



**Bedia Díaz G, Carrillo López N, Solache Berrocal G, Dusso A, Rodríguez I, Naves Díaz M, Cannata Andía JB, Román García P**  
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica - Red de Investigación Renal (REDinREN) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Universidad de Oviedo - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

# Hipometilación del gen de la PTH por elevado fósforo de la dieta: un posible agravante epigenético de la severidad del hiperparatiroidismo secundario en la enfermedad renal crónica

Correspondencia: Manuel Naves Díaz - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Edificio FINBA, Planta primera F1.1 (Aula 14) - Avenida de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)  
Correo electrónico: manuel@hca.es

Fecha de recepción: 18/05/2017

Fecha de aceptación: 02/07/2017

*Trabajo premiado con una beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2014.*

## Resumen

**Introducción:** En pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), la hiperfosfatemia agrava tanto la hiperplasia paratiroidea como la síntesis y secreción de PTH. La mayor hiperplasia se asocia a descensos en la expresión génica de los receptores de calcio (CaSR), vitamina D (VDR) y también de  $\alpha$ -Klotho, induciendo resistencia de la glándula paratiroides para responder tanto al tratamiento como a los aumentos de FGF23. Este estudio examinó la posible contribución epigenética del fósforo elevado en agravar el hiperparatiroidismo secundario (HPTS).

**Material y métodos:** Se comparó el grado de metilación mediante pirosecuenciación de bisulfito en secuencias ricas en CpG de los promotores en los genes del CaSR, VDR, PTH y  $\alpha$ -Klotho en ADN de glándulas paratiroides de ratas urémicas alimentadas con dieta con contenido normal y elevado en fósforo.

**Resultados:** La dieta rica en fósforo incrementó la expresión de PTH y causó una marcada reducción del grado de metilación en el promotor del gen de PTH. En cambio, las regiones promotoras de los genes de CaSR, VDR y  $\alpha$ -Klotho no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de metilación entre ambos grupos de ratas, no siendo, por tanto, éste el mecanismo determinante de la disminución de la expresión de estos genes observada en el HPTS.

**Conclusiones:** Las alteraciones epigenéticas inducidas por la dieta rica en fósforo en el HPTS, en particular la hipometilación del gen de la PTH, podrían contribuir a los aumentos que se producen en la síntesis y secreción de esta hormona. La identificación de los mecanismos implicados permitiría diseñar mejores tratamientos para el HPTS en fases tempranas de la ERC.

**Palabras clave:** metilación del DNA, PTH, enfermedad renal crónica, glándulas paratiroides, hiperfosfatemia.



# Hypomethylation of the PTH gene due to high dietary phosphorus: a possible aggravating of severe secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure

## Summary

**Introduction:** Hyperphosphataemia aggravates both parathyroid hyperplasia and PTH secretion in patients with chronic kidney disease (CKD). Hyperplasia is associated with decreases in calcium receptor expression (CaSR), vitamin D (VDR) and  $\alpha$ -Klotho, inducing resistance of the parathyroid gland to respond both to treatment and to increases in FGF23. This study examined the possible epigenetic contributions of raised phosphorus to aggravate secondary hyperparathyroidism (SHPT) in patients with (CRD).

**Material and methods:** The degree of methylation was compared by pyrosequencing of bisulfite in CpG-rich sequences of the promoters in the CaSR, VDR, PTH and  $\alpha$ -Klotho genes in parathyroid gland DNA from uremic rats fed a normal and high phosphorus diet.

**Results:** The diet rich in phosphorus increased PTH expression and caused a marked reduction in the degree of methylation in the promoter of the PTH gene. In contrast, the promoter regions of the CaSR, VDR and  $\alpha$ -Klotho genes did not show significant differences in the percentage of methylation between the two groups of rats. Thus, it was not the determining mechanism for the decrease of the expression of these genes observed in the SHPT.

**Conclusions:** The epigenetic alterations induced by the phosphorus rich diet in SHPT, particularly the PTH gene hypomethylation, could contribute to the increases that occur in the synthesis and secretion of this hormone. The identification of the mechanisms involved would allow better treatments for SHPT to be designed in the early stages of CKD.

**Key words:** DNA methylation, PTH, chronic kidney disease, parathyroid glands, hiperphosphataemia.

## Introducción

El hiperparatiroidismo secundario (HPTS) es una complicación frecuente de la enfermedad renal crónica (ERC) caracterizada por hiperplasia de las glándulas paratiroides y aumentos en la síntesis y secreción de hormona paratiroidea (PTH). Las elevaciones de los niveles séricos de PTH causan alteraciones en el remodelado óseo y en la homeostasis fosfo-cálcica que incrementan tanto la propensión a fracturas como a calcificación vascular, procesos que agravan la morbi-mortalidad del enfermo renal<sup>1</sup>.

En el curso de la ERC, los estímulos más importantes para el desarrollo de HPTS son los descensos en los niveles circulantes de calcio, de vitamina D nutricional y de su forma hormonal, el calcitriol, como así también las elevaciones en el fósforo sérico, aún cuando se alcancen niveles inferiores al límite superior del rango normal<sup>2</sup>.

Es importante destacar que el grado de hiperplasia paratiroidea en la ERC se asocia también con una disminución proporcional de la expresión paratiroidea de los receptores de calcio y vitamina D (CaSR y VDR)<sup>3</sup>. Estas reducciones atenúan la capacidad de la glándula de suprimir tanto las tasas de proliferación celular como las de secreción de PTH en respuesta a los cambios en los niveles circulantes de calcio y vitamina D, inducidos por el tratamiento dirigido a corregir la hipocalcemia o la deficiencia de vitamina D. Un agravante adicional a la disfunción paratiroidea de la ERC es la disminución temprana de la molécula anti-envejecimiento,  $\alpha$ -Klotho, en la membrana de las células paratiroides<sup>4</sup>. Esta reducción conduce a una ineficaz supresión de la síntesis y secreción de PTH por la hor-

mona fosfatúrica FGF23, ya que  $\alpha$ -Klotho actúa como co-receptor obligado para las señales celulares del complejo de FGF23 con su receptor específico FGFR<sup>5,6</sup>.

Hoy sabemos que, además de los defectos en el control transcripcional tanto del gen de la PTH como del CaSR y del  $\alpha$ -Klotho debidos a la deficiencia de calcitriol, o a la disminución de los niveles de su receptor, el VDR, en la glándula paratiroides hiperplásica<sup>3,4</sup>, podrían también contribuir a la disfunción paratiroidea del enfermo renal modificaciones epigenéticas, como la hipermetilación de los genes de CaSR, VDR o  $\alpha$ -Klotho en sus regiones promotoras. El interés en la epigenética del HPTS en la ERC surgió de la evidencia del rol crítico de la hipermetilación de genes supresores de tumores en procesos de proliferación celular exacerbada<sup>7,8</sup>, tal y como ocurre en el HPTS nodular. Esta forma de HPTS es similar en su desarrollo a un tumor benigno endocrino, con un impacto adverso muy grave tanto en la progresión del HPTS, del daño renal y vascular, como también en la supervivencia del enfermo renal por el desarrollo de resistencias al tratamiento<sup>9,10</sup>.

Por el contrario, existen evidencias del impacto significativo de aumentos leves de la metilación del gen  $\alpha$ -Klotho inducidas por el envejecimiento en el cerebro y por toxinas urémicas en el riñón, tanto en la expresión de  $\alpha$ -Klotho en la membrana celular como también en sus funciones anti-oxidantes y anti-inflamatorias<sup>11,12</sup> que no se han estudiado en la glándula paratiroides.

Otra modificación epigenética de gran interés para el control del HPTS es la hipometilación global del gen de la PTH, demostrada exclusivamente en el teji-



do paratiroideo<sup>13</sup>. Aun cuando el grado de hipometilación global del gen de PTH es similar en glándulas con función normal y glándulas hiperfuncionantes<sup>13</sup>, este hallazgo sugiere que un proceso de metilación diferencial de este gen en sus regiones promotoras podría contribuir a la severidad del HPTS.

Debido a que la retención de fósforo por el riñón enfermo es el mayor factor de riesgo para exacerbar directamente el grado de hiperplasia paratiroidea, de estabilización del ARN mensajero de PTH, de la secreción de PTH a la circulación y de los aumentos de FGF23 en la ERC, por mecanismos no transcripcionales, el objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo murino de ERC, la posible contribución de alteraciones epigenéticas inducidas por elevaciones en el fósforo sérico a la severidad de la disfunción paratiroidea. Para ello, comparamos el grado de metilación de los promotores de los genes de CaSR, VDR, Klotho y PTH en ratas urémicas alimentadas con dietas con contenido en fósforo normal o elevado y su asociación con la gravedad del HPTS.

## Material y métodos

### Estudio experimental

Para el estudio se utilizaron ratas Wistar macho de 4 meses de edad procedentes del animalario de la Universidad de Oviedo, sometidas a una nefrectomía (NX) de 7/8 consistente en la eliminación de tres cuartas partes del riñón izquierdo y con resección total del riñón derecho<sup>14</sup>.

Inmediatamente después de la nefrectomía, un grupo de animales urémicos continuó con la dieta de mantenimiento para roedores que posee contenido normal (N) en fósforo (P) (0,6%; grupo NX-NP), mientras que el otro grupo de animales nefrectomizados recibió una dieta con elevado (E) contenido en fósforo (0,9%; grupo NX-EP) durante 20 semanas.

En el momento del sacrificio, realizado bajo anestesia con CO<sub>2</sub> y por exanguinación, se recogió suero para determinar marcadores generales del grado de ERC y de alteraciones en el metabolismo óseo y mineral y también las glándulas paratiroides de cada grupo experimental (14 glándulas de 7 ratas por grupo) almacenadas a -80°C hasta su utilización.

### Análisis de la metilación de los promotores de los genes a estudio mediante pirosecuenciación de bisulfito

Para la extracción del material genómico de las glándulas paratiroides de rata se utilizó el método del fenol-cloroformo. El ADN extraído de las glándulas paratiroides se trató con bisulfito sódico siguiendo las instrucciones del kit de bisulfitación EZ DNA Methylation-Gold™ Kit D5005™ (Zymo Research, Orange, EE.UU.). A continuación se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica, con cebadores biotinilados, seguida luego por el protocolo de pirosecuenciación (PyroMark QUIAGEN® Q24), consistente en desnaturar las dobles cadenas de los productos de PCR para obtener cadenas simples, una de ellas marcada con biotina. La cadena biotinilada se utilizó como molde para la unión del cebador de secuenciación. Con el programa informático Pyromark 2.0.6 se analizó el patrón de metilación de la región de los promotores de los genes de PTH, VDR, CaSR y Klotho comprendida entre el inicio de la transcripción hacia el extremo 5' utilizando las parejas de cebadores que se indican en la tabla 1.

### Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico SPSS 17.0. Para las variables cuantitativas analizadas se utilizó la t de Student. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas ante valores de p<0,05.

Tabla 1. Pareja de cebadores utilizadas en los estudios de metilación

Cebador	Secuencia	MR <sub>f</sub>	Tamaño	CpG
Klotho F1	TGGAAAGTTT <u>T</u> AGAATGGGAGAAAG			
Klotho R1	CCCTTT <u>A</u> CCTTCCAAA <u>A</u> ACTAAT	51,3	121 pb	5
Klotho SQ	GGGAAAGTAGGTGTTTTATT			
CaR FW1	AGTTTGGGAATGGT <u>T</u> TATAGTT			
CaR RV1	CTCCCTAAATCTCTCAAATCA <u>A</u> CCCTTA	52,7	169 pb	8
CaR SQ1	TAGGTGGTTTGGGGG			
PTH RW1	GGATTTGAGTTTTGGGT <u>T</u> AGTTTGAT			
PTH RV1	<u>A</u> CCCTAAATTTTCATATCA <u>A</u> CCCTTT <u>A</u> CT	52,9	360 pb	2
PTH SQ1	ATTTGAAATTTTAGAGGAGTG			
VDR FW1	AGGAATGTTAGGTAGGAGAGA			
VDR RV1	CCTT <u>A</u> AA <u>A</u> ACCCT <u>A</u> CCCTAT <u>A</u> AAAA <u>A</u> CTCT	52,6	344 pb	6
VDR SQ1	GATATTATTAAAGATTGT			

MT<sub>f</sub>: temperatura de anillamiento de la PCR; F1: cebador directo; R1: cebador inverso; SQ: cebador de secuenciación.



## Resultados

### *Datos bioquímicos*

Los datos bioquímicos de ambos grupos experimentales se presentan en la tabla 2. Como era de esperar, los animales alimentados con la dieta con elevado contenido en fósforo (NX-EP) tuvieron un mayor deterioro de la función renal medida como urea y creatinina séricas, con respecto a los valores de estos parámetros en el grupo de ratas urémicas alimentadas con la dieta con contenido de fósforo normal (NX-NP).

Si bien no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio sérico entre ambos grupos experimentales, la combinación de una menor función renal y de un elevado fósforo de la dieta condujo a aumentos marcados en los niveles circulantes de fósforo y FGF23 en el orden de 2 y 3 veces superiores a los valores de estos parámetros en los animales urémicos alimentados con fósforo normal. Consecuentemente, el grado de HPTS fue también superior en los animales urémicos con fósforo elevado en la dieta, mostrando niveles séricos 40 veces superiores de PTH.

### *Metilación de las regiones promotoras de los genes a estudio*

La figura 1 muestra los porcentajes de metilación de los sitios CpG en el ADN paratiroideo comprendido en las regiones promotoras de los genes del CaSR, VDR y Klotho. El escaso porcentaje de metilación, inferior al 5% en ambos grupos experimentales, impide toda comparación de posibles alteraciones epigenéticas diferenciales atribuibles al elevado fósforo de la dieta comparado con una ingesta de fósforo normal.

A diferencia de estos genes que disminuyen con la progresión del HPTS, la figura 2 muestra que en las dos CpGs del área estudiada del promotor del gen de la PTH se encontró que en las glándulas paratiroides de las ratas urémicas alimentadas con fósforo normal existe un porcentaje de ADN paratiroideo metilado superior al 40%. Más importante aún, para el mismo grado basal de daño renal y de duración de la uremia (20 semanas), el elevado fósforo en la dieta se asoció a una disminución significativa del 80% en la metilación de esa región del promotor de PTH. Esta disminución está en consonancia con incrementos en los niveles de PTH en el suero de estos animales 40 veces por encima de la PTH sérica de animales con el mismo grado basal de uremia alimentados con dieta con fósforo normal.

## Discusión

Este estudio demuestra por vez primera una posible asociación epigenética entre la hiperfosfatemia de la ERC y la severidad del HPTS: la hipometilación del gen de la PTH. Además, nuestros resultados corroboran los hallazgos de otros investigadores en cuanto a que los descensos en el contenido paratiroideo de CaSR y de VDR no pueden atribuirse a un proceso epigenético de silenciamiento por hipermetilación de estos genes, ambos críticos para el tratamiento efectivo del HPTS. Nuestros

hallazgos también cuestionan la contribución de la hipermetilación del promotor de  $\alpha$ -Klotho en los descensos del  $\alpha$ -Klotho de membrana que ocurre con la progresión del HPTS.

En general, la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras da lugar al silenciamiento de la transcripción de los genes. Nuestros resultados indican un grado de metilación inferior al 5% en el CaSR y el VDR, ambos reguladores decisivos tanto de la función paratiroidea normal como del desarrollo de resistencia al tratamiento. Además, el elevado fósforo de la dieta, que condujo a aumentos significativos tanto en el grado de daño renal como del HPTS de estos animales nefrectomizados, no indujo cambios significativos en el grado de metilación del CaSR o del VDR, tal y como demostraron también otros investigadores en modelos murinos<sup>15</sup>, pero tampoco utilizando medidas del grado de metilación global de estos dos genes en glándulas paratiroides humanas provenientes de sujetos normales o con grado variable de HPTS y primario, y en las que la contribución de la hiperfosfatemia no era el objetivo principal del análisis epigenético<sup>16,17</sup>.

Con respecto al grado de metilación del gen anti-envejecimiento  $\alpha$ -Klotho, su grado de metilación fue también inferior al 10%, y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de metilación de las CpGs inducidas por el elevado fósforo en la dieta, al menos en la zona del promotor estudiada en las glándulas paratiroides proveniente de ambos grupos experimentales de ratas urémicas. Estos hallazgos no son sorprendentes, ya que en las células del túbulo renal distal, que es donde el gen Klotho se expresa mayoritariamente en un riñón normal, parece existir un mecanismo que activamente protege al promotor de Klotho de la metilación de secuencias CpGs<sup>18</sup>. En otros tejidos, con baja expresión de  $\alpha$ -Klotho, como en cerebro, mama, estómago, colon, músculo esquelético o piel, también parece existir un mecanismo similar de protección de los niveles de  $\alpha$ -Klotho previniendo su metilación. Es importante destacar también que varios autores han observado que un exiguo grado de metilación parece ser suficiente para causar diferencias significativas en el grado de expresión del gen. De hecho, King y cols. han demostrado en cerebro de monos envejecidos que un pequeño incremento del 0,4% en la metilación de las islas CpG da lugar a descensos de un 20% en la expresión del gen, corroborando que el grado de metilación de secuencias CpGs pueda estar implicado en la regulación a la baja del gen Klotho asociada al envejecimiento<sup>13</sup>.

Otros autores han referido también diferencias pequeñas (del 1 al 4,5%) en el grado de metilación a nivel renal en ratones nefrectomizados<sup>13</sup>, similares a los valores de metilación paratiroides obtenidos en este estudio (del 2 al 5%). De todos modos, el elevado fósforo de la dieta no condujo a incrementos significativos en el grado de metilación de este gen en el tejido paratiroideo.

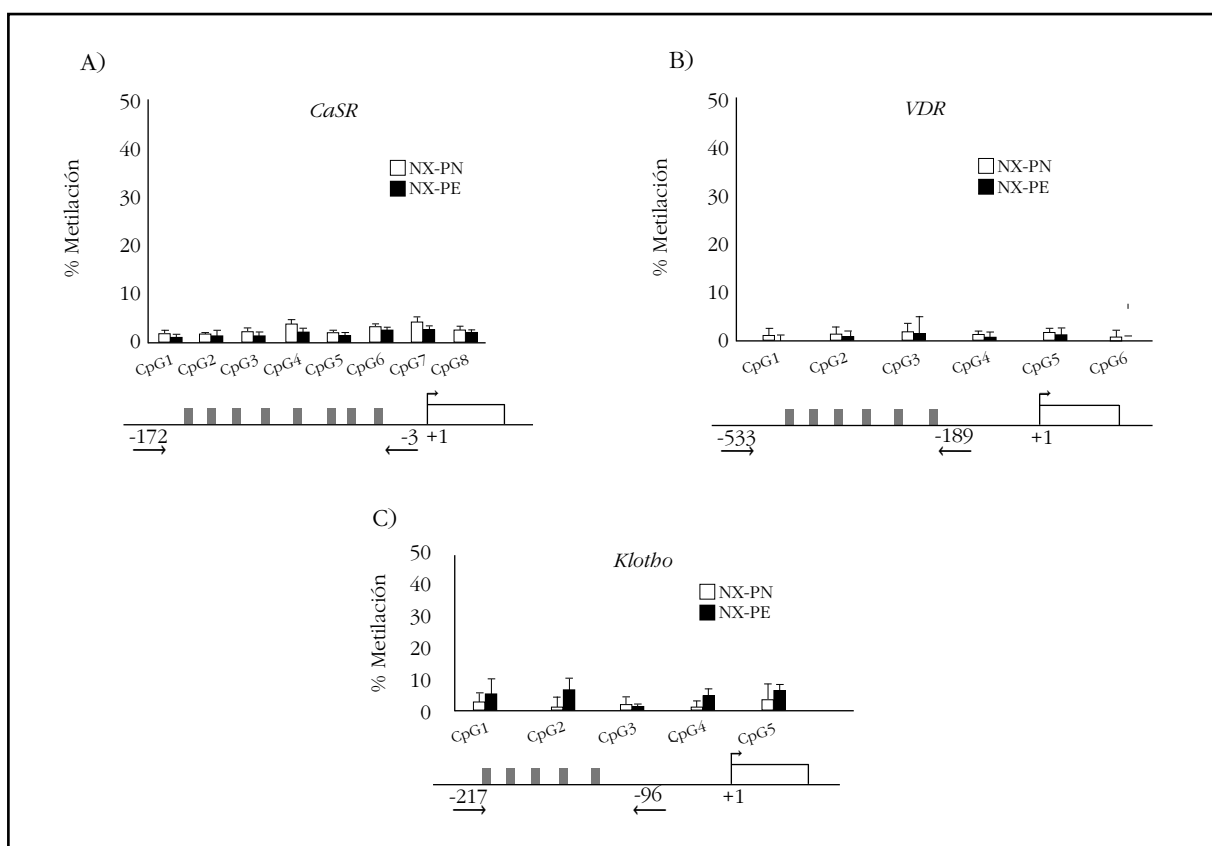
Sin duda, el hallazgo más importante de este estudio ha sido la identificación, por vez primera,



Tabla 2. Marcadores bioquímicos generales y del metabolismo mineral

	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	PTH (pg/mL)	FGF23 (pg/mL)
NX-PN	104 ± 32	1,0 ± 0,3	11,7 ± 1,1	5,8 ± 1,2	44 ± 23	378 ± 103
NX-EP	201 ± 51	2,1 ± 0,4	10,5 ± 1,1	12,8 ± 1,9	1.762 ± 493	1.029 ± 101
Valor de p	0,001	0,001	0,066	0,001	0,001	0,001

Figura 1. Grado de metilación de los sitios CpGs que preceden el inicio de la transcripción del promotor de los genes de A) *CaSR* (-172 a -3); B) *VDR* (-533 a -189) y C)  $\alpha$ -*Klotho* (-217 a -96) en glándulas paratiroides provenientes de ratas nefrectomizadas (NX) alimentadas con una dieta con contenido en fósforo normal PN (NX-PN) o elevado (NX-PE) durante 20 semanas. En la parte inferior de cada gen se representa gráficamente la zona analizada del promotor y el número de sitios CpG existentes en dicho fragmento

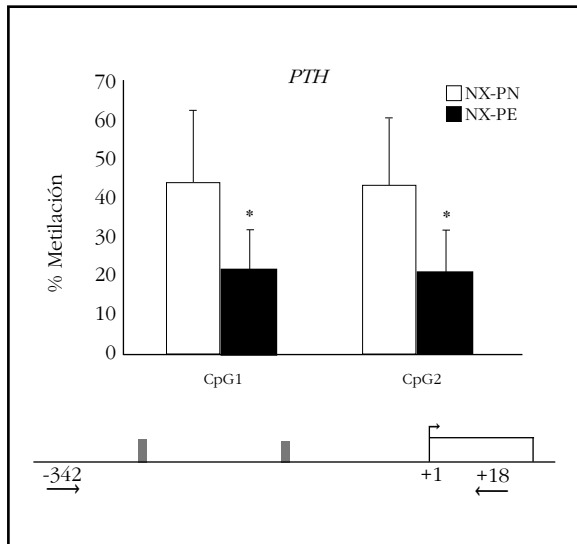


de una asociación entre la hiperfosfatemia y una disminución de la metilación del promotor de PTH en la secuencia de 350 nucleótidos que precede al inicio de la transcripción. Si bien estudios de hace casi dos décadas, utilizando técnicas que precedieron el desarrollo de la pirosecuenciación, demostraron una hipometilación global del gen de la PTH exclusiva del tejido paratiroideo, pero sin diferencias significativas entre glándulas con función normal o hiperfuncionantes, el resultado de este estudio agrega una posible modificación epigenética a los conocidos mecanismos post-transcripcionales inducidos por el elevado fósforo para aumentar marcadamente la síntesis y secreción de PTH, como son la estabilización de ARN mensajero

de PTH o la inducción de las vías de secreción<sup>19-21</sup>. Es importante destacar que la significativa hipometilación del gen de la PTH inducida por el elevado fósforo de la dieta podría contribuir en parte a las marcadas elevaciones en los niveles séricos de PTH en este modelo murino de enfermedad renal experimental avanzada. Sin embargo, no podemos descartar con estos resultados que, en realidad, sea el fósforo normal o bajo de la dieta la causa de la mayor metilación del gen de PTH en el curso de las 20 semanas de uremia estudiadas en este trabajo. De hecho, la restricción de fósforo en la dieta no afecta el contenido intraglandular de PTH, sino la capacidad de la célula paratiroidea para su secreción a la circulación<sup>22</sup>.



Figura 2. Grado de metilación en los sitios CpGs de la región -342 a +18 del promotor de PTH que precede el inicio de la transcripción en glándulas paratiroides provenientes de ratas nefrectomizadas (NX) alimentadas con una dieta con contenido en fósforo normal (NX-PN) o elevado (NX-PE) durante 20 semanas. (\* $p < 0,05$  respecto al NX-PN). En la parte inferior del gen se representa gráficamente la zona analizada del promotor y el número de sitios CpG existentes en dicho fragmento



Una limitación importante de este estudio es que no se ha estudiado el impacto de la metilación de estas dos CpGs en la transcripción del gen de PTH. Por tanto, solo podemos postular un mecanismo potencial a ser analizado con mayor profundidad en el futuro con el objeto de identificar una relación causa-efecto entre el desarrollo de hipometilación del gen de PTH y sus mecanismos moleculares de control, que permitirían la incorporación de nuevas estrategias terapéuticas para el control del HPTS en la ERC.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que el desarrollo de alteraciones epigenéticas como la significativa hipometilación del gen de la PTH, que se alcanza en estadios avanzados de disfunción de la glándula paratiroides en la enfermedad renal experimental, podrían contribuir al incremento tanto de la síntesis como la secreción de PTH. El diseño de estudios que permitan obtener evidencias concluyentes del impacto que la hipometilación tenga sobre la síntesis de PTH y que conduzcan a la identificación de los mecanismos moleculares responsables de esta modificación epigenética inducida por el elevado fósforo de la dieta, constituye el primer paso obligatorio para el diseño de estrategias terapéuticas innovadoras para el tratamiento efectivo del HPTS desde estadios tempranos de la ERC.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida por la beca FEIOMM 2014 para promover la investigación traslacional. A Agustín Fernández Fernández del

Laboratorio de Epigenética de Oviedo por sus sugerencias sobre el manuscrito. Este trabajo ha sido también parcialmente financiado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PI 09/00415), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, RETIC RedInRen del ISCIII – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009), por la Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Las manipulaciones de los animales de experimentación se han realizado según lo dispuesto en la normativa legal vigente (Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE y Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero).

## Bibliografía

1. Eckardt KU, Coresh J, Levin A. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382:158-69.
2. Silver J, Levi R. Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Clin Nephrol*. 2005;63:119-26.
3. Rodríguez M, Cañadillas S, López I, Aguilera-Tejero E, Almaden Y. Regulation of parathyroid function in chronic renal failure. *J Bone Miner Metab*. 2006;24:164-8.
4. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:2650-7.
5. Korkor AB. Reduced binding of [3H]1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N Engl J Med*. 1987;316:1573-7.
6. Ritter CS, Finch JL, Brown AJ. Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int*. 2001;60:1737-44.
7. Carmona FJ, Esteller M. Epigenomics of human colon cancer. *Mutat Res*. 2010;693:53-60.
8. Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:181-206.
9. Ng JM, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:2472-96.
10. Kim Y, Kim DH. CpG island hypermethylation as a biomarker for the early detection of lung cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:141-71.
11. King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *AGE*. 2012;34:1405-19.
12. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*. 2012;81:640-50.
13. Levine MA, Morrow PP, Kronenberg HM, Phillips III JA. Tissue and gene specific hypomethylation of the human parathyroid hormone gene: association with parathyroid hormone gene expression in parathyroid glands. *Endocrinology*. 1986;119:1618-24.



14. Naves Díaz M, Carrillo-López N, Rodríguez-Rodríguez A, Braga S, Fernández-Coto MT, López-Novoa JM, et al. Differential effects of 17 $\beta$ - estradiol and raloxifene on bone and lipid metabolism in rats with chronic kidney disease and estrogen insufficiency. *Menopause*. 2010;17:766-71.
15. Varshney S, Bhadada SK, Sachdeva N, Arya AK, Saikia UN, Behera A, et al. Methylation status of the CpG islands in vitamin D and calcium-sensing receptor gene promoters does not explain the reduced gene expressions in parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1631-5.
16. Hofman-Bang J, Gravesen E, Olgaard K, Lewin E. Epigenetic methylation of parathyroid CaR and VDR promoters in experimental secondary hyperparathyroidism. *Int J Nephrol*. 2012;2012:123576.
17. Uchiyama T, Tatsumi N, Kamejima S, Waku T, Ohkido I, Yokoyama K, et al. Hypermethylation of the CaSR and VDR genes in the parathyroid glands in chronic kidney disease rats with high-phosphate diet. *Human Cell*. 2016;29:155-61.
18. Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, et al. Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *FASEB J*. 2012;26:4264-74.
19. Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, et al. High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1845-52.
20. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem*. 1998;273:5253-9.
21. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F367-76.
22. Takahashi F, Denda M, Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E. Hyperplasia of the parathyroid gland without secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2002;61:1332-8.