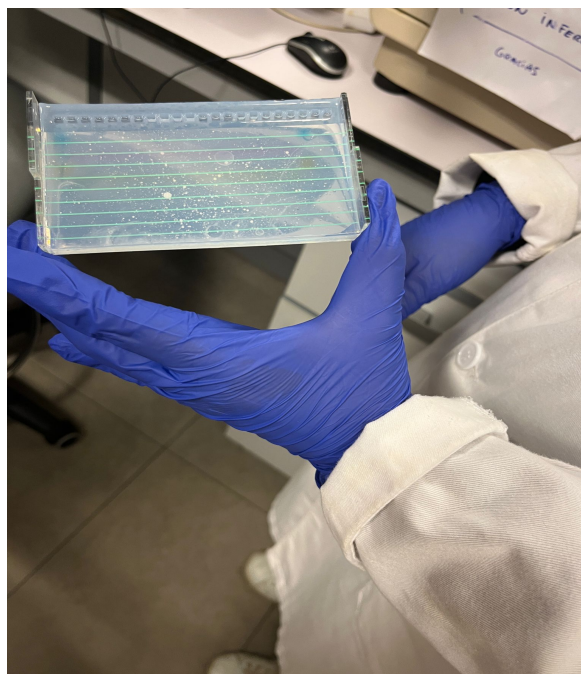

FGF23 Y RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO LIGADO AL CROMOSOMA X



ALUMNADO:

Violeta Lozano Navidad (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Ismael Cruz Roldán (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Samara Castaño Pérez (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Marta Redondo Ramírez (1º Bach, Colegio Británico (Córdoba))

PROFESORA COORDINADORA:

Dra Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba))

INVESTIGADORA:

Raquel María García Sáez (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC))

FIDiciencia



ÍNDICE

ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	4
2.- OBJETIVOS	5
3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
3.1. FGF23 (FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 23)	5
3.2. RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO LIGADO AL CROMOSOMA X (XLH)	5
3.3. REGULACIÓN DEL FÓSFORO Y EL CALCIO.....	6
3.4. IMPACTO DE LAS MUTACIONES EN PHEX	6
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1.- VARIABLES DE ESTUDIO	6
4.2.- MATERIAL EXPERIMENTAL.....	6
4.3.- DISEÑO DEL TRABAJO DE LABORATORIO	7
A) <i>Genotipado de los ratones mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa</i>	<i>8</i>
B) <i>Recolección de muestras biológicas.....</i>	<i>10</i>
C) <i>Cuantificación de fósforo y calcio en orina.....</i>	<i>10</i>
D) <i>Análisis y comparación de resultados</i>	<i>12</i>
4.4.-PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	13
5.- RESULTADOS	14
5.1.- GENOTIPADO RATONES WT Y HYP	14
5.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO Y CALCIO EN ORINA.	14
6.-DISCUSIÓN.....	16
7.-CONCLUSIONES	16
8.- AGRADECIMIENTOS	17
9.- BIBLIOGRAFÍA	17

ABSTRACT

FGF23 y raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X

ALUMNADO: Castaño-Pérez, S.¹, Cruz-Roldán, I.¹, Lozano-Navidad, V.¹, Redondo-Ramírez, M.²,

PROFESORA COORDINADORA: León-Rodríguez, E.¹

INVESTIGADORA: García-Sáez, RM.²

¹I.E.S Fidia de Córdoba

²Colegio Británico de Córdoba.

³Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Hospital Universitario Reina Sofía.
Universidad de Córdoba (Córdoba, España).

Resumen

La función principal del factor de crecimiento de fibroblastos número 23 (FGF23) en el riñón es la eliminación del fósforo por la orina. El raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X es un desorden hereditario debido a una mutación en el gen PHEX. PHEX codifica una enzima que degrada proteínas como FGF23, por lo que una mutación en PHEX causaría un incremento en los niveles de FGF23 en el plasma. Se establece la hipótesis de que un incremento de los niveles de FGF23 en ratones mutantes (HYP) con raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X provocará una mayor excreción de fósforo y calcio. El objetivo del estudio fue identificar el genotipo de los ratones en relación con el desarrollo de la enfermedad y analizar las diferencias en su metabolismo mineral, específicamente en los niveles de fósforo y calcio. Los resultados confirmaron un incremento significativo de FGF23 en los ratones HYP; sin embargo, no se observaron diferencias en la excreción urinaria de estos minerales. Esto demuestra que, a las 10 semanas, los ratones HYP a pesar de presentar un aumento en FGF23 este aún no ha generado efectos evidentes en la composición de la orina, lo que plantea la posibilidad de que otros mecanismos regulen el metabolismo mineral en estos ratones.

Palabras clave: FGF23, Raquitismo, Fósforo, Mutación, HYP.

ABSTRACT

The principal function of fibroblast growth factor number 23 (FGF23) in the kidney is the elimination of phosphate in the urine. X-linked hypophosphatemic rickets is an inherited disorder due to a mutation in the PHEX gene. PHEX encodes an enzyme that degrades proteins such as FGF23; therefore, a mutation in PHEX would cause an increase in plasma FGF23 levels. It is hypothesized that an increase in FGF23 levels in mutant (HYP) mice with X-linked hypophosphatemic rickets will lead to increased phosphorus and calcium excretion. The aim of the study was to identify the genotype of the mice in relation to the development of the disease and to analyze differences in their mineral metabolism, specifically in phosphate and calcium levels. The results confirmed a significant increase of FGF23 in HYP mice; however, no differences in urinary excretion of these minerals were observed. This demonstrates that, at 10 weeks, HYP mice despite showing an increase in FGF23 have not yet generated evident effects on urine composition, raising the possibility that other mechanisms regulate mineral metabolism in these mice.

Key words: FGF23, Rickets, Phosphate, Mutation, HYP.

1.- INTRODUCCIÓN

Contextualización y justificación

El factor de crecimiento de fibroblastos número 23 (FGF23) es una proteína de 251 aminoácidos sintetizada y secretada por las células óseas, principalmente osteoblastos. Su función principal en el organismo es la regulación del metabolismo del fósforo, promoviendo su eliminación por la orina a través del riñón. El fósforo es un elemento crítico para el mantenimiento de la integridad del esqueleto, así como para el desarrollo de múltiples procesos enzimáticos. Debido al papel clave del FGF23 en la homeostasis mineral, la alteración de los niveles de este puede conllevar a diversas patologías, incluyendo la enfermedad renal crónica y deformidades óseas.

Uno de los trastornos asociados al incremento de los niveles de FGF23 es el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH, por sus siglas en inglés), una enfermedad hereditaria causada por mutaciones con pérdida de función del gen PHEX, el cual codifica para una endopeptidasa reguladora de fosfatos cuya función es inhibir el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23). El aumento de este disminuye la reabsorción tubular de fosfato (RTP) y la actividad de alfa-1-hidroxilasa, produciendo disminución en los niveles séricos de 1,25-dihidroxivitamina D, hiperfosfaturia e hipofosfatemia (López Romero *et al.*, 2019). Además de un aumento significativo en niveles de FGF23 en plasma. Como consecuencia, los pacientes con XLH presentan hipofosfatemia debido a la excreción excesiva de fósforo por la orina, lo que afecta la mineralización ósea y conduce a raquitismo y osteomalacia, retraso en el crecimiento, malformaciones de las extremidades inferiores, dolor y disminución de la función física, de la movilidad y de la calidad de vida (Alconcher *et al.*, 2023)

Antecedentes

Estudios previos han demostrado que la regulación del FGF23 es crucial para el mantenimiento del equilibrio mineral del organismo. Investigaciones en modelos animales han permitido analizar los efectos de la alteración de FGF23 en distintas enfermedades óseas y renales. De hecho, en estudios del fenotipo de los ratones nulos para el FGF23 han observado que estos ratones presentan alteraciones significativas en la homeostasis del fósforo y la vitamina D, lo que confirma el papel central de esta hormona en el metabolismo mineral (Alconcher *et al.*, 2023). Además, estudios con ratones Hyp, un modelo de raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH), han mostrado que la mutación en PHEX conduce a un aumento en la concentración de FGF23, lo que provoca hipofosfatemia debido a una mayor excreción renal de fósforo (Negri, 2007). No obstante, aunque estos estudios han contribuido a informar sobre el papel de FGF23 en la regulación del fósforo, aún se requieren más investigaciones que exploren específicamente la relación entre el incremento de FGF23 y la excreción de fósforo y calcio en modelos de ratones con mutaciones en PHEX, para poder comprender mejor los mecanismos que causan esta enfermedad.

Hipótesis de trabajo

Se plantea la hipótesis de que un incremento de los niveles de FGF23 en ratones mutantes con raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, provocará mayores niveles de fósforo

y calcio en la orina debido a cambios en la regulación del metabolismo mineral provocados por la mutación de PHEX.

2.- OBJETIVOS

1. Determinar si los ratones del estudio presentan o no la mutación en el gen PHEX, utilizando técnicas de PCR, para entender su relación con el desarrollo del raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X.
2. Comparar la eliminación de fósforo y calcio en la orina entre ratones con y sin la mutación, con el objetivo de analizar cómo afecta la alteración genética al metabolismo mineral.
3. Medir los niveles de FGF23 en los distintos grupos de ratones, para evaluar su papel en la regulación del fósforo y del calcio y su posible impacto en la enfermedad.

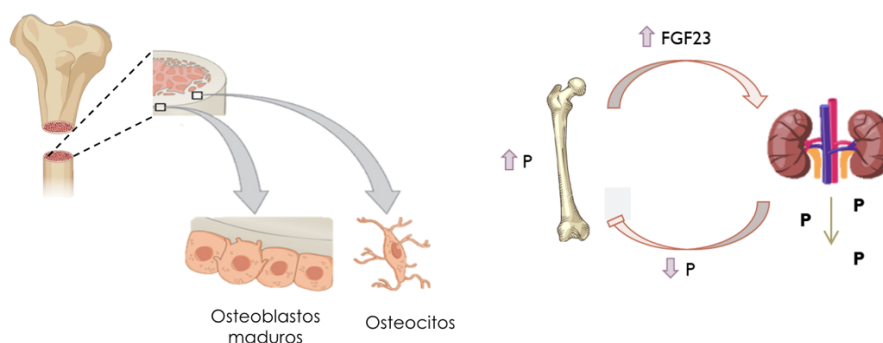
3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. FGF23 (FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 23)

Proteína de 251 aminoácidos producida principalmente por los osteoblastos en los huesos. Su función principal es regular el metabolismo del fósforo ya que promueve su excreción a través de la orina. El fósforo es un elemento esencial para el mantenimiento de la estructura ósea y está involucrado en muchos procesos metabólicos. FGF23 se une a su receptor específico en los riñones, inhibiendo la reabsorción de fósforo y regulando la producción de vitamina D, lo que a la vez afecta los niveles de calcio en el organismo.

3.2. RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO LIGADO AL CROMOSOMA X (XLH)

El raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH) es una enfermedad crónica y genética, causada por mutaciones en el gen PHEX, el cual codifica para una endopeptidasa reguladora de FGF23. En la XLH, la mutación del PHEX provoca una disfunción en la inhibición de FGF23, lo que resulta en una mayor concentración de esta proteína. Este incremento de FGF23 provoca una mayor excreción de fósforo a través de los riñones (hiperfosfaturia) y una disminución en los niveles séricos de 1,25-dihidroxivitamina D (una forma activa de la vitamina D), lo que genera hipofosfatemia (niveles bajos de fósforo en la sangre). Como consecuencia de estos cambios, la mineralización ósea se ve afectada, lo que lleva a raquitismo, malformaciones óseas, dolor y problemas en el crecimiento y la movilidad.



3.3. REGULACIÓN DEL FÓSFORO Y EL CALCIO

El FGF23 regula la eliminación de fósforo a través de los riñones (González-Casaus, 2021). Un nivel adecuado de fósforo es necesario para la formación de hueso y el metabolismo celular (Sánchez-González, 2011). Sin embargo, cuando los niveles de FGF23 se elevan, como ocurre en la XLH, se interrumpe el equilibrio de estos minerales, lo que lleva a la excreción excesiva de fósforo por los riñones. Además, el FGF23 inhibe la producción de 1 α -hidroxilasa, enzima responsable de la conversión de la vitamina D en su forma activa, la 1,25-dihidroxitamina (Calcitriol) (González-Casaus, 2021). Esto significa una menor absorción intestinal de calcio y fósforo. Aunque el FGF23 no actúa directamente sobre la excreción renal de calcio su influencia en los bajos niveles de calcitriol pueden afectar indirectamente la reabsorción de calcio en el intestino (González-Casaus, 2021).

3.4. IMPACTO DE LAS MUTACIONES EN PHEX

Las mutaciones en PHEX, responsables por el incremento de FGF23, tienen un efecto directo en el metabolismo mineral. Estas mutaciones no solo alteran la regulación de FGF23, también afectan el equilibrio de calcio y fósforo. El aumento en los niveles de FGF23 está relacionado con una mayor excreción de fósforo por la orina, lo que provoca una disminución en los niveles de fósforo en sangre. Además, esto tiene efectos en la mineralización ósea, afectando el crecimiento óseo y la integridad del sistema esquelético.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- VARIABLES DE ESTUDIO

Este proyecto de investigación se basa en el análisis de dos tipos de variables:


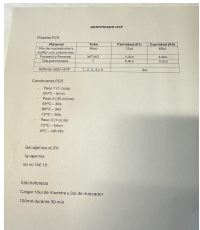
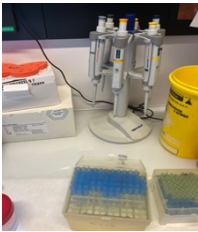
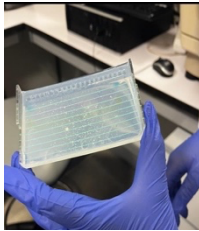



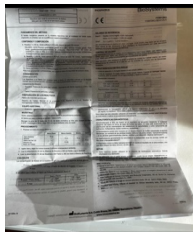

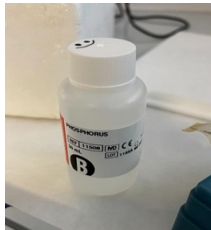

- Variable independiente: La presencia o ausencia de la mutación en el gen PHEX, la cual determina si los ratones presentan o no raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X.
- Variable dependiente: La concentración (mg/dl/24h) de fósforo y calcio en la orina de los ratones, ya que esta refleja el impacto de la mutación en el metabolismo mineral.

4.2.- MATERIAL EXPERIMENTAL

Para la realización del estudio, se ha empleado material biológico y diversos instrumentos de laboratorio, descritos a continuación:

Material biológico: Se han utilizado ratones de 10 semanas con y sin la mutación en PHEX, procedentes de una colonia mantenida en condiciones controladas.

Instrumentos de laboratorio:

<p>Primers: Fragmentos de ADN usados en PCR para detectar la mutación en PHEX.</p> 	<p>Kit genotipado: Permite extraer y amplificar ADN para identificar el genotipo.</p> 	<p>Micropipetas y puntas: Facilitan la manipulación precisa de líquidos.</p> 	<p>Gel de agarosa: Medio para separar fragmentos de ADN en electroforesis.</p> 	<p>Bio rad gel doc: Captura y analiza imágenes de geles.</p> 
<p>Sistema de electroforesis: Separa ADN para identificar mutaciones.</p> 	<p>Espectrofotómetro: Cuantifica fósforo y calcio en orina.</p> 	<p>Kit de medición de fósforo y calcio: Detecta la concentración de estos minerales.</p> 	<p>Calcio: Mineral esencial analizado en orina para evaluar su excreción.</p> 	<p>Fósforo: Nutriente cuya concentración refleja el metabolismo mineral.</p> 
<p>Termociclador: instrumento para realizar PCRs</p> 				

4.3.- DISEÑO DEL TRABAJO DE LABORATORIO

El diseño experimental se ha estructurado en las siguientes fases:

- A. Genotipado de los ratones mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa** con el fin de determinar la presencia de la mutación en PHEX.
- B. Recolección de muestras de orina en jaulas metabólicas**, seguida del análisis de los niveles de fósforo y calcio.
- C. Comparación de los datos obtenidos entre los grupos experimentales**, evaluando las diferencias en el metabolismo mineral mediante análisis estadísticos.

A) GENOTIPADO DE LOS RATONES MEDIANTE PCR Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

En primer lugar, se determinó la presencia o ausencia de la mutación en PHEX mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Para ello, se extrajo ADN a partir de muestras de tejido, las cuales fueron procesadas mediante el método Hot-Shot. Este procedimiento permitió la lisis celular y la liberación del material genético, que posteriormente fue amplificado con primers específicos dirigidos a las regiones del gen PHEX.

La colonia de los ratones se encontraba en el SAEX en el campus de Rabanales de la UCO. Los ratones normalmente se genotipaban en el destete (a los 21 días de edad), cuando ya eran lo suficientemente grandes y no dependían de los padres. En el caso de esta colonia, los ratones HYP eran muy pequeños, por lo que se destetaban a las 5 semanas y se les tomaba una muestra de tejido de manera indolora para el animal. Las muestras se procesaban de la siguiente manera, siempre cambiando la punta entre tubos diferentes para evitar la contaminación:

1. Se tomaba un tubo de PCR por ratón y se añadía la muestra de tejido.
2. A cada muestra se le añadían 65 µl de Buffer Hot-Shot.
3. Se calentaba a 99 °C durante 75 minutos. [Este proceso permitía que el tejido se rompiera gracias al Buffer y a la alta temperatura, facilitando la liberación del ADN presente en las células del tejido.]
4. Se dejaba atemperar y se añadían 65 µl de Buffer de neutralización. [Aquí se detenía el proceso de rotura y degradación del tejido, evitando que se dañara el ADN extraído.]
5. La muestra quedaba lista para su genotipado.

	Composición Buffer
Buffer Hot-Shot	<ul style="list-style-type: none">• 20 µl EDTA a 0.5M• 100 µl NaOH a 5M• Hasta 50 ml de H₂O destilada.
Buffer Neutralización	<ul style="list-style-type: none">• 2 ml Tris-HCl pH 7,4 a 1M• Hasta 45 ml de H₂O destilada.

Genotipado HYP en machos: Para determinar si hay o no mutación en el gen PHEX, causante de la enfermedad raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, se necesita analizar mediante PCR convencional la presencia o ausencia de las fracciones 6 y 22 en los alelos del gen PHEX. La fracción 6 siempre debe estar presente como control de la técnica y de que la extracción de ADN ha sido adecuada, mientras que la 22 estará presente si es WT y no lo estará si es HYP.

PCR convencional: La PCR convencional consiste principalmente en obtener muchas copias de una fracción del ADN que nos interese, de tal forma que sea visible posteriormente en un gel de agarosa. Esto se consigue sometiendo a la muestra de ADN a muchos cambios de temperatura de manera continua.

Previo a este proceso, se debían preparar las muestras de la siguiente manera:

Se cogieron los tubos de PCR necesarios en función del número de ratones a evaluar y la fracción o gen a analizar de cada ratón. En este caso, cada uno evaluó el genotipo de 2 ratones diferentes y, de cada ratón, las fracciones 6 y 22, para determinar si eran WT o HYP.

Además, se añadió un tubo por fracción/gen en el que, en vez de ADN, se puso agua como control negativo para asegurar que la técnica funcionaba correctamente y no había contaminación.

Material Fracción 6	Cantidad por tubo
Buffer con nucleótidos	15ul
Forward 5' ACT GCT CCA CAT CTT GAG GC 3'	1,2ul
Reverse 5' CAG GGG GAC ACA TAC AAAC GGA 3'	1,2ul
Taq polimerasa	0,8ul
ADN de ratón o H2O destilada	3ul

Material Fracción 22	Cantidad por tubo
Buffer con nucleótidos	15ul
Forward 5' TCC AAA GCT GTC TGA AAC TCC 3'	1,2ul
Reverse 5' TAG CTC TGA ACC TCA GTT TCT TCA 3'	1,2ul
Taq polimerasa	0,8ul
ADN de ratón o H2O destilada	3ul

Ya preparado cada tubo, se colocaron en un aparato denominado **termociclador**, cuya función era ir modificando la temperatura para generar muchas copias de las fracciones **6 y 22** de cada ratón.

- Desnaturalización: Se sometió la muestra a altos niveles de temperatura, en este caso 95 °C, para que se separaran las dos cadenas del ADN.
- Alineamiento: Se redujo la temperatura a 60 °C para permitir que se unieran el Forward (F) y el Reverse (R). El Forward se unía a la cadena 3', y el Reverse a la 5' en sentido contrario. Estas eran fracciones de nucleótidos que se unían al sitio específico del ADN o a la secuencia de nucleótidos que se quería estudiar, siendo en este caso las fracciones 6 y 22. Si dicha secuencia estaba presente, se producía la elongación; si no, no ocurría.
- Elongación: Se aumentó la temperatura a 72 °C, donde la presencia de nucleótidos en el buffer permitió a la Taq polimerasa ir añadiendo cada nucleótido correspondiente a continuación del Forward y el Reverse, dando lugar a la secuencia de interés.

Condiciones para la PCR en el termociclador:

Paso 1 (1 ciclo): 95°C – 5 min

Paso 2 (35 ciclos)

- 95°C – 30 s
- 60°C – 30 s
- 72°C – 30 s

Paso 3 (1 ciclo) 72°C – 5 min, 4°C – infinito

Electroforesis: En segundo lugar, las muestras amplificadas han sido sometidas a electroforesis en gel de agarosa, permitiendo la visualización de los fragmentos amplificados. La interpretación de los resultados ha sido clave para la clasificación de los ratones en dos grupos experimentales: aquellos que presentan la mutación (HYP) y aquellos sin alteraciones genéticas (WT).

La máquina de electroforesis tenía una zona con carga negativa y, en el lado opuesto, una zona con carga positiva. Esta máquina proporcionaba energía, permitiendo que las muestras de ácidos nucleicos (que presentan carga negativa) migraran desde el lado negativo al positivo.

1. Se sumergió el gel en la máquina de electroforesis llena con TAE 1X, necesario para facilitar el avance de las bandas.
2. Se cargaron las muestras de la PCR, cada una en un pocillo diferente.
3. Se dejó un pocillo para el marcador de peso molecular, que serviría para verificar que la banda tuviera el tamaño correcto.
4. Se dejó correr el gel a 100 mA durante 20 minutos.
5. Transcurridos los 20 minutos, el gel se llevó a un revelador para observar la presencia o ausencia de las bandas.

Si por ratón se observaban dos bandas, el genotipo era WT. Si se observaba la ausencia de la fracción 22, el genotipo era HYP.

Gel de agarosa al 2%

- Se pesó 1 g de agarosa y se diluyó en 50 ml de TAE 1X.
- Se calentó hasta que la agarosa se disolvió por completo.
- Se añadieron 2,5 µl de Red Safe (ste reactivo teñía los ácidos nucleicos durante la electroforesis y emitía fluorescencia al revelarlo.)
- Se dejó secar en un molde para geles con 22 pocillos.

Preparación de soluciones

- TAE 10X: Se preparó con 242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de solución de EDTA 500 mM, diluyéndolos en agua destilada y ajustando el pH a 8.
- TAE 1X: Se obtuvo diluyendo TAE 10X en proporción 1:10 con agua destilada.

B) RECOLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Para evaluar la excreción urinaria de fósforo y calcio, se utilizaron jaulas metabólicas diseñadas específicamente para la recolección de orina durante un período de 24 horas. Este sistema permitió obtener muestras libres de contaminación y con volúmenes controlados, garantizando la precisión de las mediciones. Las muestras recolectadas fueron almacenadas a temperaturas adecuadas hasta su análisis, asegurando la estabilidad de los compuestos a evaluar.

C) CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO Y CALCIO EN ORINA

Los niveles de fósforo y calcio han sido analizados mediante espectrofotometría, utilizando kits específicos para cada mineral. Para ello, las muestras de orina han sido previamente

diluidas y sometidas a una reacción química que genera un cambio de color proporcional a la concentración del compuesto.

La absorbancia de cada muestra ha sido medida a longitudes de onda específicas (350 nm para fósforo y 610 nm para calcio), permitiendo su cuantificación a partir de curvas de calibración obtenidas con patrones de concentración conocida.

La orina, al ser expulsada, estaba muy concentrada y, para poder realizar las mediciones, era necesario diluirla. Según el parámetro que se iba a medir, la dilución variaba.

Teniendo esto en cuenta, se siguieron las indicaciones de cada kit, donde todas las muestras se prepararon por duplicado para asegurar la fiabilidad de los resultados.

FÓSFORO

Primero, se preparó la **recta de regresión** con una muestra de concentración conocida de fósforo, para así poder calcular posteriormente la concentración de fósforo en las muestras.

- La muestra o patrón de fósforo estaba a 5 mg/dl, por lo que se realizaron diluciones seriadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml para obtener valores de 2,5 mg/dl (1/2), 1,25 mg/dl (1/4), 0,65 mg/dl (1/8) y 0,325 mg/dl (1/16). El 0 fue el blanco con agua.
- Las muestras de orina de cada ratón se diluyeron 1/10 en H₂O destilada para medir el fósforo. Se prepararon 50 µl por muestra por si fuera necesario repetir algún valor.
- Se tomaron los tubos de espectrofotometría necesarios y se rotularon adecuadamente para evitar confusiones. Cada muestra se analizó por duplicado, añadiendo 10 µl tanto de las diluciones para la recta de regresión como de las muestras de orina.
- Una vez preparadas las diluciones, se preparó el reactivo de trabajo en la proporción de 7 ml de "A" y 3 ml de "B", obteniendo un total de 30 ml.
 - "A" = Ácido sulfúrico 0,36 mol/L y cloruro de sodio 154 mmol/L.
 - "B" = Ácido sulfúrico 0,36 mol/L, cloruro de sodio 154 mmol/L y heptamolibdato de amonio 3,5 mmol/L.
- Se añadió 1 ml de la mezcla preparada en cada tubo de espectrofotometría y se esperaron 5 minutos para permitir la reacción del fósforo con el reactivo.
- Se midió la absorbancia a 350 nm, colocando primero el blanco como valor 0 (1 ml de reactivo de trabajo + 10 µl de H₂O destilada). El ordenador cuantificó el 0 y determinó la absorbancia de las diluciones y de las muestras de orina.
- Tras obtener los valores, se calcularon las medias de los duplicados y, con las diluciones del patrón de fósforo, se construyó una recta de regresión, relacionando los valores de absorbancia con las concentraciones reales.
- Se realizó un gráfico de dispersión en Excel, con la absorbancia en el eje X y la concentración de fósforo en el eje Y.
- A partir de la ecuación de la recta de tendencia $y = mx + n$, donde "m" y "n" fueron determinados por la gráfica, se extrapolaron las concentraciones de las muestras.
- La concentración obtenida se multiplicó por 10, ya que la orina había sido previamente diluida 10 veces.

- Finalmente, para conocer la cantidad real de fósforo excretado, se multiplicó la concentración obtenida por el volumen de orina en ml, obteniendo así la cantidad real de fósforo excretado por el ratón en mg/dl/24h.

CALCIO

Se preparó la **recta de regresión** con una muestra de concentración conocida de calcio para calcular posteriormente su concentración en las muestras.

- La muestra o patrón de calcio estaba a 10 mg/dl, por lo que se realizaron diluciones seriadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml, obteniendo valores de 5 mg/dl (1/2), 2,5 mg/dl (1/4), 1,25 mg/dl (1/8) y 0,65 mg/dl (1/16). El 0 fue el blanco con agua.
- Las muestras de orina de cada ratón se diluyeron 1/2 en H₂O destilada para medir el calcio. Se prepararon 40 µl por muestra por si fuera necesario repetir algún valor.
- Se tomaron los tubos de espectrofotometría necesarios y se rotularon adecuadamente. Cada muestra se analizó por duplicado, añadiendo 10 µl tanto de las diluciones de la recta de regresión como de las muestras de orina.
- Tras preparar las diluciones, se elaboró el reactivo de trabajo en proporciones iguales de "A" y "B", obteniendo 30 ml en total.
 - "A" = Cianuro potásico 7,7 mmol/L y etanolamina 1,5 mol/L.
 - "B" = Azul de metiltimol 0,1 mmol/L, ácido clorhídrico 10 mmol/L y 8-hidroxiquinoleína 17 mmol/L.
- Se añadió 1 ml de la mezcla preparada en cada tubo de espectrofotometría y se esperaron 2 minutos para permitir la reacción del calcio con el reactivo.
- Se midió la absorbancia a 610 nm, colocando primero el blanco como valor 0 (1 ml de reactivo de trabajo + 10 µl de H₂O destilada).
- El ordenador cuantificó el 0 y determinó la absorbancia tanto de las diluciones como de las muestras de orina.
- Una vez obtenidos los valores, se calcularon las medias de los duplicados y, con las diluciones del patrón de calcio, se construyó una recta de regresión, relacionando los valores de absorbancia con las concentraciones reales.
- Se realizó un gráfico de dispersión en Excel, con la absorbancia en el eje X y la concentración de calcio en el eje Y.
- A partir de la ecuación de la recta de tendencia $y = mx + n$, se extrapolaron las concentraciones de las muestras.
- La concentración obtenida se multiplicó por 2, ya que la orina había sido previamente diluida por la mitad (1/2).
- Finalmente, para conocer la cantidad real de calcio excretado, se multiplicó la concentración obtenida por el volumen de orina en ml, obteniendo así la cantidad real de calcio excretado por el ratón en mg/dl/24h.

D) ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Una vez obtenidos los valores de fósforo y calcio, se ha realizado un análisis estadístico comparativo entre los dos grupos experimentales. Se ha empleado la prueba t de Student para determinar si existen diferencias significativas en la excreción urinaria de estos minerales entre los ratones HYP y WT.

Este enfoque ha permitido evaluar de manera precisa el impacto de la mutación en PHEX sobre el metabolismo mineral, proporcionando datos fundamentales para la comprensión del raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X.

4.4.-PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

SESIONES PRESENCIALES

La investigación fue organizada en cuatro sesiones presenciales en el IMIBIC de Córdoba, en las cuales se desarrollaron las actividades experimentales esenciales. Cada sesión estuvo enfocada en una fase específica del estudio, desde la introducción teórica hasta la presentación de los resultados obtenidos.

- **1ª Sesión (06/11/2024) (4 horas): Presentación del proyecto y fundamentos teóricos**
En esta sesión inicial, se presentó el contexto del estudio, explicando la función de FGF23 en la regulación del metabolismo del fósforo y el impacto de la mutación en PHEX en el desarrollo del raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X. Se expusieron los objetivos del proyecto y se realizó una introducción a las metodologías experimentales que se emplearían. Además, se llevó a cabo una visita al laboratorio para conocer el equipamiento y los materiales necesarios para el desarrollo del estudio.
- **2ª Sesión (03/12/2024) (4 horas): Genotipado de los ratones mediante PCR**
En esta sesión, se obtuvieron muestras de tejido de los ratones y se extrajo el ADN mediante el método Hot-Shot. Posteriormente, se realizó la amplificación de fragmentos específicos del gen PHEX mediante PCR convencional, utilizando primers diseñados para identificar la mutación. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, lo que permitió clasificar a los ratones en dos grupos: WT (sin mutación) y HYP (con mutación).
- **3ª Sesión (15/01/2025) (4 horas): Cuantificación de fósforo y calcio en orina**
Para evaluar el metabolismo mineral, los ratones fueron alojados en jaulas metabólicas durante 24 horas, permitiendo la recolección precisa de orina. Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría, utilizando kits específicos para la cuantificación de fósforo y calcio. Se registraron los valores obtenidos y se inició el análisis comparativo entre los grupos experimentales.
- **4ª Sesión (12/02/2025) (4 horas): Análisis de resultados y elaboración del póster científico.** En la última sesión, se revisaron y discutieron los resultados obtenidos en las fases anteriores, analizando las posibles diferencias entre los grupos WT y HYP. Se realizó un análisis estadístico para determinar la significancia de las diferencias observadas. Finalmente, se trabajó en la elaboración de un póster científico que resumió el proyecto, incluyendo los objetivos, la metodología, los resultados obtenidos y las conclusiones principales, con el propósito de presentarlo en el IV Congreso Científico Internacional Eurociencia Joven organizado por el proyecto de Innovación Educativa y desarrollo Curricular Fidiciencia 3.0.

SESIONES ONLINE MEDIANTE DOCUMENTOS COMPARTIDOS EN GOOGLE-DRIVE

Las sesiones en línea han permitido la colaboración en la elaboración de los documentos científicos del proyecto. Se ha trabajado en carpetas compartidas de Google Drive, siguiendo las directrices de los tutores. Se han desarrollado los siguientes materiales:

- a) Resumen/Abstract del estudio.
- b) Memoria de investigación, con la descripción detallada del trabajo realizado.
- c) Póster o panel científico, para la presentación de los resultados en el congreso.
- d) Presentación en diapositivas, destinada a la exposición oral.
- e) Texto de la defensa, con la explicación estructurada del estudio y sus conclusiones.

5.- RESULTADOS

5.1.- GENOTIPADO RATONES WT Y HYP.

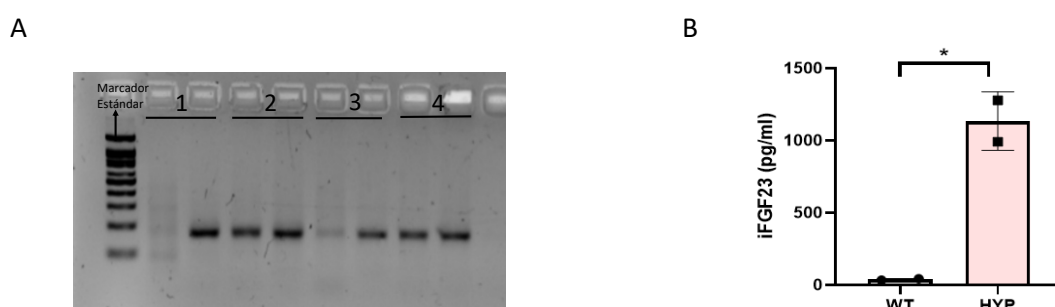
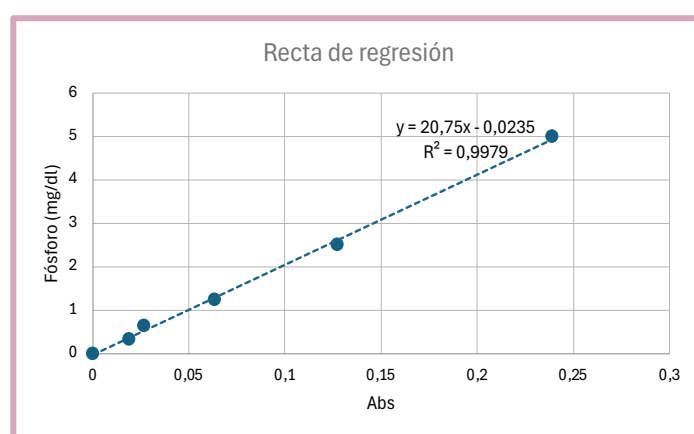


Figura 1

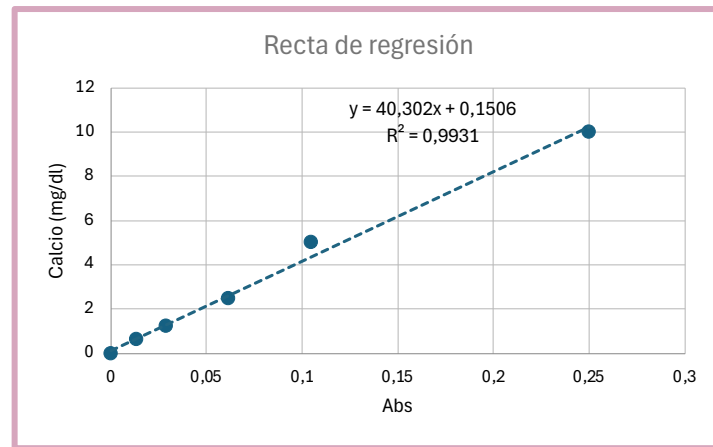
A) **Genotipado de ratones.** Los ratones 2 y 4 presentan banda para los alelos 6 y 22 del gen PHEX, indicativo de que son WT. Los ratones 1 y 3 presentan banda para el 6 y ausencia del alelo 22, indicando que son HYP.

B) **Determinación de FGF23 intacto.** Resultados previos del grupo muestran como los ratones HYP presentan un incremento significativo de FGF23 ($p < 0.05$ *) en plasma. Como se observa en la Figura 1B los ratones mutantes HYP, presentan mayor cantidad de la hormona FGF23 que mantiene el equilibrio entre el fósforo y el calcio.

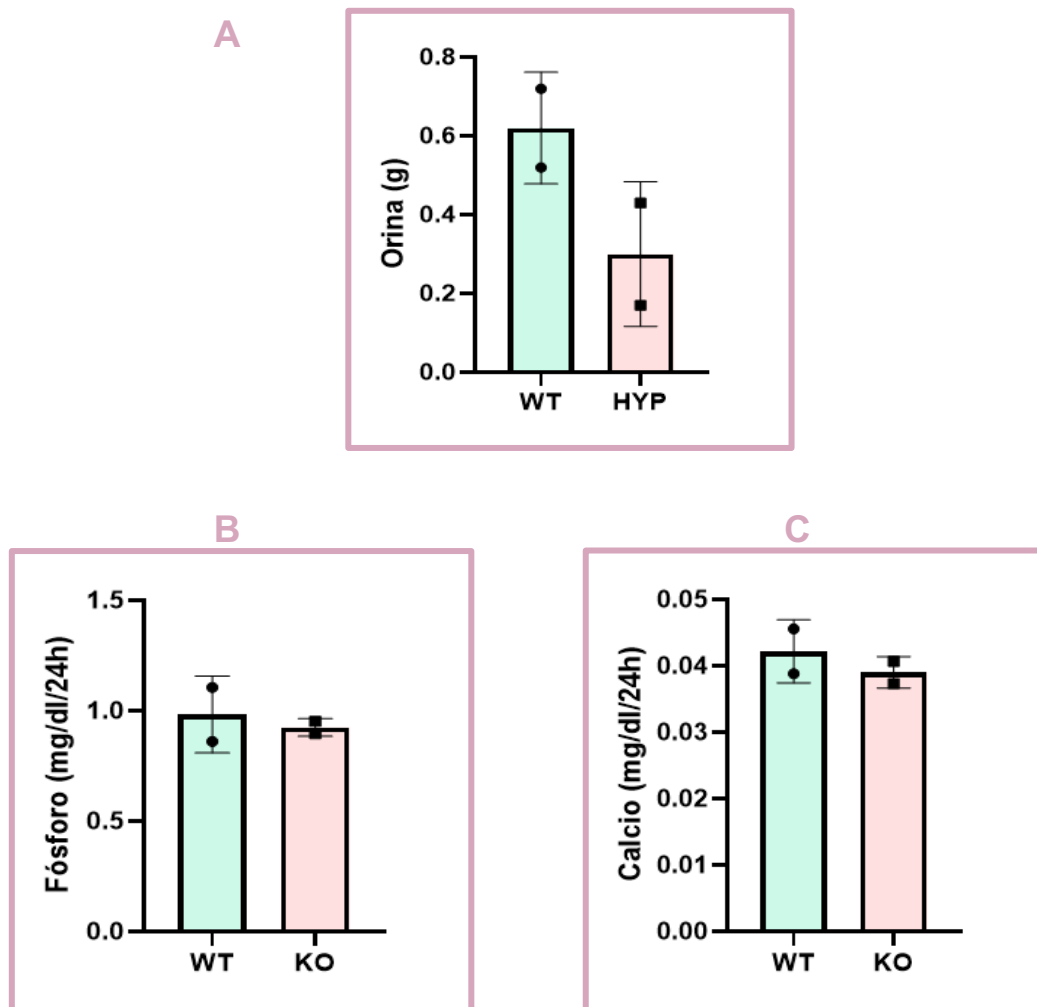
5.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO Y CALCIO EN ORINA.



Gráfica 1. Recta de regresión de fósforo. El análisis muestra un valor de $R^2 = 0,99$.



Gráfica 2. Recta de regresión de calcio. El análisis muestra un valor de $R^2 = 0,99$.



Gráfica 3. Análisis de parámetros del metabolismo mineral en orina. A) Volumen de orina. B) Fósforo a las 24h. C) Calcio a las 24h.

Estos datos muestran (Gráfica 3 B y C) como la cantidad de fósforo y calcio presenta en la orina es muy similar tanto en los ratones WT como en los HYP. Se ingresaron los datos de calcio y fósforo obtenidos tras analizarlos, y se obtuvo que la diferencia entre WT y HYP no llega a ser significativa en los ratones evaluados, pero, sí encontramos una diferencia significativa en la cantidad orina durante 24 h, los ratones con la mutación expulsan menor cantidad de orina que los ratones normales (Gráfica 3A).

5.2.- Tratamiento de los resultados

Los valores obtenidos de fósforo y calcio en orina se traspasaron al programa Graphpad Prism. Con el programa se compararon los valores de los ratones WT y HYP obtenidos para determinar si hay una diferencia significativa entre los dos grupos.

En nuestro caso, se realizó un análisis denominado prueba t de Student. Esta prueba lo que hace es comparar la media y la desviación de los valores obtenidos entre los dos grupos, WT y HYP.

6.-DISCUSIÓN

Nuestro estudio detectó un aumento significativo de FGF23 en los ratones HYP, lo cual concuerda con lo investigado en estudios previos sobre la hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH), donde las mutaciones en el gen PHEX provocan un exceso de FGF23. (Sánchez-González *et al*, 2011). Este aumento de FGF23 se asocia con una reducción en la reabsorción renal de fosfato, lo cual también ha sido reportado en estudios sobre XLH y otras patologías relacionadas con la regulación del fosfato, indicando que FGF23 es importante en la regulación del metabolismo mineral (Alconcher *et al.*, 2023).

Sin embargo, el estudio identificó que no hubo diferencias significativas en la excreción urinaria de fosfato y calcio entre los ratones HYP y los WT, lo cual parece contradecir la hipótesis de que un aumento de FGF23 debería reflejarse en una mayor excreción urinaria de fósforo. Es destacable el hecho de que el número de ratones estudiados en nuestro estudio fue pequeño, por lo que puede que no se aprecien bien algunas pequeñas diferencias que con un número mayor de ratones si se apreciarían. Otros estudios han sugerido que la excreción urinaria no siempre refleja de manera precisa el estado del fosfato en el organismo y que existen mecanismos compensatorios, como la absorción intestinal o la reabsorción renal, que podrían estar involucrados (De Lucas-Collantes, 2024), aunque no se abordaron en este estudio.

Nuestro resultado podría sugerir que, a las 10 semanas de vida, aún no se observa un impacto en la composición de la orina, y que podrían existir mecanismos que regulen el metabolismo mineral de los ratones HYP. Además, otros factores, como la absorción intestinal o la reabsorción renal, podrían estar influyendo en la regulación de los niveles de fósforo y calcio en el organismo. Por ello, sería conveniente realizar investigaciones adicionales a largo plazo para obtener una comprensión más detallada de los mecanismos involucrados en la regulación mineral en los ratones HYP.

7.-CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos han confirmado que los ratones mutantes con raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (HYP) presentan un aumento significativo de FGF23 en plasma a las 10 semanas de edad, lo que confirma la hipótesis inicial de que la mutación en el gen PHEX provoca este incremento en la hormona.
2. A pesar del aumento de FGF23, no se observó una diferencia significativa en la excreción de fósforo y calcio en orina entre los ratones HYP y WT. Esto indica que, aunque la mutación genera un aumento en los niveles de FGF23, la excreción de estos minerales no se ve afectada de manera directa en estos animales a las 10 semanas.

8.- AGRADECIMIENTOS

Le queremos agradecer a la investigadora Raquel María García Sáez por ayudarnos a realizar este proyecto y hacerlo una experiencia confortable y de total aprendizaje.

Agradecemos a la profesora Elena León Rodríguez que coordinó el proyecto, por hacernos tener un aprendizaje significativo y por guiarnos.

Agradecemos al centro de investigación IMIBIC, por abrirnos sus puertas y permitir nos realizar estos proyectos, que nos han enseñado nuevos conocimientos, y al grupo GC13 Metabolismo del calcio. Calcificación vascular del IMIBIC por acogernos.

También queremos agradecer al Proyecto de Innovación Educativa **Fidiciencia 3.0** (Junta de Andalucía) por realizar estos proyectos que nos ayudan a que afiancemos mejor los conocimientos que nos imparten. Y, por último, agradecer a las instituciones IES Fidiana y Colegio Británico por brindarnos la oportunidad de participar en este proyecto.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Sánchez-González, M. C., Salanova, L., & Ruano, P. (2011) "FGF-23: ¿solo regulador del metabolismo del fósforo o algo más?", *Reumatología Clínica*, 7 (S2), 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2011.05.009>
- Rodelo-Haad, C., Santamaria, R., Muñoz-Castañeda, J. R., Pendón-Ruiz de Mier, M. V., Martín-Malo, A., & Rodríguez, M. (2019). FGF23, Biomarker or Target?. *Toxins*, 11(3), 175. <https://doi.org/10.3390/toxins11030175>
- Hruska, K. A., Rifas, L., Cheng, S. L., Gupta, A., Halstead, L., & Avioli, L. (1995). X- linked hypophosphatemic rickets and the murine Hyp homologue. *The American journal of physiology*, 268(3 Pt 2), F357–F362. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.268.3.F357>
- López-Romero, L. C., et al. (2019). Raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X: Diagnóstico en la edad adulta y forma paucisintomática. *Reumatología Clínica*, 17(2), 116-117. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2019.07.007>
- Alconcher, L., et al. (2023). Hipofosfatemia ligada al cromosoma X: Resultado a largo plazo con diferentes modalidades de tratamiento. *Nefrología*, 44(4), 605-608. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2023.05.001>
- González-Casaus, M. L., et al. (2021). FGF23: De la nefrología de salón a la cabecera del paciente. *Nefrología*, 41(3), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.09.008>
- Sánchez-González, M. C., et al. (2011). FGF-23: ¿Solo regulador del metabolismo del fósforo o algo más? *Reumatología Clínica*, 7, 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2011.05.009>
- Negri, A.L.. (2007). El eje hueso-riñón en el control del fósforo sérico y la mineralización ósea. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*, 44(2), 86-93. Recuperado en 06 de abril de 2025, de https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30342007000200003&lng=es&tlng=es