teins is a factor in promoting muscle protein synthesis and preventing loss of muscle strength associated with aging [30].

The effect of ER on skeletal muscle mass is controversial. A number of studies have reported that ER reduces muscle weight and size [31–34], but this outcome has been shown to change over time and is not consistent in all muscles [33,35]. Our results agree with these reports since we observed a decrease in muscle mass in SOL but not in TC. The disparity may be explained by the function of each muscle. SOL is a postural muscle whose main function is to support body weight; therefore, the reduction of body weight after ER would decrease the stimulus for SOL growth [36], which was reflected in decreased muscle mass and decreased fiber size. These results are consistent with human studies that have shown decreased fiber size in women with low body weight [37]. This effect was not seen in TC, which is mainly used for locomotion and would be affected preferentially by physical activity [38]. All these data seem to indicate that the muscle atrophy observed after ER is more likely related to decreased body weight than to diminishing energy availability.

In agreement with other studies [33,39], we found an increase in the MSI of both muscles in ER rats. The increase in MSI was influenced by the decrease in body weight and more specifically by the decrease in body fat. However, these results cannot be considered a mathematical artifact because they reflect preservation of muscle mass in the face of severe ER. Moreover, the higher MSI should provide functional advantages [40,41].

For this study, we selected two muscles with different contractile and metabolic phenotypes, SOL and TC. SOL is a slow-twitch muscle mostly composed by type I fibers while TC is a fast-twitch muscle with a predominance of type II fibers. Phenotype of skeletal muscle is not static and can be modulated by different factors such as nutrition, exercise, or disease [42–44]. Phenotypic changes are more common in phasic muscles which participate in propulsion during the movement. After exercise and training, phasic muscles adapt to a slower contractile profile, which improves resistance and reduces the effects of muscle fatigue [45,46]. Likewise, the metabolic profile of the fibers also changes to preserve oxidative activity [47]. In this study, the rats on ER experienced a fast-to-slow switch in the fiber composition of TC without changes in the oxidative profile. The contractile phenotype of TC after ER was characterized by an increase in type IIA and a decrease in type IIX fibers as well as a tendency to increase type I fibers. Our results agree with previous reports demonstrating that ER ameliorates the effect of aging on muscle by reducing the percentage of type IIX and increasing type IIA fibers [39]. These changes are similar to the remodeling observed during training and are likely to improve muscle function [47,48]. In SOL, we did not find any significant changes in fiber type distribution, but oxidative profile was reduced in rats subjected to ER, and the decrease in SDH activity reached statistical significance in type I fibers. The decrease of this mitochondrial enzyme in SOL would be consistent with the need to support less body weight.

Rats subjected to ER had increased levels of 1,25(OH)₂-vitamin D, and plasma concentrations of 1,25(OH)₂-vitamin D showed a strong positive correlation with MSI both in TC and SOL. Although correlation does not always mean causation, vitamin D is known to be involved in skeletal muscle function and growth [49,50] and has been shown to induce hypertrophy of muscle fibers [51]. Thus, the increase in 1,25(OH)₂-vitamin D levels found after ER is likely to produce anabolic effects on muscle. Vitamin D has been reported to influence muscle phenotype by modulating the number of type IIA fibers [50,52]. Interestingly, we found that the increase in the percentage of type II fibers after ER was strongly correlated to plasma 1,25(OH)₂-vitamin D levels. These data are also in agreement with a recent study showing that 1,25(OH)₂-vitamin D administration corrected the changes induced by uremia in the skeletal muscle of rats and increased the percentage of type IIA fibers [24].

The mechanisms by which 1,25(OH)₂-vitamin D influences muscle phenotype have not been fully elucidated. The action of 1,25(OH)₂-vitamin D on muscle is likely to be

mediated by interaction with the vitamin D receptor (VDR). VDR over-expression has been reported to promote muscle anabolism [53], while VDR knockouts show muscle atrophy [54]. The $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D stimulates myogenesis through both genomic and non-genomic VDR-mediated mechanisms. Genomic actions involve interactions with vitamin D response element (VDRE), which has been found in many myogenic-related genes. Non-genomic mechanisms seem to affect mainly signal transduction in the ubiquitin-proteasomal pathway [55].

Previous work has demonstrated that energy intake directly regulates plasma FGF23 synthesis and secretion by bone cells. High caloric intake results in an increase in plasma FGF23, while reduced caloric intake decreases plasma FGF23 [23,56]. Our results showing lower FGF23 concentrations in the plasma of rats subjected to ER than in controls are consistent with these findings. FGF23 is a major regulator of vitamin D metabolism that inhibits the production of active vitamin D by modulating renal enzymes involved in $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D synthesis and catabolism. The data collected in the present study demonstrate that ER rats had significantly higher plasma concentrations of $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D than controls. No significant differences between controls and ER rats were found in the plasma concentrations of $25(\text{OH})$ -vitamin D. Given that $25(\text{OH})$ -vitamin D is the most reliable marker of dietary vitamin D status, any effect due to a difference in vitamin D intake between groups can be ruled out. However, ER resulted in a significant up-regulation of the main enzyme involved in $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D synthesis, CYP27b1, and a significant down-regulation of the main enzyme involved in $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D catabolism, CYP24a1. It is interesting to note that CYP24a1 was down-regulated even in the presence of elevated $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D, which, through interaction with kidney VDR, is known to up-regulate CYP24a1 [57]. Since these enzymes, CYP27b1 and CYP24a1, are directly regulated by FGF23, the increase in plasma $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D concentration seems to be secondary to the decrease in FGF23 production after ER.

Sequestration of vitamin D in adipose tissue [58] and volumetric dilution [59] have been proposed as mechanisms that may reduce vitamin D concentrations in obese people. Theoretically, the opposite, i.e., release from fat and volumetric concentration, could occur after ER. Although these mechanisms apply mostly to vitamin D and $25(\text{OH})$ -vitamin D, they might also have some influence on circulating levels of $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D and could have contributed to the increased concentrations observed in ER rats.

The proposed mechanisms, involving a bone-kidney-muscle axis by which ER may influence muscle mass and phenotype through vitamin D up-regulation, are summarized in Figure 7.

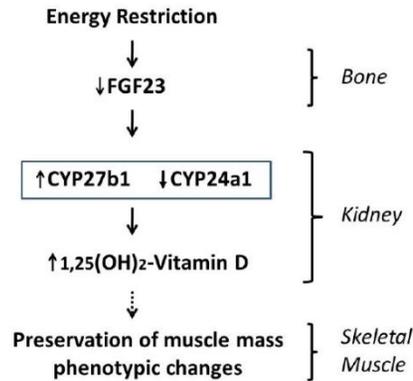


Figure 7. Proposed mechanism by which energy restriction modulates skeletal muscle mass and phenotype through regulation of vitamin D metabolism.

This study has some limitations. Since ER acts at many different levels, it is difficult to dissociate the effects of increased 1,25(OH)₂-vitamin D from other influences of ER on muscle, such as modifications in mechanical load or changes in glucose metabolism/insulin sensitivity.

5. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that ER preserves skeletal muscle mass and modifies skeletal muscle fiber to a slower phenotype in phasic muscles (TC). These beneficial effects are closely related to the increases in 1,25(OH)₂-vitamin D levels secondary to activation of the bone–renal axis after ER that subsequently may impact muscle.

Author Contributions: E.A.-T. and J.-L.L.R. conceived and designed the study; A.V., R.R., C.P., I.L., and A.I.R. performed experiments; A.V., E.A.-T. and J.-L.L.R. analyzed data; A.V. and E.A.-T. drafted manuscript; A.V., R.R., C.P., I.L., A.I.R., E.A.-T. and J.L.L.R. edited and revised manuscript; A.V., R.R., C.P., I.L., A.I.R., E.A.-T. and J.-L.L.R. approved final version of manuscript. Additionally, E.A.-T. contributed to funding for this project. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a Spanish Government Grant from the Instituto de Salud Carlos III, grant number PI17/00169 (Co-funded by FEDER, European Regional Development Fund; “A way to make Europe”/“Investing in your future”).

Institutional Review Board Statement: All experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Cordoba and by Junta de Andalucía (Spain) (Ethical Code Number 30/10/2017/148, date 08/11/2017). All protocols were carried out following the approved guidelines. They followed the guiding principle laid down by the Higher Council of Scientific Research of Spain following the normal procedures directing animal welfare and adhered to the recommendations included in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (US Department of Health and Human Services, NIH) and European laws (Art. 41.1, Real Decreto 53/2013, 01/02 Dec 2012/707/UE) and regulations on the protection of animals, under the advice of specialized personnel.

Infomed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Omodei, D.; Fontana, L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1537–1542, doi:10.1016/j.febslet.2011.03.015.
- Lee, D.; Goldberg, A.L. SIRT1 Protein, by Blocking the Activities of Transcription Factors FoxO1 and FoxO3, Inhibits Muscle Atrophy and Promotes Muscle Growth. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 30515–30526, doi:10.1074/jbc.m113.489716.
- Park, B.-S.; Henning, P.C.; Grant, S.C.; Lee, W.J.; Lee, S.-R.; Arjmandi, B.H.; Kim, J.-S. HMB attenuates muscle loss during sustained energy deficit induced by calorie restriction and endurance exercise. *Metabolism* **2013**, *62*, 1718–1729, doi:10.1016/j.metabol.2013.06.005.
- Aspnes, L.E.; Lee, C.M.; Weindruch, R.; Chung, S.S.; Roecker, E.B.; Aiken, J.M. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *FASEB J.* **1997**, *11*, 573–581, doi:10.1096/fasebj.11.7.9212081.
- Hepple, R.T.; Qin, M.; Nakamoto, H.; Goto, S. Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle: Implications for sarcopenia. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R1231–R1237, doi:10.1152/ajpregu.90478.2008.
- McKiernan, S.H.; Colman, R.J.; Lopez, M.; Beasley, T.; Aiken, J.M.; Anderson, R.M.; Weindruch, R. Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46*, 23–29, doi:10.1016/j.exger.2010.09.011.
- Phillips, T.; Leeuwenburgh, C. Muscle fiber-specific apoptosis and TNF- α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1–33, doi:10.1096/fj.04.2870fje.
- Stockinger, J.; Maxwell, N.; Shapiro, D.; Decabo, R.; Valdez, G. Caloric Restriction Mimetics Slow Aging of Neuromuscular Synapses and Muscle Fibers. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2017**, *73*, 21–28, doi:10.1093/gerona/glx023.
- Yoshida, S.; Yamahara, K.; Kume, S.; Koya, D.; Yasuda-Yamahara, M.; Takeda, N.; Osawa, N.; Chin-Kanasaki, M.; Adachi, Y.; Nagao, K.; et al. Role of dietary amino acid balance in diet restriction-mediated lifespan extension, renoprotection, and muscle weakness in aged mice. *Aging Cell* **2018**, *17*, e12796, doi:10.1111/acer.12796.
- Gutiérrez-Casado, E.; Khraiwesh, H.; López-Domínguez, J.A.; Montero-Guisado, J.; López-Lluch, G.; Navas, P.; De Cabo, R.; Ramsey, J.J.; González-Reyes, J.A.; Villalba, J.M. The Impact of Aging, Calorie Restriction and Dietary Fat on Autophagy Markers and Mitochondrial Ultrastructure and Dynamics in Mouse Skeletal Muscle. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2019**, *74*, 760–769, doi:10.1093/gerona/gly161.
- Chen, Y.; Hagopian, K.; Bibus, D.; Villalba, J.M.; López-Lluch, G.; Navas, P.; Kim, K.; Ramsey, J.J. The Influence of Dietary Lipid Composition on Skeletal Muscle Mitochondria From Mice Following Eight Months of Calorie Restriction. *Physiol. Res.* **2014**, *63*, 57–71, doi:10.33549/physiolres.932529.
- Martins, V.F.; Tahvilian, S.; Kang, J.H.; Svensson, K.; Hetrick, B.; Chick, W.S.; Schenk, S.; McCurdy, C.E. Calorie Restriction-Induced Increase in Skeletal Muscle Insulin Sensitivity Is Not Prevented by Overexpression of the p53 α Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 789, doi:10.3389/fphys.2018.00789.
- Zhang, R.; Naughton, D.P. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr. J.* **2010**, *9*, 65, doi:10.1186/1475-2891-9-65.
- Arima, K.; Mizukami, S.; Nishimura, T.; Tomita, Y.; Nakashima, H.; Abe, Y.; Aoyagi, K. Epidemiology of the association between serum 25-hydroxyvitamin D levels and musculoskeletal conditions among elderly individuals: A literature review. *J. Physiol. Anthr.* **2020**, *39*, 1–6, doi:10.1186/s40101-020-00249-3.
- Ceglia, L. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2009**, *12*, 628–633, doi:10.1097/mco.0b013e328331c707.
- Chiang, C.-M.; Ismael, A.; Griffiths, R.B.; Weems, S. Effects of Vitamin D Supplementation on Muscle Strength in Athletes. *J. Strength Cond. Res.* **2017**, *31*, 566–574, doi:10.1519/jsc.0000000000001518.
- Yagüe, M.D.L.P.; Yurrita, L.C.; Cabañas, M.J.C.; Cenual, M.A.C. Role of Vitamin D in Athletes and Their Performance: Current Concepts and New Trends. *Nutrients* **2020**, *12*, 579, doi:10.3390/nu12020579.
- Holick, M.F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2017**, *18*, 153–165, doi:10.1007/s11154-017-9424-1.
- Wimalawansa, S.J. Associations of vitamin D with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *175*, 177–189, doi:10.1016/j.jsbmb.2016.09.017.
- Bruyère, O.; Cavalier, E.; Reginster, J.-Y. Vitamin D and osteosarcopenia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2017**, *20*, 498–503, doi:10.1097/mco.0000000000000411.

21. Chang, W.-T.; Wu, C.-H.; Hsu, L.-W.; Chen, P.-W.; Yu, J.-R.; Chang, C.-S.; Tsai, W.-C.; Liu, P.-Y. Serum vitamin D, intact parathyroid hormone, and Fetuin A concentrations were associated with geriatric sarcopenia and cardiac hypertrophy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40996, doi:10.1038/srep40996.
22. Hasegawa, H.; Nagano, N.; Urakawa, I.; Yamazaki, Y.; Iijima, K.; Fujita, T.; Yamashita, T.; Fukumoto, S.; Shimada, T. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 975–980, doi:10.1038/ki.2010.313.
23. Vidal, A.; Rios, R.; Pineda, C.; Lopez, I.; Muñoz-Castañeda, J.R.; Rodríguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Raya, A.I. Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1795–10, doi:10.1038/s41598-020-58663-7.
24. Acevedo, L.M.; López, I.; Peralta-Ramírez, A.; Pineda, C.; Chamizo, V.E.; Rodríguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Rivero, J.-L.L. High-phosphorus diet maximizes and low-dose calcitriol attenuates skeletal muscle changes in long-term uremic rats. *J. Appl. Physiol.* **2016**, *120*, 1059–1069, doi:10.1152/jappphysiol.00957.2015.
25. Rivero, J.-L.L.; Talmadge, R.J.; Edgerton, V.R. Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based fiber types in rat skeletal muscle. *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *111*, 277–287, doi:10.1007/s004180050358.
26. Ingram, D.K.; De Cabo, R. Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *39*, 15–28, doi:10.1016/j.arr.2017.05.008.
27. Xie, K.; Neff, F.; Markert, A.; Rozman, J.; Aguilar-Pimentel, J.A.; Amarie, O.V.; Becker, L.; Brommage, R.; Garrett, L.; Henzel, K.S.; et al. Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–19, doi:10.1038/s41467-017-00178-3.
28. Agarwal, E.; Miller, M.W.; Yaxley, A.; Isenring, E. Malnutrition in the elderly: A narrative review. *Maturitas* **2013**, *76*, 296–302, doi:10.1016/j.maturitas.2013.07.013.
29. Prescod, A.L.V.; Halliday, W.C.; Taylor, C.G. Protein deficiency, but not zinc deficiency, reduces recovery of type 1 and type 2 muscle fibre diameters in the gastrocnemius muscle of growing rats. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 675–682, doi:10.1017/s0007114511000699.
30. Walrand, S.; Zangarelli, A.; Guillet, C.; Salles, J.; Soulier, K.; Giraudet, C.; Patrac, V.; Boirie, Y. Effect of fast dietary proteins on muscle protein synthesis rate and muscle strength in ad libitum-fed and energy-restricted old rats. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 1683–1690, doi:10.1017/s0007114511002182.
31. Chomentowski, P.; Dubé, J.J.; Amati, F.; Stefanovic-Racic, M.; Zhu, S.; Toledo, F.G.; Goodpaster, B.H. Moderate Exercise Attenuates the Loss of Skeletal Muscle Mass That Occurs With Intentional Caloric Restriction-Induced Weight Loss in Older, Overweight to Obese Adults. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2009**, *64*, 575–580, doi:10.1093/gerona/64.5.575.
32. Lu, Y.; Bradley, J.S.; McCoski, S.R.; Gonzalez, J.M.; Ealy, A.D.; Johnson, S.E. Reduced skeletal muscle fiber size following caloric restriction is associated with calpain-mediated proteolysis and attenuation of IGF-1 signaling. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *312*, R806–R815, doi:10.1152/ajpregu.00400.2016.
33. McKiernan, S.H.; Bua, E.; McGorray, J.; Aiken, J. Early-onset caloric restriction conserves fiber number in aging rat skeletal muscle. *FASEB J.* **2004**, *18*, 580–581, doi:10.1096/fj.03-0667fje.
34. Hoek, A.M.V.D.; Zondag, G.C.; Verschuuren, L.; De Ruiter, C.; Attena, J.; De Wit, E.C.; Schwerk, A.M.; Guigas, B.; Lek, S.; Rietman, A.; et al. A novel nutritional supplement prevents muscle loss and accelerates muscle mass recovery in caloric-restricted mice. *Metabolism* **2019**, *97*, 57–67, doi:10.1016/j.metabol.2019.05.012.
35. Boldrin, L.; Ross, J.A.; Whitmore, C.; Doreste, B.; Beaver, C.; Eddaoudi, A.; Pearce, D.J.; Morgan, J.E. The effect of caloric restriction on mouse skeletal muscle is sex, strain and time-dependent. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5160, doi:10.1038/s41598-017-04896-y.
36. Baldwin, K.M.; Haddad, F.; Pandorf, C.E.; Roy, R.R.; Edgerton, V.R. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: Role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 284, doi:10.3389/fphys.2013.00284.
37. Galsuca, B.; Verney, J.; Meugnier, E.; Ling, Y.; Edouard, P.; Feasson, L.; Ravelojaona, M.; Vidal, H.; Estour, B.; Germain, N. Reduced fibre size, capillary supply and mitochondrial activity in constitutional thinness' skeletal muscle. *Acta Physiol.* **2018**, *224*, e13097, doi:10.1111/apha.13097.
38. Hoppeler, H.; Flück, M. Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 2143–2152.
39. Fattig, J.; Leduc-Gaudet, J.-P.; Reynaud, O.; Ferland, G.; Gaudreau, P.; Goussillou, G. Effects of Aging and Caloric Restriction on Fiber Type Composition, Mitochondrial Morphology and Dynamics in Rat Oxidative and Glycolytic Muscles. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 420, doi:10.3389/fphys.2019.00420.
40. Granic, A.; Sayer, A.A.; Robinson, S.M. Dietary Patterns, Skeletal Muscle Health, and Sarcopenia in Older Adults. *Nutrients* **2019**, *11*, 745, doi:10.3390/nu11040745.
41. Larsson, L.; Degens, H.; Li, M.; Salviati, L.; Lee, Y.I.; Thompson, W.; Kirkland, J.L.; Sandri, M. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 427–511, doi:10.1152/physrev.00061.2017.
42. Collino, M.; Mastrocola, R.; Nigro, D.; Chiazza, F.; Aragno, M.; D'Antona, G.; Minetto, M.A. Variability in Myosteatosis and Insulin Resistance Induced by High-Fat Diet in Mouse Skeletal Muscles. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–10, doi:10.1155/2014/569623.
43. Hearn, M.A.; Hammond, K.M.; Fell, J.M.; Morton, J.P. Regulation of Muscle Glycogen Metabolism during Exercise: Implications for Endurance Performance and Training Adaptations. *Nutrients* **2018**, *10*, 298, doi:10.1007/s004180050358.

44. Puthucherry, Z.A.; Astin, R.; McPhail, M.J.W.; Saeed, S.; Pasha, Y.; E.; Bear, D.; Constantin, D.; Velloso, C.; Manning, S.; Calvert, L.; et al. Metabolic phenotype of skeletal muscle in early critical illness. *Thorax* **2018**, *73*, 926–935, doi:10.1136/thoraxjnl-2017-211073.
45. Mujika, I.; Rønnestad, B.R.; Martin, D.T. Effects of Increased Muscle Strength and Muscle Mass on Endurance-Cycling Performance. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* **2016**, *11*, 283–289, doi:10.1123/ijpp.2015.0405.
46. Pons, V.; Riera, J.; Capó, X.; Martorell, M.; Sureda, A.; Tur, J.A.; Drobnic, F.; Pons, A. Calorie restriction regime enhances physical performance of trained athletes. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2018**, *15*, 12, doi:10.1186/s12970-018-0214-2.
47. St-Jean-Pelletier, F.; Pion, C.H.; Leduc-Gaudet, J.-P.; Sgarioni, N.; Zovilé, I.; Barbat-Artigas, S.; Reynaud, O.; Alkaterji, F.; Lemieux, F.C.; Grenon, A.; et al. The impact of ageing, physical activity, and pre-frailty on skeletal muscle phenotype, mitochondrial content, and intramyocellular lipids in men. *J. Cachex Sarcopenia Muscle* **2017**, *8*, 213–228, doi:10.1002/jcsm.12139.
48. Zierath, J.R.; Hawley, J.A. Skeletal Muscle Fiber Type: Influence on Contractile and Metabolic Properties. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e348, doi:10.1371/journal.pbio.0020348.
49. Dawson-Hughes, B. Vitamin D and muscle function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *173*, 313–316, doi:10.1016/j.jsbmb.2017.03.018.
50. Książek, A.; Zagrodna, A.; Stowirska-Lisowska, M. Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes—A Narrative Review. *Nutrients* **2019**, *11*, 1800, doi:10.3390/nu11081800.
51. Montenegro, K.R.; Cruzat, V.; Carlessi, R.; Newsholme, P. Mechanisms of vitamin D action in skeletal muscle. *Nutr. Res. Rev.* **2019**, *32*, 192–204, doi:10.1017/s0954422419000064.
52. Garcia, M.; Seelaender, M.; Sotiropoulos, A.; Coletti, D.; Lancha, A.H. Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrients* **2019**, *60*, 66–69, doi:10.1016/j.nut.2018.09.031.
53. Bass, J.J.; Nakhuda, A.; Deane, C.S.; Brook, M.S.; Wilkinson, D.J.; Phillips, B.E.; Pulp, A.; Tarum, J.; Kadi, F.; Andersen, D.; et al. Overexpression of the vitamin D receptor (VDR) induces skeletal muscle hypertrophy. *Mol. Metab.* **2020**, *42*, 101059, doi:10.1016/j.molmet.2020.101059.
54. Bass, J.J.; Kazi, A.A.; Deane, C.S.; Nakhuda, A.; Ashcroft, S.P.; Brook, M.S.; Wilkinson, D.J.; Phillips, B.E.; Pulp, A.; Tarum, J.; et al. The mechanisms of skeletal muscle atrophy in response to transient knockdown of the vitamin D receptor in vivo. *J. Physiol.* **2021**, *599*, 963–979, doi:10.1113/jp.280652.
55. Bollen, S.E.; Atherton, P.J. Myogenic, genomic and non-genomic influences of the vitamin D axis in skeletal muscle. *Cell Biochem. Funct.* **2021**, *39*, 48–59, doi:10.1002/cbf.3595.
56. Raya, A.I.; Rios, R.; Pineda, C.; Rodriguez-Ortiz, M.E.; Diez, E.; Almaden, Y.; Muñoz-Castañeda, J.R.; Rodriguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Lopez, I. Energy-dense diets increase FGF23, lead to phosphorus retention and promote vascular calcifications in rats. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36881, doi:10.1038/srep36881.
57. Murayama, A.; Takeyama, K.-I.; Kitanaka, S.; Kodera, Y.; Kawaguchi, Y.; Hosoya, T.; Kato, S. Positive and Negative Regulations of the Renal 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Gene by Parathyroid Hormone, Calcitonin, and 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in Intact Animals*. *Endocrinology* **1999**, *140*, 2224–2231, doi:10.1210/endo.140.5.6691.
58. Wortsman, J.; Matsuoka, L.Y.; Chen, T.C.; Lu, Z.; Holick, M.F. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 690–693, doi:10.1093/ajcn/72.3.690.
59. Vranić, L.; Mikolašević, I.; Milić, S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Medicina* **2019**, *55*, 541, doi:10.3390/medicina55090541.

ARTÍCULO 4. Caloric Intake in Renal Patients: Repercussions on Mineral Metabolism

Vidal A, Ríos R, Pineda C, López I, Raya AI, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M. Caloric Intake in Renal Patients: Repercussions on Mineral Metabolism. *Nutrients* 2020; 13(1): 18. doi: 10.3390/nu13010018.

Review

Caloric Intake in Renal Patients: Repercussions on Mineral Metabolism

Angela Vidal ^{1,2} , Rafael Ríos ^{1,2}, Carmen Pineda ^{1,2} , Ignacio López ^{1,2}, Ana I. Raya ^{1,2}, Escolástico Aguilera-Tejero ^{1,2,*} and Mariano Rodríguez ^{2,†}

¹ Department Medicina y Cirugía Animal, University of Cordoba, 14071 Cordoba, Spain; v92vicaa@uco.es (A.V.); rafariosvaro@me.com (R.R.); v32pimac@uco.es (C.P.); i02lovii@uco.es (I.L.); v82rabea@uco.es (A.I.R.)

² Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMBIC), University of Cordoba, 14004 Cordoba, Spain; marianorodriguezportillo@gmail.com

* Correspondence: eaguilera@uco.es; Tel.: +34-957-21-8714

† These two authors contributed equally to this work.

Abstract: The aim of this paper is to review current knowledge about how calorie intake influences mineral metabolism focussing on four aspects of major interest for the renal patient: (a) phosphate (P) handling, (b) fibroblast growth factor 23 (FGF23) and calcitriol synthesis and secretion, (c) metabolic bone disease, and (d) vascular calcification (VC). Caloric intake has been shown to modulate P balance in experimental models: high caloric intake promotes P retention, while caloric restriction decreases plasma P concentrations. Synthesis and secretion of the phosphaturic hormone FGF23 is directly influenced by energy intake; a direct correlation between caloric intake and FGF23 plasma concentrations has been shown in animals and humans. Moreover, in vitro, energy availability has been demonstrated to regulate FGF23 synthesis through mechanisms in which the molecular target of rapamycin (mTOR) signalling pathway is involved. Plasma calcitriol concentrations are inversely proportional to caloric intake due to modulation by FGF23 of the enzymes implicated in vitamin D metabolism. The effect of caloric intake on bone is controversial. High caloric intake has been reported to increase bone mass, but the associated changes in adipokines and cytokines may as well be deleterious for bone. Low caloric intake tends to reduce bone mass but also may provide indirect (through modulation of inflammation and insulin regulation) beneficial effects on bone. Finally, while VC has been shown to be exacerbated by diets with high caloric content, the opposite has not been demonstrated with low calorie intake. In conclusion, although prospective studies in humans are needed, when planning caloric intake for a renal patient, it is important to take into consideration the associated changes in mineral metabolism.

Keywords: diet; calories; mineral metabolism; kidney disease



Citation: Vidal, A.; Ríos, R.; Pineda, C.; López, I.; Raya, A.I.; Aguilera-Tejero, E.; Rodríguez, M. Caloric Intake in Renal Patients: Repercussions on Mineral Metabolism. *Nutrients* **2021**, *13*, 18. <https://dx.doi.org/10.3390/nu13010018>

Received: 12 November 2020

Accepted: 19 December 2020

Published: 23 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Caloric intake is known to influence the development and progression of renal disease. In general, diets rich in calories (due to increased fat or to increased carbohydrates) are deleterious for the kidneys. Diets with high fat content have been reported to cause renal damage in non-obese animals that did not develop type 2 diabetes, suggesting a direct effect of high fat/high calorie intake on the kidney [1]. Podocyte injury secondary to inflammasome activation [2] and down-regulation of the sirtuin type 1 (Sirt1)-adiponectin axis [3] seem to be involved in nephrotoxicity associated with elevated caloric intake. High caloric intake is also known to alter the expression of genes related to cytoskeleton remodelling and to induce renal fibrosis [4]. In addition to promoting direct kidney damage, high caloric intake also affects renal disease indirectly (through the development of obesity and type 2 diabetes). Obesity may influence the progression of chronic kidney disease (CKD) due to its effects on renal hemodynamics that result in hyperfiltration, increased

glomerular pressure, and podocyte damage [5,6]. Type 2 diabetes causes renal disease secondary to microvascular changes within the kidney and metabolic abnormalities leading to thickening of the glomerular basement membrane, expansion of the mesangial matrix, nodular glomerulosclerosis, arteriolar hyalinosis, endothelial dysfunction, and podocyte injury [7].

Conversely, caloric restriction (CR) has been shown to protect the kidneys and preserve renal function [8]. CR, defined as a reduction in daily caloric intake below the amount that would be consumed ad libitum without incurring in malnutrition, can be achieved by a variety of means including (a) reducing the total amount of food that is eaten daily, (b) changing the diet composition by decreasing energy-dense nutrients, (c) modifying eating habits with intermittent periods of fasting, or (d) by medical interventions, such as bariatric surgery [9,10]. The variety of protocols that may lead to CR makes it difficult to compare the outcomes. However, most experimental studies with animals and the few studies that have investigated the relationship between CR and mineral metabolism tend to use a reduction in the total amount of food that averages around 30% of daily intake [11]. Short-term CR decelerates renal aging by preventing increases in glomerular volume, decreasing fibrosis, and reducing senescence-associated β -galactosidase staining in aged rats [12]. Long-term CR was found to exert beneficial effects in rodents at different stages (from early onset to advanced kidney failure) of renal disease [13]. Although the exact mechanisms for the renoprotective effect of CR are not known some of the reported changes observed after CR that may be beneficial for the kidney include improving mitochondrial biogenesis and DNA repair, reducing inflammation and oxidative stress [13], increasing AMP-activated protein kinase and Sirt1, increasing autophagy, reducing molecular target of rapamycin (mTOR) [13–15], and lowering the soluble form of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) [16]. CR has also been reported to ameliorate renal function resulting in decreased concentrations of serum urea nitrogen, serum creatinine, and urine protein and to increase survival rate in rodents with CKD [17].

Adjusting caloric intake in the renal patient is not straightforward, and the recommendations are related to the stage of kidney disease. CKD is commonly classified in 5 stages, according to the reduction in glomerular filtration rate (GFR): stage 1 (GFR > 90 mL/min), stage 2 (GFR = 60–89 mL/min), stage 3 (GFR = 30–59 mL/min), stage 4 (GFR = 15–29 mL/min), and stage 5 (GFR < 15 mL/min) [18]. In earlier stages (CKD stages 1 and 2), most patients (especially the obese population with type 2 diabetes) would benefit from CR. As renal deterioration progresses, patients commence losing appetite and weight. Weight loss may start early in the course of renal disease and is associated with progression of CKD and mortality [19]. Defective hypothalamic appetite regulation promotes anorexia in uremic patients [20]. Moreover, poor appetite is often aggravated by dietary restrictions that are primarily aimed at reducing phosphorus (P) and potassium intake but that negatively affect food palatability. Thus, when patients are losing weight (CKD stages 3 to 5) dietary strategies are usually shifted towards preservation of caloric intake. Nonetheless, measures to prevent a deleterious effect of high caloric intake on CKD should be installed early in the progression of the disease.

Renal disease is associated with changes in mineral metabolism, that are known collectively as chronic kidney disease/metabolic bone disease (CKD-MBD), and that include secondary hyperparathyroidism, changes in parameters of mineral metabolism, bone disorders, and extraskeletal calcification. Changes in calciotropic hormones occur early in the course of CKD. Secretion of fibroblast growth factor 23 (FGF23) and parathyroid hormone (PTH) are increased to prevent accumulation of P and hypocalcaemia. The decline in effective renal mass results in reduction in calcitriol production and therefore circulating calcitriol concentrations are low in CKD [21]. When deterioration of renal function progresses, the kidneys are not able to handle a normal P load, even with elevated FGF23 and PTH, and hyperphosphatemia ensues. Elevated concentration of extracellular P is a major factor in the development of VC [22]. In addition, changes in mineral metabolism are often accompanied by bone disease [23]. Emerging data indicate that both excessive

caloric intake and reduced caloric intake may promote bone disorders [24–27], although their influence on CKD-MBD has not been sufficiently explored [28].

Accumulating evidence demonstrates an inter-relationship between energy metabolism and mineral metabolism [29–31]. Thus, in addition to the factors that have been classically considered as target for the control of CKD-MBD (such as calcium (Ca), P, and PTH), it may also be necessary to consider integrating adjustment of caloric intake for a more comprehensive control of mineral disorders in the CKD-MBD population.

The aim of this paper is to review current knowledge about how caloric intake influences mineral metabolism focussing on four aspects of major interest for the renal patient: (a) P handling, (b) FGF23 and calcitriol synthesis and secretion, (c) metabolic bone disease, and (d) VC.

2. Caloric Intake and P Handling

Decreased renal function results in impaired P handling leading to P retention and eventually to increased plasma P concentrations with secondary hyperparathyroidism [32]. Elevated P load, as reflected by high urinary P, is not only an outcome of poor renal function but also promotes the progression of kidney disease [33]. Thus, control of P intake is paramount in the renal patient, especially in the more advanced stages (CKD stages 4 and 5) of the disease.

P intake is related to the caloric content of food in several ways. On the one hand, high caloric intake is usually related to frequent consumption of energy-dense foods (e.g., fast food) that are typically rich in P, not only because of their intrinsic P content but also because P is widely used as a food additive. It is important to note that the inorganic P added to processed foods is more readily absorbed than the organic P naturally contained in foodstuffs [34]. Information about the actual P content of food is scant and fast food is likely to represent a hidden source of dietary P intake [35]. Additionally, a high fat content in the diet has been reported to increase P digestibility [36,37], further aggravating P load. The influence of dietary fat on intestinal P absorption seems to be secondary to the formation of Ca soaps in the intestinal lumen. Trapping of Ca in Ca soaps decreases the generation of insoluble Ca-P complexes, thus allowing more P ions to be free and able to be absorbed [36]. Diets rich in fat may also enhance paracellular transport of P by increasing intestinal permeability and they have been reported to upregulate P transporters NaPi2b and Pit1 in the small intestine [37] (Figure 1). The impact of intestinal absorption of P on serum P levels is critical at the time CKD has progressed to stages 4–5 when the kidney filtration of P is very limited and the ability to excrete P in the urine is markedly impaired despite the phosphaturic stimulus of FGF23 and PTH. Data obtained in experimental animals indicate that high caloric intake due to increased fat in the diet would contribute to P retention in individuals with reduced renal function. It has been shown that feeding high-fat diet leads to P retention when either renal function is decreased or when the P content of the diet is increased. Moreover, a tendency to increased plasma P concentration was identified both in rats with normal and decreased renal function after high-fat feeding [31].

The impact of CR on P homeostasis is largely unknown, although the scant available data indicate that decreasing caloric intake would help to reduce P load. Low calorie foods (e.g., vegetables) tend to have lower P content than energy-dense foods and P-containing additives are less commonly used in these types of food. Moreover, the mere fact of reducing food intake would also result in a decrease in total P intake independent of the P content of the foodstuffs. The reduction in caloric intake is also likely to further decrease intestinal P absorption (Figure 1). A recent study in non-obese rodents has shown that animals subjected to CR had lower plasma P concentrations than their non-calorie restricted counterparts even though the daily P intake was identical in both groups. Moreover, the calorie restricted animals showed a tendency to decreased P balance [11].

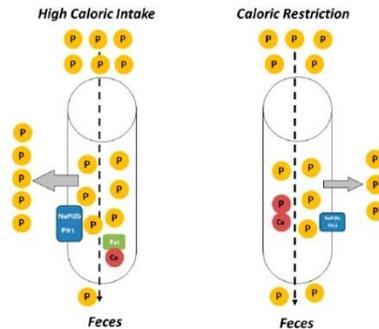


Figure 1. Caloric intake (especially fat intake) influences phosphorus (P) balance. High caloric intake (left) usually is associated with consumption of foods with higher P content than calorie-restricted foods (right). In addition, intestinal absorption of P is generally more efficient in calorie-rich/fat-rich food due to the formation of fat–calcium (Ca) soaps and to upregulation of P transporters (NaPi2b and Pit1). Thus, calorie/fat restriction tends to decrease P balance and plasma P concentrations.

Besides P, other minerals that are relevant in the CKD patient are Ca and magnesium (Mg). However, information about the influence of caloric intake on these minerals is sparse. CKD patients tend to have low Ca and Mg levels. High-fat diets might contribute to aggravate hypocalcaemia, because fat has been shown to reduce intestinal absorption of calcium [38]. Reduction in food intake may lead to decreased ingestion of Ca and Mg; thus, when implementing CR, care should be taken to ensure appropriate Ca and Mg intake. Increasing Mg intake can be beneficial in CKD, because Mg improves glycaemic control [39] and protects against VC [40,41]; however, Mg may also contribute to increase body weight and adiposity [42].

In conclusion, in addition to the benefits gained by their intrinsic lower P content and the less frequent presence of P containing additives in low-calorie foods, current evidence indicates that even for a fixed P intake CR would help to decrease P load. Thus, reducing caloric intake could be an additional strategy for controlling plasma P in CKD patients that are in earlier stages of the disease (stages 1 to 3). This nutritional strategy may help to obviate the need of implementing pharmacological therapies (like P binders) or to retard their prescription. In patients with more advanced CKD, in which P control is still more important, the use of CR would be limited by the development of weight loss/malnutrition.

3. Caloric Intake, FGF23, and Calcitriol

3.1. FGF23

FGF23 is a phosphaturic hormone secreted by osteocytes/osteoblasts that plays a major role in the regulation of mineral metabolism [43]. Interaction of FGF23 with its receptor, FGFR1c, and its co-receptor, α -klotho, increases phosphaturia by inducing internalization of the sodium-dependent P transporters (NaPi2a and NaPi2c) [44]. Synthesis and secretion of FGF23 is regulated mainly by dietary P and increased P balance is thought to be the main stimulus for FGF23 secretion [45]. In addition, FGF23 production is under hormonal control by calcitriol, which increases FGF23 synthesis [46]. Moreover, PTH [47], inflammation [48], and iron deficiency [49] have also been reported to influence FGF23.

Epidemiological studies have suggested that FGF23 might be regulated by caloric intake. FGF23 has been shown to be elevated in obese people [50] and increased caloric intake has been identified as a potential predictor of plasma FGF23 concentrations [51]. Experimental work has shown that feeding hypercaloric diets to rodents results in a consistent increase in plasma and bone FGF23 [1,31]. In these animals, a decrease in renal

α -klotho expression was also observed, and thus, it was speculated that the increase in FGF23 might be secondary to the reduction in renal α -klotho. In calorie-replete animals the decrease in α -klotho would create a state of FGF23 resistance in which more FGF23 is needed to preserve phosphaturia. Further studies in non-obese rats subjected to CR have shown a reduction in circulating concentrations of FGF23, which is accompanied by an increase in renal α -klotho [11], this α -klotho abundance would require less FGF23 to maintain P homeostasis in calorie-restricted animals. Thus, regulation of renal α -klotho by caloric intake could influence FGF23 synthesis and secretion. Studies in humans also support the role of reducing caloric intake on FGF23, e.g., a decrease in circulating FGF23 concentrations has been reported in patients subjected to bariatric surgery [52].

In addition to these *in vivo* studies, factors involved in energy metabolism have been reported to directly regulate FGF23 production by bone cells *in vitro*. Increases in both insulin and AMP-activated kinase (AMPK) have been shown to decrease FGF23 synthesis [53,54]. A recent study has demonstrated that FGF23 secretion by bone cells cultured *in vitro* is directly regulated by nutrient availability in the medium. Cells cultured in medium with high glucose consistently synthesized more FGF23 than cells cultured in medium with low glucose. Moreover, energy availability seemed to override the regulatory effect of P on FGF23, because cells incubated with high P concentrations only increased FGF23 expression when cultured in medium with high glucose. It is interesting to note that treatment with drugs that mimic CR (the mTOR inhibitors rapamycin and everolimus) was also able to down-regulate FGF23 expression even in the presence of high glucose in the medium [55].

The mechanisms involved in the regulation of FGF23 by energy intake have been studied, but they are not completely understood. A study demonstrated that AMPK activation decreases FGF23 and that the effect of AMPK on FGF23 was mediated by down-regulation of the Ca channel Orai1 involving store-operated Ca entry (SOCE) [54]. Another study reported that insulin suppresses the production of FGF23 by inhibition of FOXO1 transcription factor [53]. The influence of the mTOR signalling pathway on the regulation of FGF23 by energy availability was recently explored. Two mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2, are known, but only mTORC1 is rapamycin sensitive. mTORC1, which is suppressed by energy deprivation (low ATP-to-AMP ratio), is a downstream target of AMPK [56]. Both AMPK and rapamycin have an inhibitory effect on mTOR, but the fact that rapamycin by itself is able to decrease FGF23 production focus the signalling of energy-sensing that regulates FGF23 on mTOR. It is interesting to note that a tendency to decreased FGF23 has also been reported in mice treated with rapamycin [57] lending further support to the involvement of the mTOR pathway in FGF23 production. mTORC1 signalling can also modulate SOCE and mTORC1 inhibition by rapamycin has been shown to suppress STIM1, a protein necessary for SOCE activation [58]. A decrease in STIM1 expression in osteogenic cells incubated with rapamycin and everolimus has also been reported [55]. Thus, both AMPK activation, through orai1 inhibition, and mTORC1 inhibition, through STIM1 down-regulation, can modulate SOCE activation resulting in a decrease in FGF23 production. The involvement of the mTOR pathway in energy-regulation of FGF23 production by bone cells may help to harmonize the apparent contradiction of decreased FGF23 in response to both insulin (that is associated with energy repletion) [53] and low glucose with subsequent activation of AMPK (which is activated by energy depletion) [54]. Moreover, it may provide explanation to the paradox of insulin, which inhibits AMPK [59], having the same effect on FGF23 that AMPK. Both, insulin signalling, through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/Akt) pathway, and mTOR inhibition by rapamycin (or by energy restriction) are able to inactivate FOXO1 [53,60]. Thus, it has been proposed that mTOR may be a central molecule in the regulation of FGF23 by energy availability, since it integrates two signalling pathways that are dependent on insulin and energy availability, respectively [55]. In the context of renal patients subjected to renal transplantation that are treated with mTOR inhibitors (e.g., everolimus), it would be important to study how these drugs influence FGF23.

In conclusion, two main mechanisms seem to be implicated in the regulation of FGF23 by caloric intake: indirect mechanisms, involving regulation of renal α -klotho expression, and direct mechanisms, which affect bone cell metabolism through the mTOR pathway. In addition, other factors associated with differential energy intake, such as inflammation, may also play a role in the regulation of FGF23 by the caloric content of the diet (Figure 2).

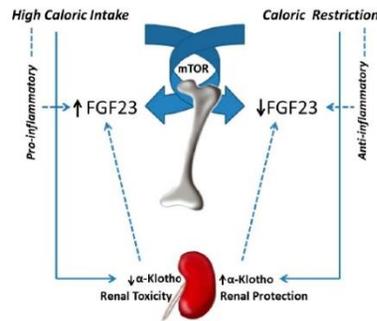


Figure 2. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) regulation by caloric intake. High caloric intake increases FGF23, while caloric restriction decreases FGF23. The mechanisms of FGF23 regulation by caloric intake include a direct effect on bone, mediated through the mTOR signalling pathway, and indirect mechanisms, mainly through renal α -klotho regulation. Other indirect mechanisms that may influence FGF23 comprise the inflammatory/anti-inflammatory action of high vs. low caloric intake.

FGF23 is an important metabolite in kidney patients not only for its ability to promote P excretion but also because increased levels of FGF23 have been reported as a risk factor of cardiovascular mortality [61]. Actually, the relationship between high FGF23 and mortality is not restricted to patients with kidney disease but has also been identified in the general population [62,63]. Thus, it is important to maintain FGF23 concentration within a physiologic range. On the other hand, some studies have demonstrated that, in the presence of significant renal disease, high levels of FGF23 may be necessary to control mineral metabolism and that an excessive reduction in FGF23 could be detrimental [64,65]. From a clinical perspective, given the fact that the increase in FGF23 concentrations is one of the earliest biochemical changes that can be identified in renal patients and that it precedes the increase in plasma P, the modulatory effect of the caloric content of the diet on FGF23 may be very relevant. In this context, the downregulation of FGF23 by reduced caloric intake opens a new window to control FGF23 without interfering with P balance (in fact, helping to maintain a favourable P balance, which would prevent further renal deterioration by decreasing the exposure of distal tubular cells to P).

3.2. Calcitriol

Vitamin D is an essential micronutrient mainly involved in bone and mineral metabolism. Vitamin D is synthesized in the skin or ingested with the diet as cholecalciferol/ergocalciferol, which subsequently is metabolized in the liver to 25(OH)-cholecalciferol/ergocalciferol (calcidiol). Calcidiol is further hydroxylized in the kidney to produce 1,25(OH)₂-cholecalciferol/ergocalciferol (calcitriol), which is the major active metabolite of vitamin D [66].

Calcitriol production by the kidneys decreases as a consequence of the progression of renal disease and patients with CKD typically have decreased plasma calcitriol concentrations [67,68]. Low vitamin D concentrations have been associated with cardiovascular disease [68], inflammation [69], endothelial dysfunction [70], and increased risk of bone

fractures [71]. In the CKD-MBD patient, decreased vitamin D levels may have a major influence in the development of skeletal disorders (including fractures) and in long-term survival [72,73]. Thus, vitamin D replacement therapy (using calcitriol or calcitriol-analogues) is often necessary in patients with CKD-MBD, although this treatment may have significant side effects (extraskelatal calcifications) [67].

The relationship between caloric intake and vitamin D levels is not well documented and most available data relate vitamin D (usually calcidiol) with body weight. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes are associated with low vitamin D levels in both humans and rodents [74–78]. Moreover, the bioavailability of vitamin D is decreased in obese individuals [79].

Experimental studies in rats have shown that feeding diets with high caloric concentration results in decreased plasma calcitriol even in animals that do not experience an increase in body weight [31]. When comparing rats fed high and normal fat diets with identical vitamin D content, plasma calcitriol was significantly lower in rats fed high fat [1,31]. The influence of dietary fat on intestinal absorption of vitamin D is somewhat controversial but diets with high fat content have been reported to increase vitamin D absorption by the intestine [80]; thus, decreased absorption of vitamin D is unlikely in rats fed high fat. Moreover, plasma calcidiol concentrations were not decreased in rats fed high fat diets [31]. Since calcidiol is the metabolite that best reflects nutritional status for vitamin D [81], the origin of the decreased plasma calcitriol cannot be attributed to decreased vitamin D intake.

The information relating vitamin D and CR is sparser. A recent study has identified an increase in calcidiol in obese adults subjected to ketogenic diet-induced weight loss [82]. In animal studies, plasma calcitriol concentrations have also been reported to increase in non-obese rats subjected to CR [55].

In summary, epidemiological data demonstrate an inverse relationship between vitamin D status (as assessed by circulating calcidiol concentrations) and body weight/glycaemic control. Although plasma calcidiol has been shown to accurately reflect vitamin D intake/skin synthesis, in the renal patient what is critical is the decrease in calcitriol production by the kidney. As discussed above, experimental studies in rats have shown that high-fat diets decrease calcitriol concentrations while CR increases calcitriol concentrations [31,55].

The most likely explanation for the regulation of calcitriol after modifying caloric intake is related to changes in FGF23. FGF23 down-regulates calcitriol production by the kidney through the inhibition of the enzyme that converts calcidiol to calcitriol: Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1 (Cyp27b1), and by stimulation of the enzyme 24-hydroxylase: Cytochrome P450 Family 24 Subfamily a Member 1 (Cyp24a1) that catabolizes calcitriol [83]. Thus, the elevated FGF23 concentrations found after feeding high calories would down-regulate Cyp27b1 and upregulate Cyp24a1 to decrease calcitriol, while the reduced FGF23 observed after caloric restriction would upregulate Cyp27b1 and down-regulate Cyp24a1 to increase calcitriol (Figure 3).

In conclusion, based on the results of animal studies, reduction in caloric intake, in addition to aid in the control of FGF23, may help to prevent the decrease in calcitriol concentrations in CKD-MBD patients. As it has been already discussed for P and FGF23, the effect of CR on calcitriol would be beneficial along the whole range of CKD stages but, for practical reasons, would be more likely applicable to patients in early stages in which decreased appetite and weight loss are not yet a concern.

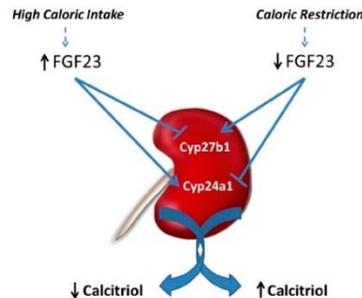


Figure 3. Calcitriol regulation by caloric intake is secondary to changes in fibroblast growth factor 23 (FGF23). The increase in FGF23 after high caloric intake down-regulates Cyp27b1 (involved in calcitriol synthesis) and upregulates Cyp24a1 (that metabolizes calcitriol) leading to decreased calcitriol concentrations. Conversely, the decrease in FGF23 after calorie restriction upregulates Cyp27b1 and down-regulates Cyp24a1 resulting in increased calcitriol concentrations.

4. Caloric Intake and Metabolic Bone Disease (MBD)

Bone abnormalities are frequent in patients with CKD and represent an important contributor to decreased quality of life because of the risk of fractures and reduced mobility [84]. Renal patients have fragile bones as a consequence of decreased bone mineral content and abnormal bone architecture. MBD encompasses alterations in bone structure characterized by abnormalities in the rate of turnover, mineralization, and bone volume [85]. Uremic toxins influence bone quality in CKD patients [86], and MBD is a more complex entity than classic osteoporosis [87]. Evidence suggests that patients with CKD have an elevated risk of bone fractures, especially in end-stage renal disease because of the high incidence of MBD [88]. The altered mechanical properties of uremic bone have been demonstrated in animal models with experimental CKD, in which elasticity of femoral bones evidenced an inverse correlation with kidney function [89]. In humans, the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines encourage monitoring bone mass in the CKD patient [84], and adjusting caloric intake may help to prevent bone loss.

Caloric intake has a profound influence on bone parameters. In general, high caloric intake results in increased bone mass, while low caloric intake decreases bone mass. The effect of caloric intake on bone is in part indirect and related to changes in body weight. The relationship between obesity and bone metabolism is complex and has not yet been fully elucidated. Obesity was traditionally thought to have protective effects on the skeleton. However, this assertion has recently been challenged with studies demonstrating that obesity is associated with a lower risk of certain fractures (e.g., ankle) but with a higher risk of suffering other fractures (e.g., wrist) [90–92]. Increased bone mineral density (BMD) in obesity is related to the combination of a higher mechanical load and hormonal activity. However, there are other genetic and environmental factors that can also influence bone mass in obese patients, such as tobacco consumption, eating habits, and physical activity [26]. Although in older populations, it seems that obesity protects bone, it is not entirely clear whether excessive fat accumulation has beneficial or detrimental effects on bone health [83]. In fact, some evidence points out that obesity may be harmful to bone [26] due to a combination of factors, including an increase in bone marrow adipogenesis at the expense of osteoblastogenesis and adipokine (leptin and adiponectin) dysregulation [93]. In addition, increased body fat has been associated with the secretion of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, C-reactive protein) that may affect bone remodelling and could be detrimental for bone health [27,93–95]. Data from experimental animal models also demonstrate negative effects of high-fat diets on bone metabolism [27]. Mice fed with a

high-fat diet had decreased trabecular bone volume and cortical bone growth [96]. High-fat diet also reduces BMD and promotes infiltration of adipocytes in the bone marrow [97]. In addition, cholesterol and its metabolites, which are usually elevated after high fat intake, are known to have effects on bone homeostasis through regulating differentiation and activation of osteoblasts and osteoclasts [98]. Thus, hypercholesterolemia may reduce bone mineral content (BMC) and trabecular structural parameters [99,100]. A recent study conducted in male Wistar rats fed with high-carbohydrate, high-fat diet to induce metabolic syndrome showed a deterioration in trabecular bone structure evidenced by a significant decrease in osteoblast and osteoid surfaces, osteoid volume, and significantly increased eroded surface. However, no changes in whole body BMC and BMD were found [101]. Other studies have reported both an increase [102] and a reduction [103] in BMC and BMD in rats fed with diets that induce metabolic syndrome. It has been proposed that differences in dietary fatty acids might reflect different effects on bone tissue [101]. Epidemiological studies in humans show inconclusive results on the relationship between metabolic syndrome and bone health status [104].

Weight loss induced by CR is associated with lower BMD [105,106] but does not seem to result in decreased bone quality assessed by trabecular bone microarchitecture and the surface-to-curve-ratio [107]. In fact, it has been suggested that the reduction in bone mass after CR may not be detrimental because the reduced bone mass is commensurate to reduced body weight [108]. Weight loss in obese and overweight patients was associated with a significant decrease in volumetric BMD, cortical thickness, and estimated strength [109]. An observational study involving 1723 older men reported that weight loss was associated with lower peripheral bone strength and total BMD [110]. Perhaps, the key to this controversy is whether weight loss is achieved only through CR or is also accompanied by physical exercise. A recent study has demonstrated that, while CR was detrimental to bone structure, when CR was combined with exercise it was effective in decreasing adiposity and mitigating bone structural deterioration associated with weight reduction in obese rats [111]. On the other hand, CR has been shown to have important effects on inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease, all known risk factors for osteoporosis and fractures [112–115] (Figure 4).

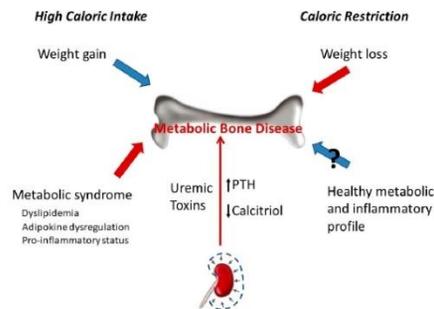


Figure 4. Chronic kidney disease leads to metabolic bone disease due to direct action of uremic toxins on bone and to associated changes in mineral metabolism (e.g., decreased calcitriol, increased parathyroid hormone (PTH)). The effect of caloric intake on bone can be differentiated in two types of mechanisms: mechanical stress associated with body weight and metabolic/inflammatory changes. The gain in body weight secondary to high caloric intake promotes bone anabolism due to increased mechanical load, and the opposite happens when body weight is lost after caloric restriction. However, the metabolic and inflammatory changes associated with high caloric intake are deleterious for bone, while the healthier metabolic and inflammatory profile observed after caloric restriction may (?) help to preserve bone mass.

Most studies on the influence of the caloric content of the diet on bone have been carried out in individuals with normal renal function. Thus, there is a need for more data on the effects of CR on the development and progression of CKD-MBD and its relationship with bone status. As previously mentioned, decreased BMD with increased osteoporosis and fracture risk may be complications of CR. In addition, in CKD patients, there is also an increased risk for osteoporosis and fracture risk associated with MBD. Bearing in mind that bone pathophysiology in CKD patients is quite different from healthy individuals, until specific studies are conducted to clarify the impact of CR on bone health in the scenario of CKD, CR should be considered with caution in CKD patients [8]. Moreover, when planning CR in a CKD patient, mostly in the earlier CKD stages, it would be necessary to assess bone status and to follow up the progression of bone parameters (e.g., BMD) in order to adjust caloric intake based on their evolution.

In conclusion, scientific evidence about the effect of caloric intake on bone in the context of CKD-MBD is insufficient to draw definitive conclusions. However, from the available data, it would seem reasonable to be careful with energy restriction, especially in advanced stages of the disease, because it could have a negative impact on the skeleton.

5. Caloric Intake and VC

VC refers to mineral deposition in the vascular system, in the form of Ca-P complexes [116]. Although VC is part of the normal aging process, some diseases such as diabetes, hypertension, and CKD can accelerate this process [116–118]. Vascular and other soft-tissue calcifications are a major problem in end-stage CKD. In CKD patients, medial artery calcification is the most prevalent form of VC and is associated with increased stiffness of the artery wall [119]. VC is one of the major contributors to cardiovascular mortality in these patients [116,118].

Different studies suggest that VC, as well as bone remodelling, is regulated by inductive and inhibitory processes. During pathological conditions, the balance between pro-calcification and anti-calcification mediators in the arteries is upset and leads to ectopic mineralization [109]. Hyperphosphatemia, due to the inability to eliminate P in uremic patients, promotes VC through several mechanisms, including increased serum CaxP product, and phenotypic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to osteochondrogenic cells [119].

Obesity and the caloric content of the diet influence uremic VC [78,120]. In experimental models of uraemia, obese Zucker rats have been shown to develop more severe VC than lean Zucker rats. Although the mechanisms are likely to be multifactorial, oxidative stress seems to play a major role in the enhancement of VC by obesity [78]. Feeding high-calorie diets has also been shown to promote VC in non-obese uremic rats both by influencing P retention, secondary to renal α -klotho and FGF23 dysregulation, and by promoting chronic inflammation and oxidative stress [31,121] (Figure 5).

CR has been reported to improve cardiovascular health and retard vascular aging. CR attenuates the production of reactive oxygen species (ROS) and age-related increases in oxidative stress [117]. CR in young rats also prevented age-related pro-inflammatory changes in the arterial wall and preserved a more youthful aortic wall phenotype [122]. However, a recent study has failed to demonstrate a beneficial effect of CR on uremic VC. Although CR resulted in metabolic changes that could theoretically be useful to protect against VC (decrease in serum concentrations of P, glucose, lipids, leptin, etc.), it did not prevent or ameliorate VC in uremic rats [11]. Interestingly, in this study, CR resulted in increased mortality in uremic rats and an excellent direct correlation was found between body weight and survival. In these experiments, the rats subjected to CR were not obese and their reduction in body weight may have made them more vulnerable to CKD. Obesity is a risk factor to develop de novo CKD but improves survival in patients with advanced CKD, in which mortality is inversely proportional to body weight and body mass index. This is known as the obesity paradox [123]. Moreover, weight loss is associated with a

poor outcome in CKD patients, so the decrease in energy stores could explain the higher mortality found in this experiment [11,19].

In summary, although high caloric intake and obesity have been shown to promote VC in experimental models, the role of CR on the induction of VC in animals is not clear, and therefore, current knowledge does not support CR as a strategy to prevent VC. Nonetheless, CR may be useful in many ways to the CKD patient, and the clinical decision about implementing CR should take into consideration the multiple facets of CR, not only related to mineral metabolism but also to progression of renal disease and mortality. The available data suggest that, in earlier stages of CKD, CR and low body weight could be beneficial, while in more advanced stages, the reduction in body weight that follows CR could increase mortality.

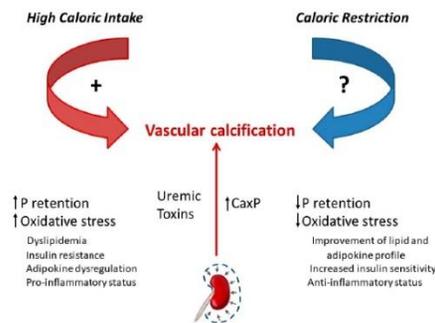


Figure 5. Chronic kidney disease leads to uremic vascular calcification due to increased CaxP product and to a variety of alterations related to uraemia. High caloric intake has been shown to potentiate (+) uremic vascular calcification by several mechanisms including P retention and increased oxidative stress. Although caloric restriction results in metabolic changes opposite to those elicited by high caloric intake, its influence on calcification is not clear (?) because experimental studies have failed to demonstrate a protective effect of caloric restriction on vascular calcification.

The interaction between energy metabolism and mineral metabolism is an exciting new field, and gaining knowledge in this area may provide a better understanding of CKD-MBD as well as opening new ways of treatment. However, the information currently available is really sparse and has been obtained mostly in animal studies; thus, more data need to be collected in humans. Some areas for future research in this field would include clarifying the relationship between energy intake and mineral metabolism at the different stages of CKD, determining the turning point at which the benefits of CR disappear and are counterbalanced by the problems associated to weight loss, examining the practicality of CR at different stages of CKD, and determining the optimal balance between caloric intake/body weight and bone health in the CKD-MBD patient.

6. Conclusions

Caloric intake has a significant impact on mineral metabolism and adjusting energy intake may help in the management of CKD-MBD. High caloric intake promotes P retention, while low caloric intake tends to decrease P balance. Moreover, current knowledge indicates that even for a fixed P intake, CR would help to decrease P load. Reduction in caloric intake may also aid in the control of FGF23 and calcitriol concentrations in CKD-MBD patients: high caloric intake increases FGF23 and decreases calcitriol, while the opposite changes are observed with low caloric intake. Scientific evidence about the effect of caloric intake on bone in the context of CKD-MBD is insufficient to draw definitive conclusions. However,

from the available data, it would seem reasonable to be careful with CR because it could have a negative impact on the skeleton. Finally, while energy-rich diets have been shown to promote VC, there is no scientific proof demonstrating a beneficial effect of CR on soft-tissue mineralization. In conclusion, (a) when planning caloric intake for a renal patient, it is important to take into consideration the associated changes in mineral metabolism, (b) reducing caloric intake could be an additional strategy for controlling mineral disorders in CKD patients, especially in the earlier stages when weight loss/malnutrition are not yet a problem.

Author Contributions: A.V., R.R., C.P., I.L., A.I.R., E.A.-T., and M.R. contributed in all stages of designing and writing this manuscript including reviewing and amending its different versions. Additionally, E.A.-T. contributed to funding for this project. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a Spanish Government Grant from the Instituto de Salud Carlos III, grant number PI17/00169 (Co-funded by FEDER, European Regional Development Fund; “A way to make Europe”/“Investing in your future”).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rios, R.; Pineda, C.; Lopez, I.; Muñoz-Castañeda, J.; Rodriguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Raya, A.I. Phosphorus restriction does not prevent the increase in fibroblast growth factor 23 elicited by high fat diet. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198481. [CrossRef]
- Boini, K.M.; Xia, M.; Abais, J.M.; Li, G.; Pitzer, A.L.; Gehr, T.W.; Zhang, Y.; Li, P.L. Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: Effects of ASC gene deletion and silencing. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 836–845. [CrossRef]
- Wickman, C.; Kramer, H. Obesity and kidney disease. Potential mechanisms. *Semin. Nephrol.* **2013**, *33*, 14–22. [CrossRef] [PubMed]
- Gai, Z.; Hiller, C.; Chin, S.H.; Hofstetter, L.; Stieger, B.; Konrad, D.; Kullak-Ublick, G.A. Uninephrectomy augments the effects of high fat diet induced obesity on gene expression in mouse kidney. *Biochem. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1870–1878. [CrossRef] [PubMed]
- Chagnac, A.; Weinstein, T.; Korzets, A.; Ramadan, E.; Hirsch, J.; Gafer, U. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2000**, *278*, F817–F822. [CrossRef]
- Chen, H.M.; Liu, Z.H.; Zeng, C.H.; Li, S.J.; Wang, Q.W.; Li, L.S. Podocyte lesions in patients with obesity-related glomerulopathy. *Am. J. Kidney Dis.* **2006**, *48*, 772–779. [CrossRef] [PubMed]
- Anders, H.J.; Huber, T.B.; Isermann, B.; Schiffer, M. CKD in diabetes: Diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2018**, *14*, 361–377. [CrossRef] [PubMed]
- Afsar, B.; Afsar, R.E.; Copur, S.; Sag, A.A.; Ortiz, A.; Kanbay, M. The effect of caloric restriction on development and progression of chronic kidney disease: Review of the current evidence. *Br. J. Nutr.* **2020**, *14*, 1–42. [CrossRef] [PubMed]
- Pugh, T.D.; Klopp, R.G.; Weindruch, R. Controlling caloric consumption: Protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiol. Aging* **1999**, *20*, 157–165. [CrossRef]
- Koshy, A.A.; Bobe, A.M.; Brady, M.J. Potential mechanisms by which bariatric surgery improves systemic metabolism. *Transl. Res.* **2013**, *61*, 63–72. [CrossRef]
- Vidal, A.; Rios, R.; Pineda, C.; Lopez, I.; Rodriguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Raya, A.I. Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2020**, *318*, F1188–F1198. [CrossRef] [PubMed]
- Ning, Y.C.; Cai, G.Y.; Zhuo, L.; Gao, J.J.; Dong, D.; Cui, S.; Feng, Z.; Shi, S.Z.; Bai, X.Y.; Sun, X.F.; et al. Short-term calorie restriction protects against renal senescence of aged rats by increasing autophagic activity and reducing oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* **2013**, *134*, 570–579. [CrossRef] [PubMed]
- Singh, G.; Krishan, P. Dietary restriction regimens for fighting kidney disease: Insights from rodent studies. *Exp. Gerontol.* **2019**, *128*, 110738. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, S.Y.; Cai, G.Y.; Chen, X.M. Energy restriction in renal protection. *Br. J. Nutr.* **2018**, *120*, 1149–1158. [CrossRef]
- Madeo, F.; Carmona-Gutierrez, D.; Hofer, S.J.; Kroemer, G. Caloric restriction mimetics against age-associated disease: Targets, mechanisms, and therapeutic potential. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 592–610. [CrossRef]
- Malin, S.K.; Navaneethan, S.D.; Fealy, C.E.; Scelsi, A.; Huang, H.; Rocco, M.; Kirwan, J.P. Exercise plus caloric restriction lowers soluble RAGE in adults with chronic kidney disease. *Obes. Sci. Pract.* **2020**, *6*, 307–312. [CrossRef]
- Xu, X.M.; Cai, G.Y.; Bu, R.; Wang, W.J.; Bai, X.Y.; Sun, X.F.; Chen, X.M. Beneficial effects of caloric restriction on chronic kidney disease in rodent models: A meta-analysis and systematic review. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144442. [CrossRef]
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work Group. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.* **2017**, *7*, 1–59. [CrossRef]

19. Ku, E.; Kopple, J.D.; Johansen, K.L.; McCulloch, C.E.; Go, A.S.; Xie, D.; Lin, F.; Hamm, L.L.; He, J.; Kusek, J.W.; et al. Longitudinal weight change during CKD progression and its association with subsequent mortality. *Am. J. Kidney Dis.* **2018**, *71*, 657–665. [\[CrossRef\]](#)
20. Cheung, W.; Yu, P.X.; Little, B.M.; Cone, R.D.; Marks, D.L.; Mak, R.H. Role of leptin and melanocortin signaling in uremia-associated cachexia. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1659–1665. [\[CrossRef\]](#)
21. Rodríguez, M.; López, I.; Muñoz, J.; Aguilera-Tejero, E.; Almaden, Y. FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrología* **2012**, *32*, 275–278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Villa-Belosta, R.; Millan, A.; Sorribas, V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300*, C210–C220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Ketteler, M.; Block, G.A.; Evenepoel, P.; Fukagawa, M.; Herzog, C.A.; McCann, L.; Moe, S.M.; Shroff, R.; Tonelli, M.A.; Toussaint, N.D.; et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: What's changed and why it matters. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 26–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Cao, J.J.; Gregoire, B.R.; Gao, H. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone* **2009**, *44*, 1097–1104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ionova-Martin, S.S.; Do, S.H.; Barth, H.D.; Szadkowska, M.; Porter, A.E.; Ager, J.W., 3rd; Ager, J.W., Jr.; Alliston, T.; Vaisse, C.; Ritchie, R.O. Reduced size-independent mechanical properties of cortical bone in high-fat diet-induced obesity. *Bone* **2010**, *46*, 217–225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Shapses, S.A.; Sukumar, D. Bone metabolism in obesity and weight loss. *Annu. Rev. Nutr.* **2012**, *32*, 287–309. [\[CrossRef\]](#)
27. Savvidis, C.; Tournis, S.; Dede, A.D. Obesity and bone metabolism. *Hormones* **2018**, *17*, 205–217. [\[CrossRef\]](#)
28. Da Silva Martins, J.; Castro, J.H.; Sainz Rueda, N.A.; Dos Reis, L.M.; Jorgetti, V.; Afonso Moysés, R.M.; Caramori, J.T. Renal osteodystrophy in the obesity era: Is metabolic syndrome relevant? *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180387. [\[CrossRef\]](#)
29. Cheng, S.P.; Doherty, G.M.; Chang, Y.C.; Liu, C.L. Leptin: The link between overweight and primary hyperparathyroidism? *Med. Hypotheses* **2011**, *76*, 94–96. [\[CrossRef\]](#)
30. Migliaccio, S.; Greco, E.A.; Fornari, R.; Donini, L.M.; Lenzi, A. Is obesity in women protective against osteoporosis? *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2011**, *4*, 273–282. [\[CrossRef\]](#)
31. Raya, A.I.; Rios, R.; Pineda, C.; Rodríguez-Ortiz, M.E.; Diez, E.; Almaden, Y.; Muñoz-Castañeda, J.; Rodríguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Lopez, I. Energy-dense diets increase FGF23, lead to phosphorus retention and promote vascular calcifications in rats. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Rodríguez-Ortiz, M.E.; Rodríguez, M. Recent advances in understanding and managing secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *F1000Research* **2020**, *9*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Santamaría, R.; Díaz-Tocados, J.M.; Pendón-Ruiz de Mier, M.V.; Robles, A.; Salmerón-Rodríguez, M.D.; Ruiz, E.; Vergara, N.; Aguilera-Tejero, E.; Raya, A.; Ortega, R.; et al. Increased Phosphaturia Accelerates The Decline in Renal Function: A Search for Mechanisms. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
34. Sarathy, S.; Sullivan, C.; Leon, J.B.; Sehgal, A.R. Fast food, phosphorus-containing additives, and the renal diet. *J. Ren. Nutr.* **2008**, *18*, 466–470. [\[CrossRef\]](#)
35. Uribarri, J.; Calvo, M.S. Hidden sources of phosphorus in the typical American diet: Does it matter in nephrology? *Semin. Dial.* **2003**, *16*, 186–188. [\[CrossRef\]](#)
36. Frommelt, L.; Bielohuby, M.; Stoehr, B.J.; Menhofer, D.; Bidlingmaier, M.; Kienzle, E. Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition* **2014**, *30*, 869–875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Kawamoto, K.; Sakuma, M.; Tanaka, S.; Masuda, M.; Nakao-Muraoka, M.; Niida, Y.; Nakamatsu, Y.; Ito, M.; Taketani, Y.; Arai, H. High-fat diets provoke phosphorus absorption from the small intestine in rats. *Nutrition* **2020**, *72*, 110694. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Agnew, J.E.; Holdsworth, C.D. The effect of fat on calcium absorption from a mixed meal in normal subjects, patients with malabsorptive disease, and patients with partial gastrectomy. *Gut* **1971**, *12*, 973–977. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Toprak, O.; Kurt, H.; Sari, Y.; Sarkis, C.; Us, H. Magnesium replacement improves the metabolic profile in obese and pre-diabetic patients with mild-to-moderate chronic kidney disease: A 3 month, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Kidney Blood Press Res.* **2017**, *42*, 33–42. [\[CrossRef\]](#)
40. Díaz-Tocados, J.M.; Peralta-Ramírez, A.; Rodríguez-Ortiz, M.E.; Raya, A.I.; Lopez, I.; Pineda, C.; Herencia, C.; Montes de Oca, A.; Vergara, N.; Steppan, S.; et al. Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 1084–1099. [\[CrossRef\]](#)
41. Rodelo-Haad, C.; Pendón-Ruiz de Mier, M.V.; Díaz-Tocados, J.M.; Martín-Malo, A.; Santamaría, R.; Muñoz-Castañeda, J.R.; Rodríguez, M. The Role of Disturbed Mg Homeostasis in Chronic Kidney Disease Comorbidities. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 543099. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kurstjens, S.; van Diepen, J.A.; Overmars-Bos, C.; Alkema, W.; Bindels, R.J.M.; Ashcroft, F.M.; Tack, C.J.J.; Hoenderop, J.G.J.; de Baaij, J.H.F. Magnesium deficiency prevents high-fat-diet-induced obesity in mice. *Diabetologia* **2018**, *61*, 2030–2042. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Vervloet, M. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 109–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Shimada, T.; Hasegawa, H.; Yamazaki, Y.; Muto, T.; Hino, R.; Takeuchi, Y.; Fujita, T.; Nakahara, K.; Fukumoto, S.; Yamashita, T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* **2004**, *19*, 429–435. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Ferrari, S.L.; Bonjour, J.P.; Rizzoli, R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 1519–1524. [[CrossRef](#)]
46. Masuyama, R.; Stockmans, I.; Torrekens, S.; Van Looveren, R.; Maes, C.; Carmeliet, P.; Bouillon, R.; Carmeliet, G. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 3150–3159. [[CrossRef](#)]
47. López, I.; Rodríguez-Ortiz, M.E.; Almadén, Y.; Guerrero, E.; de Oca, A.M.; Pineda, C.; Shalhoub, V.; Rodríguez, M.; Aguilera-Tejero, E. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.* **2011**, *80*, 475–482. [[CrossRef](#)]
48. David, V.; Martin, A.; Isakova, T.; Spaulding, C.; Qi, L.; Ramirez, V.; Zumbrennen-Bullough, K.B.; Sun, C.C.; Lin, H.Y.; Babitt, J.L.; et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* **2016**, *89*, 135–146. [[CrossRef](#)]
49. Bożentowicz-Wikarek, M.; Kocelak, P.; Owczarek, A.; Olszanecka-Glinianowicz, M.; Mossakowska, M.; Skalska, A.; Więcek, A.; Chudek, J. Plasma fibroblast growth factor 23 concentration and iron status. Does the relationship exist in the elderly population? *Clin. Biochem.* **2015**, *48*, 431–436. [[CrossRef](#)]
50. Marsell, R.; Mirza, M.A.; Mallmin, H.; Karlsson, M.; Mellström, D.; Orwoll, E.; Ohlsson, C.; Jonsson, K.B.; Ljunggren, O.; Larsson, T.E. Relation between fibroblast growth factor-23, body weight and bone mineral density in elderly men. *Osteoporos. Int.* **2009**, *20*, 1167–1173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. di Giuseppe, R.; Kühn, T.; Hirche, F.; Buijsse, B.; Dierkes, J.; Fritsche, A.; Kaaks, R.; Boeing, H.; Stangl, G.I.; Weikert, C. Potential Predictors of Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations: Cross-Sectional Analysis in the EPIC-Germany Study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Billington, E.O.; Murphy, R.; Gamble, G.D.; Callon, K.; Davies, N.; Plank, L.D.; Booth, M.; Reid, I.R. Fibroblast growth factor 23 levels decline following sleeve gastrectomy. *Clin. Endocrinol.* **2019**, *91*, 87–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bär, L.; Feger, M.; Fajol, A.; Klotz, L.O.; Zeng, S.; Lang, F.; Hocher, B.; Föller, M. Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5804–5809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Glosse, P.; Feger, M.; Mutig, K.; Chen, H.; Hirche, F.; Hasan, A.A.; Gaballa, M.M.S.; Hocher, B.; Lang, F.; Föller, M. AMP-activated kinase is a regulator of fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* **2018**, *94*, 491–501. [[CrossRef](#)]
55. Vidal, A.; Rios, R.; Pineda, C.; Lopez, I.; Muñoz-Castañeda, J.R.; Rodríguez, M.; Aguilera-Tejero, E.; Raya, A.I. Direct regulation of fibroblast growth factor 23 by energy intake through mTOR. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10. [[CrossRef](#)]
56. Xu, J.; Ji, J.; Yan, X.H. Cross-Talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 373–381. [[CrossRef](#)]
57. Kempe, D.S.; Därmaku-Sopjani, M.; Fröhlich, H.; Sopjani, M.; Umbach, A.; Puchchakayala, G.; Capasso, A.; Weiss, E.; Stübs, M.; Föller, M.; et al. Rapamycin-induced phosphaturia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 2938–2944. [[CrossRef](#)]
58. Peng, H.; Liu, J.; Sun, Q.; Chen, R.; Wang, Y.; Duan, J.; Li, C.; Li, B.; Jing, Y.; Chen, X.; et al. mTORC1 enhancement of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ entry constrains tuberous sclerosis complex-related tumor development. *Oncogene* **2013**, *32*, 4702–4711. [[CrossRef](#)]
59. Valentine, R.J.; Coughlan, K.A.; Ruderman, N.B.; Saha, A.K. Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser⁴⁸⁵/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *562*, 62–99. [[CrossRef](#)]
60. Abdelnour-Berchtold, E.; Cerantola, Y.; Roulin, D.; Dormond-Meuwly, A.; Demartines, N.; Dormond, O. Rapamycin-mediated FOXO1 inactivation reduces the anticancer efficacy of rapamycin. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 799–804.
61. Scialla, J.J.; Xie, H.; Rahman, M.; Anderson, A.H.; Isakova, T.; Ojo, A.; Zhang, X.; Nessel, L.; Hamano, T.; Grunwald, J.E.; et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, *25*, 349–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kestenbaum, B.; Sachs, M.C.; Hoofnagle, A.N.; Siscovick, D.S.; Ix, J.H.; Robinson-Cohen, C.; Lima, J.A.; Polak, J.F.; Blondon, M.; Ruzinski, J.; et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular disease in the general population: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ. Heart Fail.* **2014**, *7*, 409–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Panwar, B.; Jenny, N.S.; Howard, V.J.; Wadley, V.G.; Muntner, P.; Kissela, B.M.; Judd, S.E.; Gutiérrez, O.M. Fibroblast growth factor 23 and risk of incident stroke in community-living adults. *Stroke* **2015**, *46*, 322–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Shalhoub, V.; Shatzen, E.M.; Ward, S.C.; Davis, J.; Stevens, J.; Bi, V.; Renshaw, L.; Hawkins, N.; Wang, W.; Chen, C.; et al. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2543–2553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Clinkenbeard, E.L.; Noonan, M.L.; Thomas, J.C.; Ni, P.; Hum, J.M.; Aref, M.; Swallow, E.A.; Moe, S.M.; Allen, M.R.; White, K.E. Increased FGF23 protects against detrimental cardio-renal consequences during elevated blood phosphate in CKD. *JCI Insight* **2019**, *4*, e123817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Zhang, R.; Naughton, D.P. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr. J.* **2010**, *9*, 65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Jean, G.; Souberbielle, J.C.; Chazot, C. Vitamin D in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients. *Nutrients* **2017**, *9*, 328. [[CrossRef](#)]
68. Kaur, G.; Singh, J.; Kumar, J. Vitamin D and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* **2019**, *34*, 2509–2522. [[CrossRef](#)]

69. Mansouri, L.; Lundwall, K.; Moshfegh, A.; Jacobson, S.H.; Lundahl, J.; Spaak, J. Vitamin D receptor activation reduces inflammatory cytokines and plasma MicroRNAs in moderate chronic kidney disease—A randomized trial. *BMC Nephrol.* **2017**, *18*, 1–7. [[CrossRef](#)]
70. Vila Cuenca, M.; Ferrantelli, E.; Meinster, E.; Pouw, S.M.; Kovačević, I.; de Menezes, R.X.; Niessen, H.W.; Beelen, R.H.J.; Hordijk, P.L.; Vervloet, M.G. Vitamin D attenuates endothelial dysfunction in uremic rats and maintains human endothelial stability. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e008776. [[CrossRef](#)]
71. van Schoor, N.M.; Visser, M.; Pluijm, S.M.; Kuchuk, N.; Smit, J.H.; Lips, P. Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. *Bone* **2008**, *42*, 260–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ambrus, C.; Almasi, C.; Berta, K.; Deak, G.; Marton, A.; Molnar, M.Z.; Nemeth, Z.; Horvath, C.; Lakatos, P.; Szathmari, M.; et al. Vitamin D insufficiency and bone fractures in patients on maintenance hemodialysis. *Int. Urol. Nephrol.* **2011**, *43*, 475–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Molina, P.; Carrero, J.J.; Bover, J.; Chauveau, P.; Mazzaferro, S.; Torres, P.U. European Renal Nutrition (ERN) and Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Working Groups of the European Renal Association-European Dialysis Transplant Association (ERA-EDTA). Vitamin D, a modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2017**, *8*, 686–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Forouhi, N.G.; Luan, J.; Cooper, A.; Boucher, B.J.; Wareham, N.J. Baseline serum 25-hydroxy vitamin D is predictive of future glycemic status and insulin resistance: The Medical Research Council Ely Prospective Study 1990–2000. *Diabetes* **2008**, *57*, 2619–2625. [[CrossRef](#)]
75. Kayaniyil, S.; Vieth, R.; Retnakaran, R.; Knight, J.A.; Qi, Y.; Gerstein, H.C.; Perkins, B.A.; Harris, S.B.; Zinman, B.; Hanley, A.J. Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2010**, *33*, 1379–1381. [[CrossRef](#)]
76. Kabadi, S.M.; Lee, B.K.; Liu, L. Joint effects of obesity and vitamin D insufficiency on insulin resistance and type 2 diabetes: Results from the NHANES 2001–2006. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 2048–2054. [[CrossRef](#)]
77. Vimalawaran, K.S.; Berry, D.J.; Lu, C.; Tikkanen, E.; Pilz, S.; Hiraki, L.T.; Cooper, J.D.; Dastani, Z.; Li, R.; Houston, D.K.; et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: Bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med.* **2013**, *10*, e1001383. [[CrossRef](#)]
78. Peralta-Ramirez, A.; Montes de Oca, A.; Raya, A.L.; Pineda, C.; López, L.; Guerrero, F.; Diez, E.; Muñoz-Castañeda, J.R.; Martínez, J.; Almaden, Y.; et al. Vitamin E protection of obesity-enhanced vascular calcification in uremic rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2014**, *306*, F422–F429. [[CrossRef](#)]
79. Wortsman, J.; Matsuoka, L.Y.; Chen, T.C.; Lu, Z.; Holick, M.F. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 690–693. [[CrossRef](#)]
80. Dawson-Hughes, B.; Harris, S.S.; Lichtenstein, A.H.; Dolnikowski, G.; Palermo, N.J.; Rasmussen, H. Dietary fat increases vitamin D-3 absorption. *J. Acad. Nutr. Diet.* **2015**, *115*, 225–230. [[CrossRef](#)]
81. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 266–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Perticone, M.; Maio, R.; Sciacqua, A.; Suraci, E.; Pinto, A.; Pujia, R.; Zito, R.; Gigliotti, S.; Sesti, G.; Perticone, F. Ketogenic Diet-Induced Weight Loss is Associated with an Increase in Vitamin D Levels in Obese Adults. *Molecules* **2019**, *24*, 2499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Hasegawa, H.; Nagano, N.; Urakawa, I.; Yamazaki, Y.; Iijima, K.; Fujita, T.; Yamashita, T.; Fukumoto, S.; Shimada, T. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 975–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.* **2009**, *113*, S1–S130. [[CrossRef](#)]
85. Moe, S.; Drüeke, T.; Cunningham, J.; Goodman, W.; Martin, K.; Olgaard, K.; Ott, S.; Sprague, S.; Lameire, N.; Eknoyan, G.; et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1945–1953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Yamamoto, S.; Fukagawa, M. Uremic toxicity and bone in CKD. *J. Nephrol.* **2017**, *30*, 623–627. [[CrossRef](#)]
87. Kazama, J.J.; Iwasaki, Y.; Fukagawa, M. Uremic osteoporosis. *Kidney Int. Suppl.* **2013**, *3*, 446–450. [[CrossRef](#)]
88. Salam, S.N.; Eastell, R.; Khwaja, A. Fragility fractures and osteoporosis in CKD: Pathophysiology and diagnostic methods. *Am. J. Kidney Dis.* **2014**, *63*, 1049–1059. [[CrossRef](#)]
89. Iwasaki, Y.; Kazama, J.J.; Yamato, H.; Fukagawa, M. Changes in chemical composition of cortical bone associated with bone fragility in rat model with chronic kidney disease. *Bone* **2011**, *48*, 1260–1267. [[CrossRef](#)]
90. Gnudi, S.; Sitta, E.; Lisi, L. Relationship of body mass index with main limb fragility fractures in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Metab.* **2009**, *27*, 479–484. [[CrossRef](#)]
91. Compston, J.E.; Watts, N.B.; Chapurlat, R.; Cooper, C.; Boonen, S.; Greenspan, S.; Pfeilschifter, J.; Silverman, S.; Diez-Pérez, A.; Lindsay, R.; et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *Am. J. Med.* **2011**, *124*, 1043–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Dimitri, P.; Bishop, N.; Walsh, J.S.; Eastell, R. Obesity is a risk factor for fracture in children but is protective against fracture in adults: A paradox. *Bone* **2012**, *50*, 457–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Cao, J.J. Effects of obesity on bone metabolism. *J. Orthop. Surg. Res.* **2011**, *6*, 30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Sheu, Y.; Cauley, J.A. The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2011**, *9*, 67–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Greco, E.A.; Lenzi, A.; Migliaccio, S. The obesity of bone. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **2015**, *6*, 273–286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Fujita, Y.; Maki, K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC Obes.* **2016**, *3*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Xu, F.; Du, Y.; Hang, S.; Chen, A.; Guo, F.; Xu, T. Adipocytes regulate the bone marrow microenvironment in a mouse model of obesity. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *8*, 823–828. [\[CrossRef\]](#)
98. Yin, W.; Li, Z.; Zhang, W. Modulation of bone and marrow niche by cholesterol. *Nutrients* **2019**, *11*, 1394. [\[CrossRef\]](#)
99. Graham, L.S.; Tintut, Y.; Parhami, F.; Kitchen, C.M.R.; Ivanov, Y.; Tetradis, S.; Effros, R.B. Bone density and hyperlipidemia: The T-lymphocyte connection. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 2460–2469. [\[CrossRef\]](#)
100. Pelton, K.; Krieder, J.; Joiner, D.; Freeman, M.R.; Goldstein, S.A.; Solomon, K.R. Hypercholesterolemia promotes an osteoporotic phenotype. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 928–936. [\[CrossRef\]](#)
101. Wong, S.K.; Chin, K.Y.; Suhaimi, F.H.; Ahmad, F.; Ima-Nirwana, S. Effects of metabolic syndrome on bone mineral density, histomorphometry and remodelling markers in male rats. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192416. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Malvi, P.; Piprode, V.; Chaube, B.; Pote, S.T.; Mittal, M.; Chattopadhyay, N.; Wani, M.R.; Bhat, M.K. High fat diet promotes achievement of peak bone mass in young rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *455*, 133–138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Demigné, C.; Bloch-Faure, M.; Picard, N.; Sabbah, H.; Besson, C.; Rémésy, C.; Geoffroy, V.; Gaston, A.T.; Nicoletti, A.; Hagege, A.; et al. Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 298–306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Wong, S.K.; Chin, K.Y.; Suhaimi, F.H.; Ahmad, F.; Ima-Nirwana, S. The relationship between metabolic syndrome and osteoporosis: A review. *Nutrients* **2016**, *8*, 347. [\[CrossRef\]](#)
105. Villareal, D.T.; Fontana, L.; Weiss, E.P.; Racette, S.B.; Steger-May, K.; Schechtman, K.B.; Klein, S.; Holloszy, J.O. Bone mineral density response to caloric restriction-induced weight loss or exercise-induced weight loss: A randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.* **2006**, *166*, 2502–2510. [\[CrossRef\]](#)
106. Villareal, D.T.; Fontana, L.; Das, S.K.; Redman, L.; Smith, S.R.; Saltzman, E.; Bales, C.; Rochon, J.; Pieper, C.; Huang, M.; et al. Effect of two-year caloric restriction on bone metabolism and bone mineral density in non-obese younger adults: A randomized clinical trial. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 40–51. [\[CrossRef\]](#)
107. Villareal, D.T.; Kotyk, J.J.; Armamento-Villareal, R.C.; Kenguva, V.; Seaman, P.; Shahar, A.; Wald, M.J.; Kleerekoper, M.; Fontana, L. Reduced bone mineral density is not associated with significantly reduced bone quality in men and women practicing long-term calorie restriction with adequate nutrition. *Aging Cell* **2011**, *10*, 96–102. [\[CrossRef\]](#)
108. Shapses, S.A.; Riedt, C.S. Bone, body weight, and weight reduction: What are the concerns? *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1453–1456. [\[CrossRef\]](#)
109. Schoell, S.L.; Weaver, A.A.; Beavers, D.P.; Lenchik, L.; Marsh, A.P.; Rejeski, W.J.; Stitzel, J.D.; Beavers, K.M. Development of subject-specific proximal femur finite element models of older adults with obesity to evaluate the effects of weight loss on bone strength. *J. Osteoporos. Phys. Act.* **2018**, *6*, 213. [\[CrossRef\]](#)
110. Ensrud, K.E.; Vo, T.N.; Burghardt, A.J.; Schousboe, J.T.; Cauley, J.A.; Taylor, B.C.; Hoffman, A.R.; Orwoll, E.S.; Lane, N.E.; Langsetmo, L.; et al. Weight loss in men in late life and bone strength and microarchitecture: A prospective study. *Osteoporos. Int.* **2018**, *29*, 1549–1558. [\[CrossRef\]](#)
111. Cao, J.J. Caloric restriction combined with exercise is effective in reducing adiposity and mitigating bone structural deterioration in obese rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2018**, *1433*, 41–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Dennison, E.M.; Syddal, H.E.; Sayer, A.A.; Craighead, S.; Phillips, D.I.W.; Cooper, C. Type 2 diabetes mellitus is associated with increased axial bone density in men and women from the Hertfordshire Cohort Study: Evidence for an indirect effect of insulin resistance? *Diabetologia* **2004**, *47*, 1963–1968. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Ding, C.; Parameswaran, V.; Udayan, R.; Burgess, J.; Jones, G. Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: A longitudinal study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 1952–1958. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Barbour, K.E.; Lui, L.Y.; Ensrud, K.E.; Hillier, T.A.; LeBlanc, E.S.; Ing, S.W.; Hochberg, M.C.; Cauley, J.A.; Study of Osteoporotic Fractures (SOF) Research Group. Inflammatory markers and risk of hip fracture in older white women: The study of osteoporotic fractures. *J. Bone Miner. Res.* **2014**, *29*, 2057–2064. [\[CrossRef\]](#)
115. Veronese, N.; Stubbs, B.; Crepaldi, G.; Solmi, M.; Cooper, C.; Harvey, N.C.W.; Reginster, J.Y.; Rizzoli, R.; Civitelli, R.; Schofield, P.; et al. Relationship between low bone mineral density and fractures with incident cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *J. Bone Miner. Res.* **2017**, *32*, 1126–1135. [\[CrossRef\]](#)
116. Lee, S.J.; Lee, I.K.; Jeon, J.H. Vascular Calcification-New Insights into Its Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2685. [\[CrossRef\]](#)
117. Weiss, E.P.; Fontana, L. Caloric restriction: Powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *301*, H1205–H1219. [\[CrossRef\]](#)
118. Wu, M.; Rementer, C.; Giachelli, C.M. Vascular calcification: An update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *93*, 365–373. [\[CrossRef\]](#)
119. Giachelli, C.M. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 890–897. [\[CrossRef\]](#)

120. Rodriguez, M.; Aguilera-Tejero, E. Energy-dense diets and mineral metabolism in the context of chronic kidney disease-metabolic bone disease (CKD-MBD). *Nutrients* **2018**, *10*, 1840. [[CrossRef](#)]
121. Rios, R.; Raya, A.I.; Pineda, C.; Rodriguez, M.; Lopez, L.; Aguilera-Tejero, E. Vitamin E protects against extraskeletal calcification in uremic rats fed high fat diets. *BMC Nephrol.* **2017**, *18*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Wang, M.; Zhang, L.; Zhu, W.; Zhang, J.; Kim, S.H.; Wang, Y.; Ni, L.; Teljohann, R.; Monticone, R.E.; McGraw, K.; et al. Calorie restriction curbs proinflammation that accompanies arterial aging, preserving a youthful phenotype. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e009112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Kalantar-Zahed, K.; Rhee, C.M.; Chou, J.; Ahmadi, S.F.; Park, J.; Chen, J.L.T.; Amin, A.N. The obesity paradox in kidney disease: How to reconcile it with obesity management. *Kidney Int Rep.* **2017**, *2*, 271–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Apéndices

OTRAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**Reseñas y actas de congresos vinculadas a la Tesis Doctoral**

Escolástico Aguilera-Tejero, **Angela Vidal**. Energy Intake in CKD-MBD. Topic review en: *Scholarly Community Encyclopedia. Subjects: Nutrition & Dietetics*. 11/01/2021. <https://encyclopedia.pub/7046>

Rafael Ríos-Varo, **Ángela Vidal**, Ana Isabel Raya, Carmen Pineda, Ignacio López, J Mariano Rodríguez-Portillo, Escolástico Aguilera-Tejero. P0919 Caloric restriction does not protect against the development of vascular calcification. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Volume 35, Issue Supplement_3, p. 1245. June 2020. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa142.P0919>

Ángela Vidal Carrascosa, Ana Isabel Raya Bermúdez, Escolástico Aguilera Tejero. Efecto de la restricción calórica sobre la expresión de FGF23 en células óseas UMR106. En: *Creando Redes Doctorales. Vol. VII: Investiga y comunica*. VII, pp. 239 - 242. 07/02/2019. ISBN 978-84-9927-239-9

Otras publicaciones en revistas científicas indexadas como co-autor

Hernández-Reyes A, Cámara-Martos F, **Vidal A**, Molina-Luque R, Moreno-Rojas R. Effects of Self-Weighing During Weight Loss Treatment: A 6-Month Randomized Controlled Trial. *Front Psychol* 2020; 11: 397. doi: 10.3389/fpsyg.2020.00397.

Hernández-Reyes A, **Vidal A**, Moreno-Ortega A, Cámara-Martos F, Moreno-Rojas R. Waist Circumference as a Preventive Tool of Atherogenic Dyslipidemia and Obesity-Associated Cardiovascular Risk in Young Adults Males: A Cross-Sectional Pilot Study. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10(12): 1033. doi: 10.3390/diagnostics10121033.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la colaboración de los siguientes servicios y entidades, y por ello agradezco:

- Al Servicio de Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, y concretamente al Servicio de Animales de Experimentación (SAEx), por permitirme disponer de sus instalaciones para el desarrollo de los experimentos en modelos animales recogidos en la presente Tesis Doctoral.
- Al Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), por ser el lugar donde he procesado las muestras y realizado los experimentos *in vitro*, a partir de los cuales he obtenido muchos de los resultados derivados de esta Tesis.
- Al departamento de Anatomía y Anatomía Patológica por prestar sus servicios en lo referente a la preparación de las muestras para estudios histológicos.

Gracias a mis directores, Escolástico y Ana. A mis compañeros (los que están, los que se fueron y los que vinieron). A mi familia, porque cada uno formáis un pedacito de mi. Por supuesto, gracias a mi pareja, Alberto, por acompañarme en lo personal y en lo profesional, por estar siempre a mi lado y motivarme de la mejor manera posible: con tu incansable sed de saber. Todos sois parte de ese proyecto con el que he crecido personal y profesionalmente. Gracias.

FINANCIACIÓN

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III (concesión número: PI17/00169), con la co-financiación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); “A way to make Europe” / “Investing in your future”.

