

# Klotho: un nuevo eslabón en la fisiopatología de la insuficiencia renal crónica

Felipe Salech M.<sup>(1,2)</sup>, Andrés Couve C.<sup>(2)</sup>, Luis Michea A.<sup>(2)</sup>, Miriam Alvo A.<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Servicio Medicina Interna, HCUCCh.

<sup>(2)</sup>ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

<sup>(3)</sup>Departamento de Nefrología, HCUCCh.

**SUMMARY** Klotho, a recently described gene, is mainly expressed in the kidney, and encodes a protein necessary for the activity of fibroblast growth factor receptors (FGFR), especially FGFR1. The Klotho protein has two variants, a transmembrane and a secreted form, and the latter may represent a new hormone synthesized by the kidney. Recent studies have shown that chronic kidney disease (CKD) is associated with significant alterations in the expression of klotho, and this alteration seems to be responsible for many of the phenotypic characteristics that accompany the uremic syndrome. CKD is associated with marked lymphocyte dysfunction, a clinically relevant problem, but the pathophysiological mechanisms behind this dysfunction are mostly unknown. Our research group has recently demonstrated the expression of klotho and FGFR1 in human lymphocytes and is currently implementing a series of experiments designed to determine the role of this pathway in the pathogenesis of lymphocyte dysfunction associated with uremia.

## EL RATÓN KLOTHO Y LA VÍA DE KLOTHO-FGF23

En el año 1997 el grupo de Nabeshima y cols. describió el fenotipo de un ratón que se desarrollaba normalmente hasta la cuarta semana de vida, tras lo cual presentaba en forma progresiva una serie de características que recordaban al envejecimiento humano: éstas incluían aterosclerosis, calcificación vascular, alteraciones de metabolismo calcio-fósforo, osteoporosis, atrofia cutánea y muscular, enfisema y disminución de su supervivencia<sup>(1)</sup>. El fenotipo de este ratón se debe a

una severa disminución en la expresión de un gen que fue denominado klotho, en honor a la diosa griega que extiende el hilo de la vida. El gen, de unos 50 Kpb, codifica para una proteína de 1012 aminoácidos con un dominio transmembrana y que por empalme alternativo del mRNA puede generar una variante de 549 aminoácidos carente de este dominio que sería soluble-secretoria<sup>(2)</sup>. La forma con dominio transmembrana puede ser clivada por proteinasas de la familia ADAMS, generando así una segunda forma de proteína secretada. La expresión de klotho se concentra principalmente en el riñón, aunque es posible encontrarla en menor

cuantía en otros órganos como plexo coroideo, testículos y linfocitos. La variante de *klotho* carente de dominio transmembrana ha sido aislada en suero, líquido cefalorraquídeo y orina, por lo que se ha planteado que pudiera actuar como una hormona<sup>(3,4)</sup>. En el año 2005 Kuro-O, miembro del grupo original de Nabeshima, logró sobreexpresar a *klotho* en una población de ratones, observando un aumento en la sobrevida máxima de estos animales. De esta manera, *klotho* constituye el único gen cuya manipulación aumenta la sobrevida máxima en un modelo mamífero<sup>(5)</sup>.

Se han postulado múltiples mecanismos para explicar la función de *klotho*. Si bien hay evidencia de que modularía la actividad de importantes vías de transducción de señales tales como IGF-1 (de su sigla en inglés *insulin growth factor-1*)<sup>(5)</sup> y *wnt*<sup>(6)</sup>, existe consenso de que su principal mecanismo de acción consiste en potenciar la actividad de los factores de crecimiento fibroblásticos, especialmente de FGF23 (de su sigla en inglés *fibroblast growth factor-23*)<sup>(7)</sup>. FGF23 es un factor de crecimiento producido principalmente por el hueso y liberado al plasma, cuya acción principal a nivel renal es inhibir la reabsorción de fósforo y la expresión de la alfa-1-hidroxilasa, inhibiendo así la síntesis de vitamina D, lo que vincula directamente a la vía *klotho*-FGF23 con el metabolismo calcio-fósforo<sup>(7)</sup>. El ratón *klotho* (nombre con que se conoce al ratón deficiente para este gen) tiene niveles muy elevados de FGF23, cercanos a mil veces sobre el normal y presenta un fenotipo casi idéntico al del ratón deficiente de FGF23<sup>(8)</sup>. Estudios posteriores realizados en líneas celulares han demostrado que *klotho*, tanto en su forma transmembrana como en su forma secretada, es capaz de interactuar físicamente con el receptor de FGF23, llamado FGFR1 (del inglés *fibroblast growth factor receptor-1*). Esta interacción es relevante, puesto que la unión *klotho*-FGFR1 aumenta en tres órdenes de magnitud la afinidad del receptor por su ligando. FGFR1 es un receptor

con actividad tirosin quinasa, y su activación por FGF23 permite la fosforilación secuencial de las kinasas FRS2 $\alpha$  (específica para la vía de los factores de crecimiento fibroblásticos) y ERK 1 - 2 (del inglés *extracellular signal-regulated kinases 1-2*) que se encuentran río debajo de éste<sup>(9)</sup>.

### **KLOTHO E INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (IRC)**

Resulta interesante destacar que el fenotipo de envejecimiento descrito en el ratón deficiente para *klotho* se asemeja mucho a la clínica que presentan los pacientes con IRC, dato que se hace más llamativo al considerar que el principal sitio de expresión de esta proteína es el riñón.

Datos experimentales obtenidos a partir de ratones modelos de IRC (nefrectomía 5/6, donde cinco sextos de la masa renal son extirpados del ratón y DOCA-sal donde se induce hipertensión arterial suplementando la dieta del ratón con corticoides y sodio) demostraron una importante disminución en la expresión renal de *klotho*<sup>(10)</sup>. La asociación entre deterioro de la función renal y disminución en la síntesis renal de *klotho* fue corroborada posteriormente en humanos, encontrándose que biopsias de riñones de pacientes IRC mostraban una disminución importante en la expresión del transcrito de *klotho*, tanto en su forma transmembrana como la secretada<sup>(11)</sup>. Estudios básico-clínicos recientes han demostrado además que la progresión de la IRC se asocia a un aumento progresivo de los niveles plasmáticos de FGF23<sup>(12)</sup>, similar al ratón *klotho*, y que este aumento es un predictor de mortalidad en este grupo de pacientes<sup>(13)</sup>. Existe además evidencia experimental que la sobreexpresión del gen *klotho* juega un rol protector de daño renal en modelos transgénicos de insuficiencia renal<sup>(14,15)</sup>.

Datos aún no publicados, presentados en la versión 2008 del congreso de la Sociedad Americana de Nefrología por Kuro-O y cols, sugieren que

la suplementación farmacológica de klotho en modelos murinos de insuficiencia renal crónica permitiría mejorar muchas de las alteraciones relacionadas con esta patología incluyendo entre otras la hiperfosfemia, la hipercalcemia y la calcificación vascular, a pesar de mantener niveles altos de creatinina en el plasma, planteando que el fenotipo del síndrome urémico puede deberse más que a una menor tasa de filtración a una menor expresión de klotho, concepto que resulta muy novedoso en nuestra concepción de dicha enfermedad (Kuro-O, M. klotho and Chronic Kidney Disease. 41<sup>st</sup> American Society of Nephrology Annual Meeting, Philadelphia, 2008).

### **KLOTHO, FGF23, IRC Y LINFOCITOS**

La IRC se asocia a una disfunción inmunitaria importante<sup>(15)</sup> caracterizada, entre muchos otros fenómenos, por una mayor muerte linfocitaria<sup>(16)</sup>, una mayor expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los monocitos<sup>(17)</sup>, y una menor capacidad de activación de los linfocitos. Esta alteración inmunitaria es de gran relevancia clínica dado que determinaría por un lado el estado proinflamatorio responsable del desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis y con ello al exceso de morbimortalidad cardiovascular observada en estos pacientes<sup>(18)</sup>, y por otro, a una mayor predisposición para el desarrollo de cáncer y complicaciones infecciosas<sup>(19)</sup>. Los mecanismos responsables de esta disfunción son fundamentalmente desconocidos y el conocimiento de los determinantes de estas disfunciones tendrá gran impacto en el desarrollo de estrategias diagnóstico-terapéuticas orientadas a mejorar la sobrevida y calidad de vida de estos pacientes.

Nuestro grupo ha encontrado sólida evidencia de que la vía de klotho-FGF23 estaría presente en linfocitos humanos: existen datos de la literatura y resultados preliminares de nuestro laboratorio, sugieren que los linfocitos CD4+ humanos expresan FGFR1<sup>(20)</sup>, klotho<sup>(21)</sup> y que la expresión de ambas estarían aumentadas en las células mononucleares obtenidas de pacientes con IRC. Las vías de señalización ERK<sup>(22,23)</sup>, IGF-1<sup>(24,25)</sup> y Wnt<sup>(26)</sup> tienen reconocida importancia en el desarrollo, la selección clonal, la proliferación y la producción de citoquinas por linfocitos. Todos estos datos sugieren una potencial participación de klotho y FGF23 en las alteraciones presentes en linfocitos humanos de pacientes IRC. Sin embargo, no existen datos en la literatura que describan la existencia y funcionalidad de la vía klotho-FGF23 en células mononucleares sanguíneas de humanos (ni de otras especies), ni tampoco de la existencia de una alteración en su función asociada a la insuficiencia renal crónica.

Nuestro grupo plantea que la vía klotho-FGF23 existe y es funcional en linfocitos humanos, que se encuentra alterada en pacientes con IRC, y que la disfunción de ésta pudiera explicar al menos en parte las alteraciones inmunológicas asociadas a la IRC. Esperamos que demostrar la existencia de la vía klotho-FGF23 en células mononucleares humanas, junto con la caracterización de su disfunción en la IRC, permita identificar un nuevo mecanismo de modulación inmunológica, no descrito hasta ahora, que podría participar en la enfermedad aterosclerótica, el estado proinflamatorio y las alteraciones de la respuesta inmune de los pacientes IRC<sup>(20)</sup>.

## REFERENCIAS

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T *et al.* Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51.
2. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H *et al.* Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett* 1998;424:6-10.
3. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N *et al.* Secreted *klotho* protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of *klotho* protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004;565:143-7.
4. Chang Q, Hoefs S, Van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase *klotho* hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005;310:490-3.
5. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P *et al.* Suppression of aging in mice by the hormone *klotho*. *Science* 2005;309:1829-33.
6. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J *et al.* Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007;317:803-6.
7. Wang Y, Sun Z. Current understanding of *klotho*. *Ageing Res Rev* 2009;8:43-51.
8. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J* 2006;20:720-2.
9. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP *et al.* Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem* 2006;281:6120-3.
10. Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, Inoue M, Imanari T, Ohyama Y *et al.* Downregulation of the *klotho* gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:865-71.
11. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T *et al.* Severely reduced production of *klotho* in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1015-20.
12. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A *et al.* Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2600-8.
13. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A *et al.* Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008;359:584-92.
14. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T *et al.* Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of *klotho* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2331-6.
15. Cohen G, Haag-Weber M, Hörl WH. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int Suppl* 1997;62:S79-82.
16. Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ. Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S197-205.
17. Malaponte G, Bevelacqua V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Emmanuele G, Travali S *et al.* IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1964-70.

18. Meeus F, Kourilsky O, Guerin AP, Gaudry C, Marchais SJ, London GM. Pathophysiology of cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 2000;76:S140-7.
19. Choudhury D, Luna-Salazar C, Medscape. Preventive health care in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008;4:194-206.
20. Meij JT, Sheikh F, Jimenez SK, Nickerson PW, Kardami E, Cattini PA. Exacerbation of myocardial injury in transgenic mice overexpressing FGF-2 is T cell dependent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H547-55.
21. Witkowski JM, Soroczyńska-Cybula M, Bryl E, Smoleńska Z, Jóźwik A. klotho--a common link in physiological and rheumatoid arthritis-related aging of human CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 2007;178:771-7.
22. Gold MR. B cell development: important work for ERK. *Immunity* 2008;28:488-90.
23. Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci* 2006;42:1-11.
24. Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm IGF Res* 2009;19:187-97.
25. Regis G, Conti L, Boselli D, Novelli F. IFNgammaR2 trafficking tunes IFNgamma-STAT1 signaling in T lymphocytes. *Trends Immunol* 2006;27:96-101.
26. Staal FJ, Sen JM. The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *Eur J Immunol* 2008;38:1788-94.

#### **CORRESPONDENCIA**



Dr. Felipe Salech Morales  
 Instituto de Ciencias Biomédicas  
 Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
 Independencia 1027, Independencia, Santiago  
 Fono: 56 2 9786878  
 E-mail: fhsalech@gmail.com