

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**“EFECTO EN MEMORIA ESPACIAL DE LA DISMINUCIÓN
DE KLOTHO EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN”**

RODRIGO CISNEROS CONTRERAS

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN NEUROCIENCIAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. José Luis Valdés
Prof. Dra. María Isabel Behrens
Prof. Dr. Andrés Couve**

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

RODRIGO CISNEROS CONTRERAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Neurociencias en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Mayo de 2017

Prof. Dr. José Luis Valdés

Director de Tesis

Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Andrea Paula-Lima

Prof. Dra. Gabriela Díaz

Prof. Dra. Paola Morales

Presidente Comisión

Dedicatoria

A mis padres.

Agradecimientos

A mis directores de tesis: Prof. Dr. José Luis Valdés, Prof. Dra. María Isabel Behrens y Prof. Dr. Andrés Couve por sus correcciones, observaciones y enseñanzas durante todo el proceso que significó crear esta tesis.

A mi comisión informante de tesis: Prof. Dra. Paola Morales, Prof. Dra. Gabriela Díaz y Prof. Dra. Andrea Paula-Lima por sus correcciones y observaciones que me ayudaron a dar forma a esta tesis.

A todo el Laboratorio de Aprendizaje, Memoria y Neuromodulación

Índice

Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
El gen <i>klotho</i> y el envejecimiento	11
Klotho y su rol “anti-envejecimiento”.....	13
Función e interacciones de Klotho	14
Klotho en el sistema nervioso	15
La disminución de Klotho y el sistema nervioso.....	17
Klotho y enfermedad en el sistema nervioso.....	18
Mayores niveles de Klotho promueven cognición	19
Estudio del hipocampo mediante pruebas de memoria espacial.....	19
Rol de Klotho en hipocampo y memoria	20
Hipótesis	22
Objetivo General	22
Objetivos específicos (OE)	22
Métodos.....	23
Animales de experimentación	23
Cálculo del tamaño de la muestra.....	23
Bioética.....	23
shRNA de <i>klotho</i> y Vector lentiviral	23
Cirugía estereotáxica	24
Evaluación de memoria espacial.....	25
Validación de la infección lentiviral en hipocampo	26
Control de apoptosis en hipocampo.....	27
Estadística.....	27
Resultados	27

Grupos de animales y procedimientos	27
Resultados tarea de memoria espacial. (configuración de aprendizaje)....	28
Resultados navegación espacial (configuración <i>random</i>).....	30
Resultados adicionales posteriores a la evaluación de memoria	31
Figuras	32
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	49

Resumen

El gen *klotho* fue descrito a finales del siglo pasado como el “gen del envejecimiento”, pues su ausencia gatillaba en ratones un fenotipo de progeria y su sobre-expresión extendía la expectativa de vida hasta en un 30,8%. Con los años de investigación se descubrió que es una pieza clave de un nuevo eje endocrino entre hueso y riñón para la regulación de la homeostasis mineral. Sin embargo, en los últimos años, creciente evidencia empieza a explorar su rol en el sistema nervioso sobre cognición tanto en animales como en el ser humano en el contexto de sub o sobre-expresión sistémica.

En la presente tesis desarrollamos la hipótesis que *Klotho* juega un rol importante en memoria y para ello montamos un experimento de memoria espacial denominado *oasis maze*, que es equivalente al *Morris water maze*, para evaluar la capacidad de aprendizaje en animales con una expresión disminuida de *klotho* únicamente en su hipocampo. Esto último lo conseguimos mediante la expresión local de un shRNA interferente de *klotho* gracias a la inyección, mediante cirugía estereotáxica, de un vector lentiviral para dicho interferente.

Nuestros resultados confirman la hipótesis al demostrar que los animales que presentan una menor expresión de *klotho* demuestran un peor desempeño en el *oasis maze* vs control de inyección sin interferente y control sin inyección. Aún más, para fortalecer estos resultados, estos mismos animales fueron expuestos a una configuración *random* del *oasis maze* donde la memoria espacial se vuelve innecesaria para completar la tarea. En esta configuración fue evidente la pérdida de la diferencia entre grupos. Indicando de esta manera que el deterioro en cognición detectado en nuestra investigación es producto de un déficit en memoria espacial.

Abstract

The *klotho* gene was discovered by the end of the past century as an aging gene since its absence triggers a progeria phenotype in mice. Conversely, the over-expression of this gene extend the life span up to 30,8%. Later it was discovered that this gene is a key piece of a new endocrine axis of interaction between kidney and bones relevant for the homeostasis of mineral regulation. However, during the last years, growing evidence has been proposing a role for *Klotho* in the Central Nervous System over cognition in animals models as in humans by systemic under or overexpression of the gene.

This thesis develops the hypothesis that *Klotho* play a crucial role in cognition. For test this hypothesis we conducted experiments of spatial memory by using the oasis maze which is a dry land version of the Morris Water Maze, to evaluated the learning capacities in animals with a diminish expression of *klotho* restricted to the hippocampus. This evaluation was possible trough local expression of a shRNA interferent for *klotho*, stereotaxically injected in the hippocampus with the help of a lentiviral vector.

Our results confirm the hypothesis, demonstrating that the animals with lower expression of *klotho* shown the poorest performance in the oasis maze compared with its control animals without the interferent injection or even naive untreated animals. Furthermore, as additional control these same animals were exposure to a random configuration of the oasis maze, where the spatial memory is not needed to find rewards in the arena. By using this configuration, the animal does not show any difference in its performance, suggesting a real cognitive impairment in spatial memory.

Introducción

El gen *klotho* y el envejecimiento

El gen *klotho* fue descubierto por el grupo de Kuro-O y descrito en 1997 durante sus esfuerzos por identificar genes asociados a síndromes de envejecimiento prematuro. Mediante cruces de diferentes líneas de ratones transgénico apareció un fenotipo particular, que si bien no expresaba el transgen originalmente estudiado, si exhibía características similares al envejecimiento humano. El fenotipo estaba mediado por la disrupción de la región promotora de un gen que codifica para una proteína de membrana que llamaron Klotho (En la mitología griega klotho es una diosa, la primera de los tres destinos encargada de hilar las hebras de la vida). Este fenotipo sólo aparecía en los ratones homocigotos para el transgen mutado no funcional, denominado inicialmente *kl*. Ya que el ratón homocigoto a esta mutación (*kl/kl*) se desarrollaba con normalidad hasta las 2 semanas de edad, tanto macroscópica como histológicamente, es que el fenotipo visto en ratón *kl/kl* no podía explicarse simplemente como el resultado de un fenómeno de desarrollo incompleto (Kuro-O, *et al.*, 1997).

El defecto en la expresión de *klotho* en ratón no causa fenotipos aparentemente visibles hasta las 3 a 4 semanas de edad, de ahí en adelante conlleva múltiples características similares al proceso de envejecimiento (Kuro-O, *et al.*, 1997). El fenotipo de envejecimiento del ratón *Knock-out* (KO) de *klotho* presenta un síndrome que incluye retraso en el crecimiento y corta expectativa de vida (muerte a las 8-9 semanas de edad); hipocinesia y disturbios de la marcha; cifosis; atrofia de los órganos genitales y el timo; arterioesclerosis; calcificaciones ectópicas (incluyendo el estómago, mucosa bronquial, alveolo pulmonar, plexos coroideos, piel, testículos y músculo cardíaco); osteoporosis; atrofoderma con adelgazamiento de la dermis, epidermis y reducción del número de folículos pilosos; enfisema pulmonar, anormalidades hipofisarias con una menor secreción de hormona del crecimiento (Kuro-O, *et al.*, 1997); déficit auditivo (Kamemori, *et al.*, 2002) déficit cognitivo (Nagai, *et al.*, 2003); degeneración de motoneuronas (Anamizu, *et al.*, 2005); disminución de las células de Purkinje en cerebelo,

reducción de los niveles de paratohormona (PTH), hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipervitaminosis D y elevación de los niveles séricos del factor de crecimiento de fibroblasto 23 (FGF23) (Manya, 2010). Es importante destacar que este fenotipo es rescatable con la expresión exógena de *klotho* (Kuro-O, *et al.*, 1997) o por estudios de expresión inducible (Masuda, *et al.*, 2005), demostrando que el síndrome completo es dependiente de este único gen.

Klotho, se expresa principalmente en riñón y cerebro (túbulo contorneado distal (Kuro-O, *et al.*, 1997), proximal (Andrukhova, *et al.*, 2012) y plexos coroideos, respectivamente), pero también, aunque en menor medida en hipófisis, placenta, músculo esquelético, vejiga urinaria, aorta, páncreas, testículo, ovario, colon y glándula tiroides (Kuro-O, *et al.*, 1997). Análisis estructurales posteriores permitieron descubrir que el gen *klotho* de ratón está compuesto por 5 exones y sobre 50 kb, además de descubrir la presencia de dos formas de *Klotho* una de membrana y otra putativa secretada de efecto humoral. Ambas estarían determinadas por término transcripcional alternativo (Shiraki-Iida, *et al.*, 1998). En humanos el gen *klotho* está compuesto también por 5 exones y sobre 50 kb, ha sido mapeado en el cromosoma 13q12 y comparte sobre un 80% de su identidad con el gen en ratón (Kuro-O, *et al.*, 1997; Matsumura, *et al.*, 1998).

La proteína *Klotho* corresponde a una proteína transmembrana tipo I de un solo paso de 1014 aminoácidos de largo y un dominio intracelular corto de 10 aminoácidos sin dominios funcionales descritos (Kuro-O, 2010), su dominio extracelular consiste en dos dominios beta-glucosidasa tipo I (KL1 y KL2). Por otra parte, una forma secretada que resulta del corte proteolítico de la forma de membrana es detectable en suero y fluido cerebro-espinal (FCE) con un tamaño de 130 kDa (Imura, *et al.*, 2004; Semba, *et al.*, 2014). La forma putativa secretada prevista inicialmente por término transcripcional alternativo en los estudios de estructura (Shiraki-Iida, *et al.*, 1998; Matsumura, *et al.*, 1998) consistiría en solo el dominio KL1, que ha sido posible de detectar en fluido extracelular mediante anticuerpos recientemente (Massó, *et al.*, 2015) pero hasta la fecha se desconoce su rol.

Klotho y su rol “anti-envejecimiento”

Estudios de secuenciación de *klotho* en distintas líneas de ratón, demostró una expresión diferente entre líneas, donde por ejemplo la línea denominada SPRET/Ei presentó mayores niveles totales de mRNA y de la forma de membrana de Klotho. Esta línea de ratón demostró tener mayor expectativa de vida, menos factores de riesgo de aterosclerosis y mejor audición que el resto de líneas de ratón estudiadas (Bektas, *et al.*, 2004). Estas características “anti-envejecimiento” fueron también demostradas por Kurosu, *et al.* 2005 donde la sobre-expresión de *klotho* extendía significativamente la expectativa de vida de los ratones. Entre un 20 a un 30,8% en machos y un 18,8 a 20 % en hembras.

Estudios recientes han explorado los posibles mecanismos protectores de Klotho contra el envejecimiento, como por ejemplo, que la sobreexpresión de *klotho* protegería contra estrés de retículo endoplásmico, incrementando en consecuencia la viabilidad celular en modelos *in vitro* (Banerjee, *et al.*, 2013) y resistencia a la insulina e hiperglicemia, inhibiendo la señalización intracelular de la insulina y el factor de crecimiento insulino tipo 1 (IGF1) (Kurosu, *et al.*, 2005). Este último efecto es de gran interés, pues la reducción de la señalización por IGF1, insulina y otras hormonas asociadas, está relacionado a una significativa extensión en la longevidad en múltiples especies (fenómeno ampliamente conservado en la naturaleza) (Bartke, 2006) y a una mayor resistencia al estrés oxidativo, donde la conjugación de ambos fenómenos sería probablemente uno de los mecanismos principales “anti-envejecimiento” de la sobre-expresión de *klotho* (Papaconstantinou, 2008). Sin embargo, existe evidencia contraria indicando que la ausencia de Klotho no alteraría la homeostasis de glucosa y la sensibilidad aumentada a insulina correspondería a un efecto secundario a la alteración en la homeostasis mineral (Anour, *et al.*, 2012). Cabe señalar que hay evidencia de la interacción de Klotho con vías de señalización en fenómenos de cáncer como IGF1/insulina (Kurosu, *et al.*, 2005); ROS (Ikushima, *et al.*, 2006); p53/p21 (Machado de Oliveira, 2006); Wnt (Liu, *et al.*, 2007) y su alteración específica en modelos de cáncer sugieren un rol supresor tumoral en cáncer, siendo este fenómeno también un área de intensa investigación (Xie, *et al.*, 2013).

Función e interacciones de Klotho

El ratón *knock out* de FGF23, una hormona derivada de tejido óseo que induce excreción de fosfato en la orina, gatilla un fenotipo similar al síndrome presente en el ratón mutante de *klotho*, (Shimada, *et al.*, 2004) tanto FGF23 y Klotho participan de un eje endocrino común en el proceso de regulación del metabolismo de fosfato. El ratón deficiente de *klotho* exhibe niveles elevados de FGF23, indicando que la pérdida de Klotho induce resistencia a FGF23 ya que sería un co-receptor obligado para esta hormona (Urakawa, *et al.*, 2006; Kurosu, *et al.*, 2006) transformando al ubicuo FGFR1c (receptor 1c del factor de crecimiento fibroblástico) en específico para FGF23 y aumentando la afinidad del complejo receptor por un factor de 20 (Urakawa, *et al.*, 2006; Goetz, *et al.*, 2012). A su vez, FGF23 participaría en la regulación negativa de los niveles de vitamina D (Liu. *et al.*, 2006). La principal fuente de FGF23 circulante son probablemente los osteoblastos y osteocitos y su secreción desde el tejido óseo es estimulada por la vitamina D, por aumentos extracelulares de fosfato (Martin, *et al.*, 2012) y calcio (Quinn, *et al.*, 2013). Formando, de esta manera, un ciclo de retroalimentación entre hueso y riñón (Martin, *et al.*, 2012).

La disrupción de esta retroalimentación negativa por ablación tanto de *FGF23* o *klotho* genera hiperfosfatemia, hipercalcemia e hipervitaminosis D.

Este estado metabólico es el responsable primario del síndrome de envejecimiento prematuro, revisado por Kuro-O, 2010, sugiriendo que la hiperfosfatemia sería el principal responsable del fenotipo tipo-envejecimiento, probablemente favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la mitocondria (Kuro-O, 2010). Diversos estudios han apoyado esta teoría demostrando como una dieta baja en vitamina D puede rescatar o evitar el fenotipo senescente en estos mutantes (Lanske & Razzaque, 2007; Carpinelli, *et al.*, 2011; Kosakai, 2011) o como la ablación riñón-específica de *klotho* en ratón recapitula el fenotipo de *knock out* global de *klotho* (Lindberg, *et al.*, 2014).

Junto a su función como co-receptor para FGF23, la proteína Klotho participa como un factor humoral. El dominio extracelular de Klotho es cortado por las metaloproteasas ancladas a la membrana ADAM10 y ADAM17 (del inglés “a

desintegrin a metalloproteinase") generando así su forma secretada (Chen, *et al.*, 2007) y siendo el riñón probablemente la principal fuente de Klotho soluble bajo condiciones fisiológicas (Lindberg, *et al.*, 2014). Esta forma secretada presenta efectos diferentes de la versión de transmembrana, como favorecer la actividad y abundancia de canales catiónicos reguladores de la reabsorción renal de Ca^{+2} (Cha, *et al.*, 2005), la regulación de canales que permiten excreción renal de K^{+} (Cha, *et al.*, 2009), regulación negativa de canales de calcio inducidos por estrés, con efecto cardio-protector (Xie, *et al.*, 2012), inhibición de la recaptura de fosfato en músculo liso vascular (Hu, *et al.*, 2011), la inhibición de la autofosforilación del receptor a insulina inducida por insulina e IGF1 en cultivos celulares (Kurosu, *et al.*, 2005 ;Wolf, *et al.*, 2008), protección contra estrés oxidativo y senescencia prematura en cultivos de células vasculares endoteliales (Ikushima, *et al.*, 2006), inducción de la maduración, desarrollo y formación de mielina en cultivos de oligodendrocitos mediante las vías de señalización Akt y ERK (Chen, *et al.*, 2013) y modulación de la señalización de la vía Wnt, uniéndose a ligandos Wnt impidiendo su unión al receptor de superficie (Liu, *et al.*, 2007). Con respecto a esto último, es interesante señalar que si bien la activación de la señalización celular de Wnt es esencial para la proliferación y supervivencia de las células troncales, incluyendo el proceso de neurogénesis hipocámpal del adulto (Varela-Nallar & Inestrosa, 2013), su activación prolongada puede causar una disminución en la disponibilidad de este tipo de células (Scheller, *et al.*, 2006; Kirstetter, *et al.*, 2006).

Klotho en el sistema nervioso

Si bien la expresión de *klotho* en cerebro se reconoce desde la descripción inicial del gen (Kuro-O, *et al.*, 1997), han sido trabajos más recientes los que han profundizado su posible rol, patrón de distribución y nivel de expresión en dicho tejido. Con respecto a su distribución en cerebro la proteína Klotho se expresa principalmente en el plexo coroideo de ratón (Kuro-O, *et al.*, 1997; German, *et al.*, 2012; Clinton, *et al.*, 2013) y rata (Clinton, *et al.*, 2013) y en células de Purkinje

(German, *et al.*, 2012), pero también es detectable en corteza, hipocampo y sustancia blanca, tanto en neuronas como en oligodendroglía pero no en astrocitos (Clinton, *et al.*, 2013). Es interesante señalar que Klotho se concentra principalmente en la región nuclear y perinuclear de las células de los plexos coroideos y neuronas de Purkinje, sin embargo se desconoce el rol de esta distribución intracelular (German, *et al.*, 2012).

Con respecto al perfil de expresión de mRNA en el cerebro adulto de la rata, los niveles más altos detectables por hibridización *in situ* son en hipocampo y núcleos de la amígdala. Además, niveles altos son detectables en los núcleos anterior, medio-dorsal y paraventricular del tálamo, el resto del cual presenta niveles moderados. En el mesencéfalo y el puente la expresión de *klotho* es mayor en la sustancia nigra y muestra una expresión mucho menor en estructuras cercanas a ella (Clinton, *et al.*, 2013).

En el cerebro en desarrollo en la rata la expresión de *klotho* es detectable tan precoz como en día post natal 1 (P1) y su patrón de distribución es muy similar al presente en el cerebro adulto, sin embargo, los niveles de expresión de mRNA de *klotho* varían a través del desarrollo. En corteza cerebral existen niveles iniciales elevados que descienden alrededor de la segunda semana de vida para volver a incrementarse y alcanzar sus máximos en la adultez (P75). Algo similar ocurre en núcleo caudado y putamen con un mínimo de expresión durante la segunda a tercera semana de vida. En hipocampo la expresión de *klotho* se mantiene regular durante el desarrollo, y en amígdala existiría un aumento gradual durante el desarrollo hasta la adultez (Clinton, *et al.*, 2013).

Estudios recientes confirman la expresión de Klotho en neuronas de hipocampo en ratón, tanto en CA1 (Li, *et al.* 2017) como en giro dentado (Li, *et al.*, 2010; Salech *et al.*, en revisión), como también, la ubicación en la membrana pre y postsináptica de la forma completa de la proteína en CA1 (Li, *et al.* 2017).

La disminución de Klotho y el sistema nervioso

Se ha descrito que el ratón homocigoto a la mutación de *klotho* presenta déficit cognitivo en pruebas de memoria a objetos novedosos y de condicionamiento al miedo, que a su vez estarían asociadas a apoptosis neuronal en hipocampo, elevado estrés oxidativo (Nagai, *et al.*, 2003) y disfunción sináptica determinada por una menor expresión de sinaptofisina, un marcador de vesículas sinápticas (Li, *et al.*, 2004). Shiozaki, *et al.*, 2008 realizaron una descripción bioquímica y morfológica del cerebro de los ratones *knock out* para *klotho* de 8 semanas de edad, cuando el fenotipo senescente está completamente desarrollado, demostrando mayor cantidad de neurofilamentos en el axón asociados a su vez a mayores niveles de fosforilación, mayor cercanía entre microtúbulos en las dendritas de células de Purkinje, significativa reducción en la expresión de la proteína asociada a micro-túbulo 2 (MAP2), desórdenes en la morfología de los organelos neuronales, evidencia de aumento de autofagia, reducción de la proteína antiapoptótica Bcl-xL y aumento de la proteína proapoptótica Bax, así también disminución de las estructuras y proteínas asociadas a sinapsis, degeneración evidente en células piramidales de hipocampo y posible en células de Purkinje del cerebelo, aumento en la densidad de filamentos gliales astrocíticos, aumento de la expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Shiozaki, *et al.*, 2008) y defectos en la mielina principalmente en nervio óptico y cuerpo calloso (Chen, *et al.*, 2013). Todas estas alteraciones son muy similares a las encontradas en animales envejecidos (Shiozaki, *et al.*, 2008; Gotow, 2008; Chen, *et al.*, 2013) y han vuelto al ratón mutante de *klotho* un modelo sugerido para la investigación en el campo del envejecimiento en neurociencias (Ito, 2013). Sin embargo, diferenciar si estas alteraciones son producto del déficit local de Klotho o resultado del síndrome senescente producto del desbalance en el metabolismo de Calcio, fosforo y vitamina D, es un tema en activo cuestionamiento (Lanske & Razzaque, 2007). De esta manera estudios en degeneración de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en el ratón deficiente de Klotho o en el déficit auditivo asociado a estos ratones han demostrado

rescatar el fenotipo de afección neurológica con dietas deficientes en vitamina D (Kosakai, 2011; Carpinelli, *et al.*, 2011).

Klotho y enfermedad en el sistema nervioso

En suma a las alteraciones descritas en los modelos *in vitro* e *in vivo* del posible rol de Klotho en la patología del sistema nervioso, se ha estudiado paralelamente qué procesos patológicos espontáneos pueden estar asociados a disfunción de Klotho y en esta línea ha sido de gran utilidad el descubrimiento de una mutación en humanos denominada KL-VL. El genotipo KL-VL, correspondería a una variable funcional de *klotho* y estaría asociada a una menor expectativa de vida en personas homocigotas para dicho alelo (Arking, 2002), un mayor riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria (Arking, 2003), accidente cerebro vascular isquémico en población relativamente joven (menores de 40 años) (Majumdar, 2011) y tendría además un posible rol en las diferencias en cognición entre genotipos asociado a la edad (Deary, *et al.* 2004).

Si bien, la mayor parte de la literatura se ha centrado en el rol patológico de Klotho en enfermedad renal y metabolismo mineral (John, *et al.*, 2011), muy poco se ha descrito sobre su rol en enfermedad del sistema nervioso y neurodegeneración. Considerando que las proyecciones de expectativa de vida siguen aumentando (Medina, 1999), con un incremento muy importante en el número de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), la principal causa de demencia en la vejez (Sheng, *et al.* 2012), y que estudios recientes demostraron que las concentraciones de Klotho detectables en fluido cerebro-espinal son significativamente menores en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Semba, *et al.*, 2014) y en modelo de ratón (Massó, *et al.*, 2015), sumado a estudios de sobre-expresión de *klotho* en modelos de Alzheimer en ratones que demuestran neuroprotección (Dubal, *et al.*, 2015). Es por todo esto, que profundizar en el rol de Klotho en regiones del sistema nervioso como el hipocampo se vuelve un campo de estudio muy prometedor.

Mayores niveles de Klotho promueven cognición

Si bien la variable genética de *klotho* humano KL-VS puede significar mayor riesgo para las personas homocigotas a dicho gen (Arking, 2002; Arking, 2003, Deary, *et al.*, 2004, Majumdar, 2011). Los portadores heterocigotos de este gen presentan mejores niveles cognitivos (Dubal, *et al.*, 2014) e incluso un mayor volumen de la corteza cerebral y mayor conectividad en redes neurales vulnerables al envejecimiento y enfermedad de Alzheimer (Yokoyama, *et al.*, 2015; Yokoyama *et al.*, 2016), y todo esto asociado a mayores niveles de Klotho soluble en suero. En consecuencia se han realizado estudios cognitivos en ratones con sobreexpresión sistémica de *klotho*, demostrando también un mejor desempeño en múltiples pruebas de aprendizaje y memoria, este efecto podría estar mediado por un aumento en la potenciación a largo plazo (LTP) en el giro dentado, una forma de plasticidad sináptica y una mayor expresión de GluN2B (Dubal, *et al.*, 2014), una subunidad del receptor a glutamato NMDA con función clave en aprendizaje y memoria, (Zhao, *et al.*, 2009; Dubal, *et al.*, 2014) y sería un efecto independiente de la edad (Dubal, *et al.*, 2014).

Estudio del hipocampo mediante pruebas de memoria espacial

Anatómicamente la formación hipocampal se extiende desde posterior a anterior en la base de los lóbulos temporales, en su eje transversal presenta una organización con múltiples subregiones: la corteza entorrinal, el giro dentado, *Cornu Ammonis* (CA1-CA4) y el *subiculum* (Small, *et al.*, 2011). A su vez, las diferentes regiones del hipocampo se pueden diseccionar funcionalmente según su procesamiento de la información, de esta manera se ha demostrado que la subregión CA1 procesa información temporal; CA2 procesa información de memoria social (Hitti & Siegelbaum, 2014), CA3 dorsal participa en el procesamiento espacio-temporal de la memoria, mientras que el giro dentado procesa patrones de separación espacial (Hunsaker & Kesner, 2008). En esta misma línea, la corteza entorrinal sirve de “puerta de entrada” a la formación

hipocampal y el *subiculum* junto a CA1 son los principales flujos de salida del circuito hipocampal (Small, *et al.*, 2011).

Los estudios en animales del posible efecto de Klotho en memoria se han centrado en el posible efecto sobre el hipocampo (Zhao, *et al.*, 2009; Dubal, *et al.*, 2014). Esto no sorprende, pues el hipocampo ha mantenido una posición central en el desarrollo de teorías sobre memoria normal y anormal en humanos y animales, esta región del encéfalo contribuye al proceso de memorias explícitas tales como la espacial (Good, 2002). Este tipo de memoria es un aspecto importante de la función cognitiva y en orden de evaluarla en roedores, se han diseñado diferentes pruebas específicas para comprobar hipótesis discretas (Crawley, 1999). Sin embargo, frente a esta amplia disponibilidad, es de suma importancia la correcta selección de las pruebas dependiendo de la especie animal, área anatómica y tipo de patología o alteración en estudio (Hunsaker, 2012). Destacan, en esta línea, las pruebas que han sido el estándar como por ejemplo *Morris water maze* que se ha utilizado ampliamente para estudiar navegación espacial en modelos de lesión hipocampal (Morris. *et al.* 1982).

Dañar el hipocampo típicamente produce amnesia anterograda, donde la memoria adquirida recientemente se ve más alterada que memorias adquiridas remotamente, sin embargo, en memoria espacial esta situación es diferente y los animales con lesión hipocampal fallan en pruebas de navegación sin importar el momento de la adquisición del aprendizaje previo a la lesión (Clark, *et al.* 2005) y esto se replica incluso en modelos de lesión incompleta (Clark, *et al.* 2005; Hunsaker & Kesner, 2008; Kesner, 2013). Los mecanismos detrás del rol de la formación hipocampal en navegación son aún tema en intenso debate y buscan cerrar las brechas entre los dos grandes puntos de vistas de su función: memoria y navegación espacial (Schiller, *et al.*, 2015; Eichenbaum, 2017).

Rol de Klotho en hipocampo y memoria

Basados en la presencia de Klotho en hipocampo (Li, *et al.*, 2010; Clinton, *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2017; Salech, *et al.*, en revisión) y su posible rol tanto en

potenciar cognición en situaciones de sobreexpresión sistémica en humano (Dubal, *et al.*, 2014; Yokoyama, *et al.*, 2015; Yokoyama *et al.*, 2016) y animales; (Dubal, *et al.*, 2015) como en interferir procesos cognitivos en modelos *knock out* sistémico (Nagai, *et al.*, 2003), es que pretendemos utilizar un modelo local de interferencia de *klotho*, exclusivamente en hipocampo, para evaluar si su disminución en dicho tejido es suficiente para generar un efecto en pruebas de memoria espacial. Por todo lo anterior, proponemos la hipótesis de que la disminución de la expresión hipocampal de *klotho* se asociaría a cambios deletéreos en el procesamiento de memoria dependiente de hipocampo en ratón. Planteamos que esto podría demostrar la importancia de *Klotho* en memoria sin las interferencias de los modelos sistémicos. Esta situación no ha sido descrita en la literatura.

Para explorar esta idea, infectamos ratones de la cepa C57B6 adultas de 5 meses de edad con un vector lentiviral cargado de un shRNA interferente de *klotho* en la región subgranular del giro dentado de su hipocampo derecho. El vector se entrega *in situ* mediante una inyección estereotáxica. Cuatro semanas después los animales son expuestos a una prueba cognitiva de aprendizaje espacial dependiente de la actividad hipocampal denominada *oasis maze* (Clark, *et al.* 2005), teniendo como control a ratones inyectados con vector viral con una secuencia de RNA no interferente o animales sin inyección alguna. Esta prueba es una versión alternativa “en seco” del “*Morris water maze*” (Morris. *et al.* 1982) que es equivalente con esta última en su capacidad de evaluar disfunción en memoria espacial (Clark, *et al.* 2005; Martínez, *et al.*, 2016).

En una segunda configuración, los grupos experimentales fueron controlados con pruebas que no dependan de la actividad del hipocampo sobre aprendizaje espacial (*RANDOM oasis maze*).

Hipótesis

La disminución de la expresión local de la proteína Klotho en hipocampo produce deterioro en los procesos de memoria y aprendizaje espacial en ratones adultos.

Objetivo General

Determinar el efecto de la inyección en hipocampo derecho de un shRNA de *klotho* en el rendimiento de una prueba de memoria espacial dependiente de hipocampo en ratones adultos.

Objetivos específicos (OE)

1. Evaluar el efecto de la inyección intra-hipocampal derecha de dos shRNA de *klotho* en un vector lentiviral en una prueba de memoria espacial dependiente de hipocampo en ratones adultos, comparados con ratones inyectados con el vector viral sin el interferente (Scramble) y con ratones sin inyección (WT).
2. Evaluar el efecto de la inyección intra-hipocampal derecha de dos shRNA de *klotho* en un vector lentiviral en una prueba de navegación espacial no dependiente de memoria hipocampal en ratones adultos, comparados con ratones inyectados con el vector viral sin el interferente (Scramble).

Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron 37 ratones de la cepa C57BL adultos, de 6 meses de edad, hembra. Se distribuyeron en 4 grupos de animales: 2 grupos de inyección hipocámpal de shRNA de *klotho* en vector lentiviral (grupo interferente FUX-46 y FUX-47), control inyección hipocámpal de vector viral sin interferente (Scramble) y control adicional sin inyección (WT).

Tamaño de la muestra

Los grupos de animales se compusieron de 7 animales para los grupo Scramble, FUX-47, WT y 8 animales para el grupo FUX-46. Un total de 8 animales fueron descartados del análisis estadístico por motivos descritos más adelante en los resultados. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas.

Bioética

El proyecto y el uso de animales de experimentación fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad de Chile. Protocolo CBA#0669 FMUCH.

shRNA de *klotho* y Vector lentiviral

Nuestro laboratorio dispuso para el estudio 2 vectores lentivirales con los interferentes de *klotho* FUX 46 y FUX 47 además de un tercer vector lentiviral sin expresión de interferente (Scramble) (Salech, *et al.*, en revisión). Todos los shRNA fueron subclonados para incorporar la expresión de GFP antes de producir las partículas lentivirales. Los 3 son aptos para la expresión de shRNA y GFP en células de sistema nervioso central. Este shRNA ensamblado en partículas virales

ha demostrado ser útil en inhibir la expresión del gen *klotho* en el sistema nervioso central determinado por rtPCR utilizando hipocampos de ratón adulto infectados con lentivirus por 4 semanas, n=4 por grupo, Mann Whitney, P=0,0286 para FUX 46 vs Scramble y para FUX 47 vs Scramble (Salech, *et al.*, en revisión, Fig. S1)

La utilización de estos vectores lentivirales esta extensamente descrita en la literatura (Wong *et al.*, 2006) y ha sido aprobada por el comité de bioseguridad del ICBM para los estudios realizados en nuestro laboratorio.

Cirugía estereotáxica

Los lentivirus con el shRNA fueron inyectados en el hipocampo derecho de ratones C57b6 hembras de 5 meses de edad utilizando un aparato estereotáxico en la sala de cirugía del laboratorio CEMC (centro de estudios moleculares de la célula).

La anestesia se realizó mediante inducción saturante con isoflurano seguida de mantención con una mezcla de ketamina y xilacina (40mg/kg y 8mg/kg respectivamente) administrada vía intraperitoneal. Como profilaxis de lesión corneal se utilizó lagrimas artificiales en gel.

Una cantidad de 1.5 µl del concentrado del vector lentiviral fue cargada en campana de extracción de aire para virus en una jeringa Hamilton 95RN con una aguja Hamilton 33G; 1,5"; para luego ser inyectada a una velocidad de 0,3 µl /min. (esperando 5 min. antes de retirar la aguja y luego retirando la aguja a 0,01 mm por segundo hasta una profundidad de -1,4 mm, esperando nuevamente un minuto antes de retirar completamente la aguja) en el giro dentado del hipocampo derecho de ratones adultos usando las siguientes coordenadas: AP -0,2 mm desde el bregma., lateralidad de -0,2 mm, y una profundidad de -1,85mm (Paxinos & Franklin, 2007). La incisión inicial se suturó con dos puntos simples separados. Este sitio de inyección fue escogido para disminuir artefactos en la región subgranular del giro dentado producto de la inyección, esto con el fin de facilitar estudios posteriores en dicha región.

La recuperación de la anestesia se realizó en caja postoperatoria previamente entibiada. El material desechable utilizado fue eliminado en contenedores para desecho con riesgo biológico en campana de virus.

La expresión del vector fue corroborada mediante la expresión de GFP.

Evaluación de memoria espacial

El inicio del protocolo de evaluación cognitiva inició a las 4 semanas de la cirugía estereotáxica (Fig.1).

Oasis maze

Siguiendo las especificaciones de Clark, et al. 2005, con algunas modificaciones menores (Martínez, et al., 2016), se desarrolló una versión “en seco”, del *Morris Water maze*, denominado *oasis maze* en la cual los animales de experimentación, previamente restringidos de agua de bebida por 24 h., debían usar claves espaciales para buscar en un espacio abierto una recompensa específica (oasis) que contiene agua.

El aparato consiste en una arena circular de 1,4 m de diámetro, pintada de color gris que contiene 21 pocillos equidistantemente distribuidos donde se colocaba una gota de agua (0,05 ml) quedando escondida en su interior.

Fases de la evaluación

Fase I. Pre-entrenamiento

Los ratones privados de agua por 24 h. previas, fueron colocados en el *oasis maze*, donde 50% de los pocillos habían sido llenados con una gota de agua (0,05 ml) de forma aleatoria, permitiéndoles buscar y beber libremente en dos ocasiones de 5 min. cada una y separadas por 30 min. Al día siguiente el procedimiento se repitió igual pero con 25% de los pocillos con agua escondida de forma aleatoria.

Fase II. Entrenamiento espacial

Siguiendo a la fase I, los ratones tuvieron un día de entrenamiento en el cual el agua fue colocada en un sólo pocillo. Por cada ratón el agua fue colocada

siempre en la misma posición relativa a claves espaciales distantes. Se realizaron 15 intentos por ratón de 1 min. de duración, con un intervalo de 30-40 seg. entre intentos, siempre colocándolo en lugares de partida distintos de la superficie del *oasis maze*, para prevenir aprendizajes procedimentales. Durante el proceso de navegación la posición del animal fue videograbada con una cámara en posición cenital y posteriormente se registró el número de errores (colocar la cabeza en un pocillo sin recompensa) y se reconstruyó el recorrido del animal mediante la técnica de *videotracking*, utilizando una rutina de Matlab®, para determinar la razón entre trayectoria observada y la esperada del animal (Fig. 2) como también distancia recorrida, latencia y velocidad.

Al día siguiente de la fase de entrenamiento para buscar agua según claves espaciales, se incorporó a los animales a la fase denominada RANDOM, en la cual se les dio un total de ensayos de entrenamiento equivalentes, excepto por que la ubicación del agua en el pocillo fue aleatoriamente cambiada entre cada intento. De este modo si bien los animales podían desarrollar estrategias para encontrar el agua, la memoria de ubicaciones específicas se volvía irrelevante.

Después de cada día de entrenamiento a los ratones se les permitió beber agua *ad libitum* por 1 h.

Validación de la infección lentiviral en hipocampo

La infección se confirmó por fluorescencia del gen reportero GFP asociado al vector con el interferente, los cortes de cerebro fueron obtenidos después del estudio de memoria espacial. Los ratones posterior a ser anestesiados fueron perfundidos con buffer fosfato salino (PBS), y luego con paraformaldehído al 4%, 1M, pH 7.4, tras lo cual los cerebros fueron removidos, cortados y montados para su observación bajo microscopía de fluorescencia para evaluar la expresión de GFP por parte de las células infectadas. Una infección exitosa se consideró por fluorescencia de GFP en todas las capas de la región granular desde el polo septal hasta los segmentos más temporales del hipocampo. (Fig. 12)

Control de apoptosis en hipocampo

Estudio con inmunofluorescencia contra caspasa 3 clivada (Asp175; Cell Signaling technology®) realizados en rebanadas de hipocampo infectados con los lentivirus descartaron un aumento de la muerte celular asociada a la infección. Experimento en triplicado.

Inmunofluorescencia

Para la inmunodetección de Caspasa 3 clivada, las rebanadas de hipocampo fueron incubadas en solución de bloqueo (3% suero de burro, 3% BSA, 0,5% Triton X-100 en PBS) por 2 h. Usándose el anticuerpo de conejo anti-caspasa3 clivada Asp175 a dilución 1:400 y anticuerpo secundario anti-conejo Alexa (molecular probes). Las rebanadas fueron montadas en placas cubiertas de gelatina con *Vectashield* (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

Estadística

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de ANOVA de una vía para las velocidades, posteriormente se realizó una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey. Se calculó regresión lineal para número de errores, razón de distancia, latencia y recorrido con el fin de analizar el progreso de aprendizaje en ensayos consecutivos determinado como una pendiente negativa significativa. El análisis se realizó con el *software* estadístico Prism 6®. Se consideró significativa una diferencia asociada a un error alfa igual o menor al 5%.

Resultados

Grupos de animales y procedimientos

Se utilizó treinta animales previamente sometidos a inyección estereotáxica en su giro dentado derecho (coordenadas en milímetros: AP -0,2 desde el bregma, Lateralidad -0,2, profundidad -1,85) con el vector lentiviral conteniendo ya sea los

interferentes de *klotho* FUX 46, FUX 47 o el Scramble (control) más 7 animales control adicional sin inyección (WT). La inyección unilateral fue seleccionada para utilizar el hipocampo izquierdo como control y considerando la evidencia de lateralización derecha de las funciones en navegación espacial del hipocampo de ratón (Shinohara, *et al.* 2012) y rata (Klur, *et al.* 2009). Los grupos de animales fueron expuestos a una fase de pre-entrenamiento en la tarea de memoria espacial, *oasis maze*. Esta prueba permite la evaluación del rendimiento en memoria espacial dependiente de hipocampo (Clark, *et al.*, 2005; Martínez, *et al.*, 2016) (Fig.1) y es equivalente al *Morris Water Maze* que ha sido utilizado previamente para estudiar navegación espacial en lesión hipocampal (Morris. *et al.* 1982).

De estos 30 animales, 5 no pasaron la etapa de pre-entrenamiento al no obtener el criterio cualitativo de ingreso a la fase de entrenamiento (presentar un comportamiento de búsqueda y beber de las recompensas del *oasis maze*) y 3 presentaron un nivel no satisfactorio de infección en sus hipocampo inyectados (GFP ampliamente distribuido desde polo septal a temporal en 12 cortes transversales de hipocampo), eliminándose posteriormente del análisis. Los 22 ratones restantes pertenecientes a los tres grupos experimentales más el grupo control adicional (Scramble n=7, FUX 46 n=8, FUX 47 n=7, WT=7) fueron evaluados con respecto al número de errores y aciertos, así como la distancia total recorrida, velocidad en actividad, latencia del ensayo y un índice de distancia (distancia total recorrida hasta el objetivo/ distancia recorrida ideal) durante el desarrollo del *oasis maze*, usando una rutina de *videotracking* reconstruida y analizada mediante el software MatLab®.

Resultados tarea de memoria espacial. (configuración de aprendizaje)

Promedio de errores: Corresponde al promedio del número de veces que se explora un pocillo sin recompensa: El análisis mediante regresión lineal muestra un cambio significativo en el grupo control WT (pendiente= -0,290; P= 0,01; R²= 0,36) (Fig. 3a) y Scramble (pendiente= -0,354; P= 0,03; R²= 0,30) (Fig. 3b),

indicando un progreso en el proceso de aprendizaje de estos dos grupos el cual no fue observado en los grupos interferentes, ya que no presentaron progreso en el aprendizaje a lo largo de los ensayos consecutivos, FUX 46 (pendiente= -0,106; $P= 0,36$; $R^2= 0,06$) y FUX 47 (pendiente= $1,7 \cdot 10^{-9}$; $P= 1,00$; $R^2= 2,2 \cdot 10^{-17}$), (Fig. 3 c-d)

Razón de distancia: La razón entre la distancia recorrida en el *oasis maze* durante la prueba y la mínima distancia recorrida esperada hasta la recompensa para cada ensayo. Se diferencia de la distancia total recorrida al normalizar por el sitio de partida. El análisis de regresión lineal muestra un cambio significativo para el grupo control WT (pendiente= -0,612; $P= 0,01$; $R^2= 0,36$) (Fig. 4a) indicando un progreso en el proceso de aprendizaje a diferencia de los grupos Scramble e interferentes que no presentaron cambio en relación a los ensayos consecutivos, Scramble (pendiente= -0,307; $P= 0,14$; $R^2= 0,15$), FUX 46 (pendiente= -0,056; $P= 0,67$; $R^2= 0,01$) y FUX 47 (pendiente= -0,22 $P= 0,3$; $R^2= 0,08$), (Fig.4b-d).

Distancia total recorrida en la búsqueda del pocillo con recompensa: En el análisis de regresión lineal existe un cambio significativo en el grupo control WT (pendiente= -24,30; $P= 0,002$; $R^2= 0,51$), Scramble (pendiente= -34,93; $P= 0,04$; $R^2= 0,27$) y FUX 47 (pendiente= -20,09; $P= 0,02$; $R^2= 0,33$) (Fig. 5a; 5b y 5d) indicando un progreso en el proceso de aprendizaje para esta variable a diferencia del grupo interferente FUX 46 que no presentó mejora en relación a los ensayos consecutivos, (pendiente= -1,298; $P= 0,86$; $R^2= 0,002$), (Fig. 5c).

Latencia: Correspondiente a el tiempo necesario para encontrar la recompensa en el pocillo recompensado: En la regresión lineal existe un cambio significativo en los grupo control WT (pendiente= -1,424; $P=0,0008$; $R^2=0,59$) y control Scramble (pendiente= -1,147; $P=0,03$; $R^2= 0,28$) (Fig. 6a-b) indicando un progreso en el proceso de aprendizaje a diferencia de los grupos interferentes que no presentan cambio en relación a los ensayos consecutivos, FUX 46 (pendiente= -0,286; $P= 0,61$; $R^2= 0,02$) y FUX 47 (pendiente= -0,441; $P=0,35$; $R^2= 0,06$), (Fig. 6c-d).

Un resumen de estos resultados puede verse más adelante en la tabla 1

Resultados navegación espacial (configuración *random*)

La tarea de *oasis maze* en configuración *random*, en breve consistió que el animal debía encontrar una recompensa, sin embargo en cada ensayo esta recompensa cambiaba de posición, de este modo el animal no podía utilizar su capacidad de memoria para resolver la tarea, sino que el éxito relativo estaba determinado solamente por sus capacidades de navegación.

Promedio de errores: En la regresión lineal no hubo un cambio significativo en los tres grupos en estudio en relación a los ensayos consecutivos, indicando ausencia de aprendizaje, como es de esperar en esta configuración de la tarea., Scramble (pendiente= 0,190; P= 0,12; $R^2= 0,17$), FUX 46 (pendiente= 0,009; P= 0,93; $R^2= 0,0004$) y FUX 47 (pendiente= 0,319; P= 0,18; $R^2= 0,13$), (Fig. 7a-c).

Razón de distancia: En la regresión lineal no hubo un cambio significativo en los tres grupos en estudio en relación a los ensayos consecutivos, indicando ausencia de aprendizaje, como es de esperar en esta configuración de la tarea. Scramble (pendiente= -0,084; P= 0,52; $R^2= 0,03$), FUX 46 (pendiente= -0,065; P= 0,69; $R^2= 0,01$) y FUX 47 (pendiente= -0,002; P= 0,99; $R^2= 8,9*10^{-6}$), (Fig. 8a-c).

Distancia total recorrida: En la regresión lineal no hubo diferencia entre los tres grupos en estudio durante los ensayos consecutivos, indicando ausencia de aprendizaje como es esperable en esta configuración de la tarea. Scramble (pendiente= 6,346; P= 0,34; $R^2= 0,06$), FUX 46 (pendiente= -6,718; P= 0,40; $R^2= 0,05$) y FUX 47 (pendiente= -11,63; P= 0,56; $R^2= 0,02$), (Fig.9 a-c).

Latencia: La regresión lineal no demostró un cambio significativo en los tres grupos en estudio en relación a los ensayos consecutivos, indicando ausencia de

aprendizaje. Scramble (pendiente= -0,267; P= 0,49; R²= 0,03), FUX 46 (pendiente= -0,243; P= 0,57; R²= 0,02) y FUX 47 (pendiente= -0,168; P= 0,80; R²= 0,004), (Fig.10 a-c).

Un resumen de estos resultados puede verse más adelante en la tabla 2.

Resultados adicionales posteriores a la evaluación de memoria

Velocidad en actividad:

Los promedio de velocidad en actividad de cada ratón durante la tarea de memoria espacial en configuración de aprendizaje fueron analizados como control de la actividad motora para descartar un déficit neurológico de carácter motor en los grupos que pudiese alterar o modificar la interpretación de los resultados. Se expresaron los valores como promedios \pm desviaciones estándar, no existiendo diferencias significativas entre grupos a excepción del grupo Scramble que navegó más rápido que FUX 47 (P= 0,037), ANOVA de una vía y análisis *post hoc* de comparación múltiple de Tukey (Fig. 11).

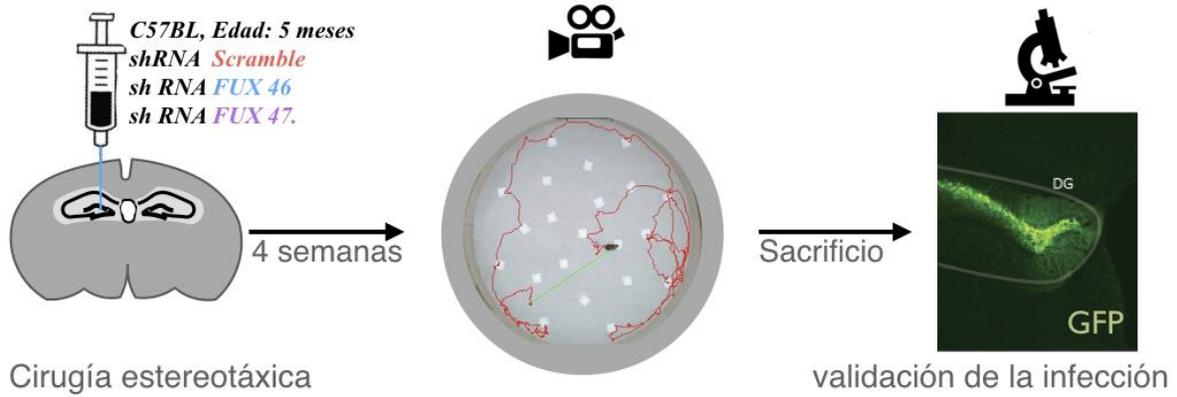
Validación de la infección:

Los resultados de aprendizaje y memoria previamente descritos corresponden solo a los animales que demostraron infección satisfactoria de los giro dentado de sus hipocampos según como se describe en la metodología (Fig. 12). A excepción del grupo WT, el cual no fue sometido a infección.

Infección no produce aumento significativo de apoptosis:

Estudio con inmunofluorescencia contra caspasa 3 clivada realizados en rebanadas de hipocampo infectados con los lentivirus descartaron un aumento de la muerte celular asociada a la infección. N=3, (Fig. 13).

Figuras



DÍA 1 PRE- ENTRENAMIENTO	DÍA 2 PRE- ENTRENAMIENTO	DÍA 3 ENTRENAMIENTO ESPACIAL	DÍA 4 ENTRENAMIENTO <i>RANDOM</i>
POCILLOS CON RECOMPENSA: 50%	POCILLOS CON RECOMPENSA: 25%	1 POCILLO CON RECOMPENSA Posición no cambia entre ensayos	1 POCILLO CON RECOMPENSA Posición cambia entre ensayos
2 ENSAYOS (5 MIN.) 20 min. Entre ensayos	2 ENSAYOS (5 MIN.) 20 min. Entre ensayos	15 ENSAYOS (1 MIN.) 15-30 seg. entre ensayos	15 ENSAYOS (1 MIN.) 15-30 seg. entre ensayos

privación de agua 24 h. antes de cada prueba, luego de cada prueba beben *ad-libitum* por 1 h.

Fig. 1. Construcción del experimento y protocolo de *oasis maze*.

RD= 34,8

RD= 10,9

RD= 3,1

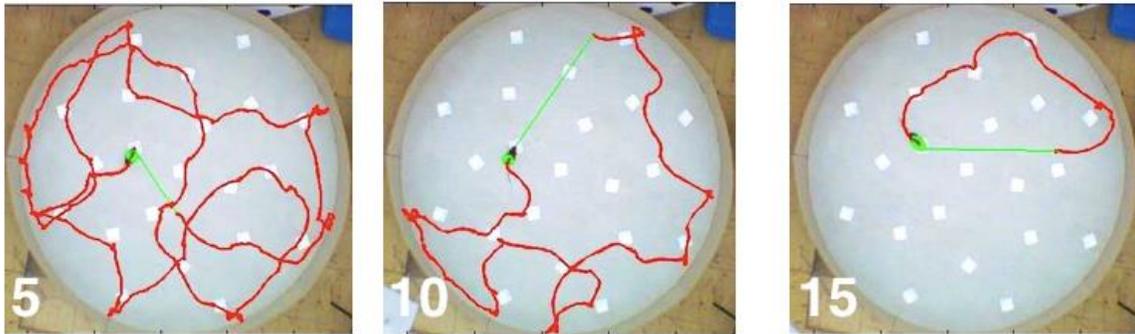


Fig. 2. Representación de la tarea de memoria espacial. Ejemplo de uno de los ratones del grupo control Scramble del estudio durante la configuración aprendizaje espacial. El aprendizaje esta representado por una menor razón de distancia (RD) a través de ensayos consecutivos. La distancia esperada y experimental están graficadas sobre el *oasis maze* (línea verde y roja respectivamente) .

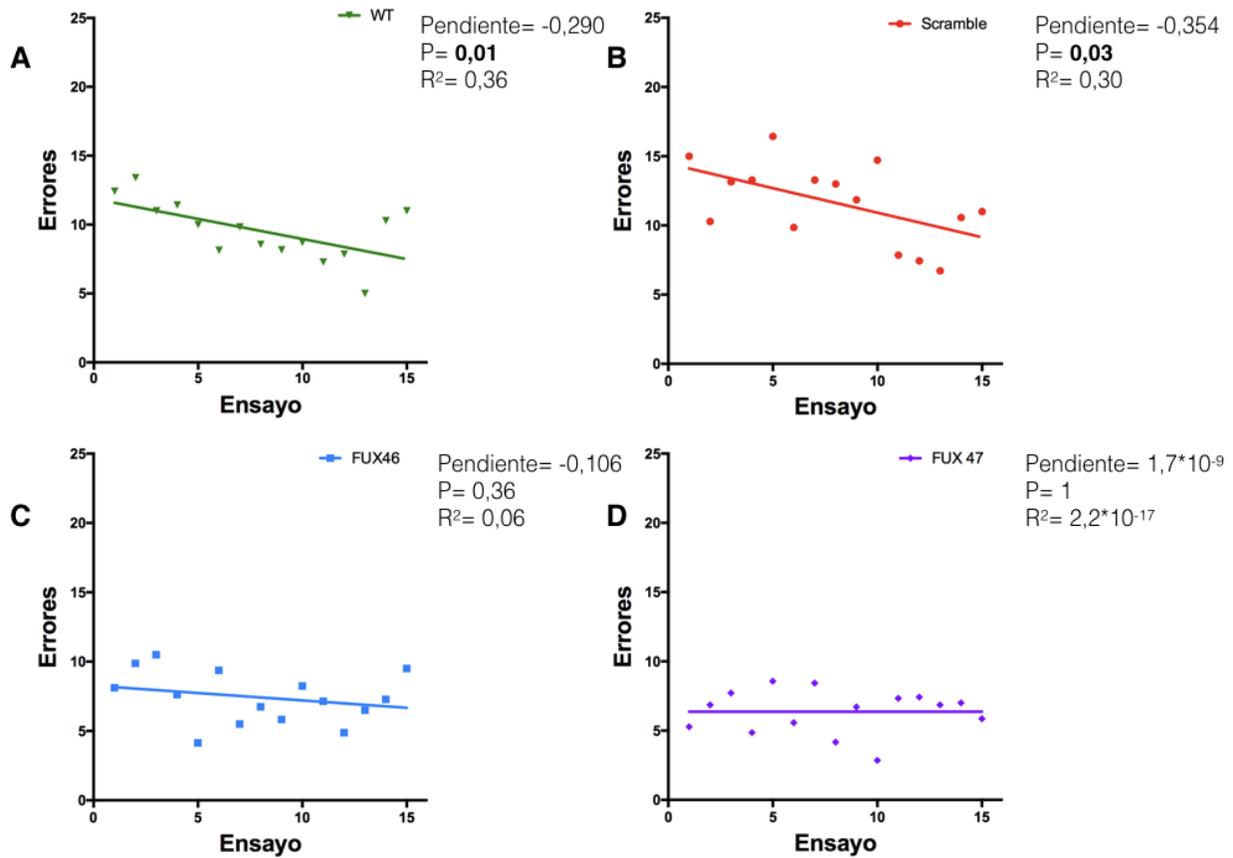


Fig. 3: Resultados tarea de memoria espacial: Promedio de errores. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A-B): Tanto los grupos WT como Scramble presentan aprendizaje (determinado por una pendiente negativa significativa). C-D): Los grupos interferente FUX 46 y 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en la esquina superior derecha de cada gráfico (WT n=7; Scramble n=8; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

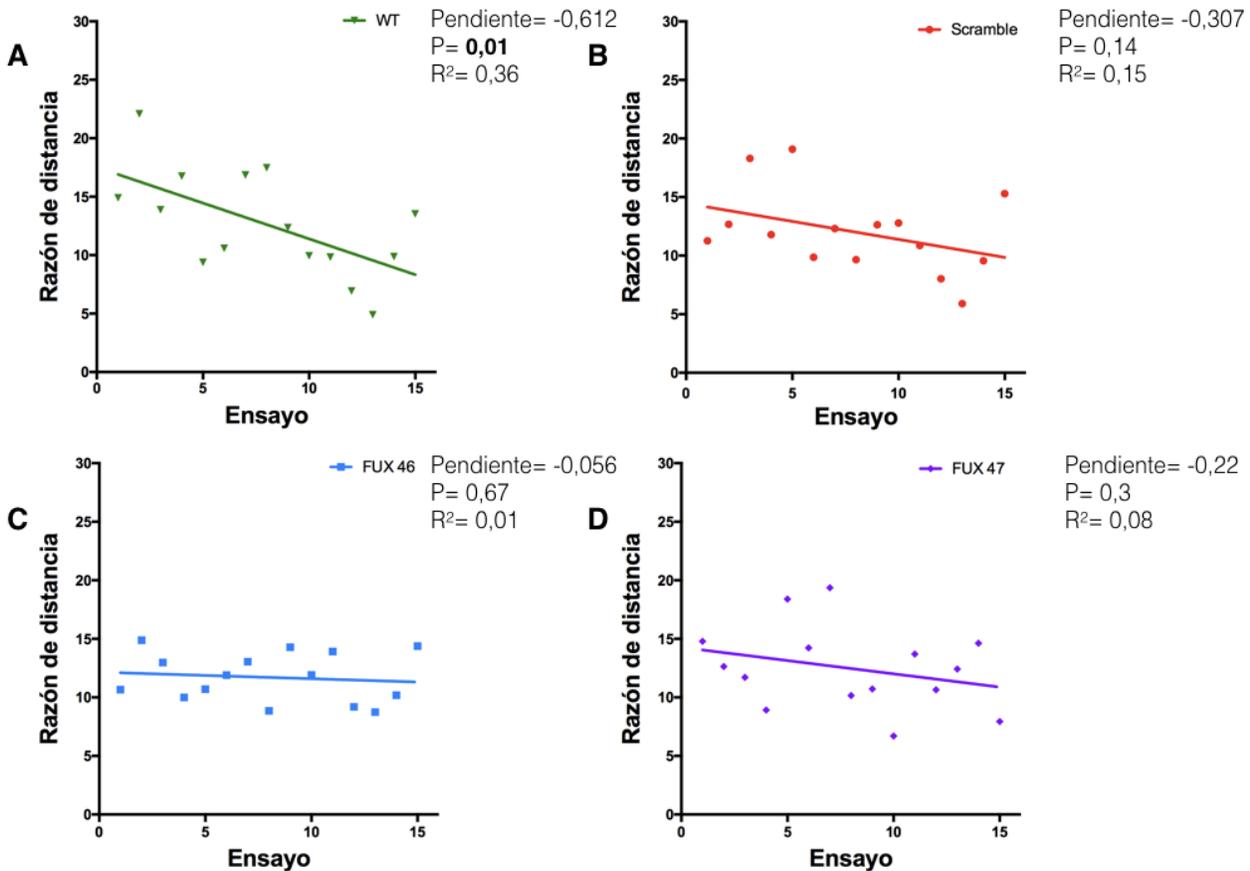


Fig. 4: Resultados tarea de memoria espacial: Razón de distancia. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A): El grupo WT presenta aprendizaje (determinado por una pendiente negativa significativa). B-D): Los grupos Scramble; interferente FUX 46 y FUX 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en la esquina superior derecha de cada gráfico (WT n=7; Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

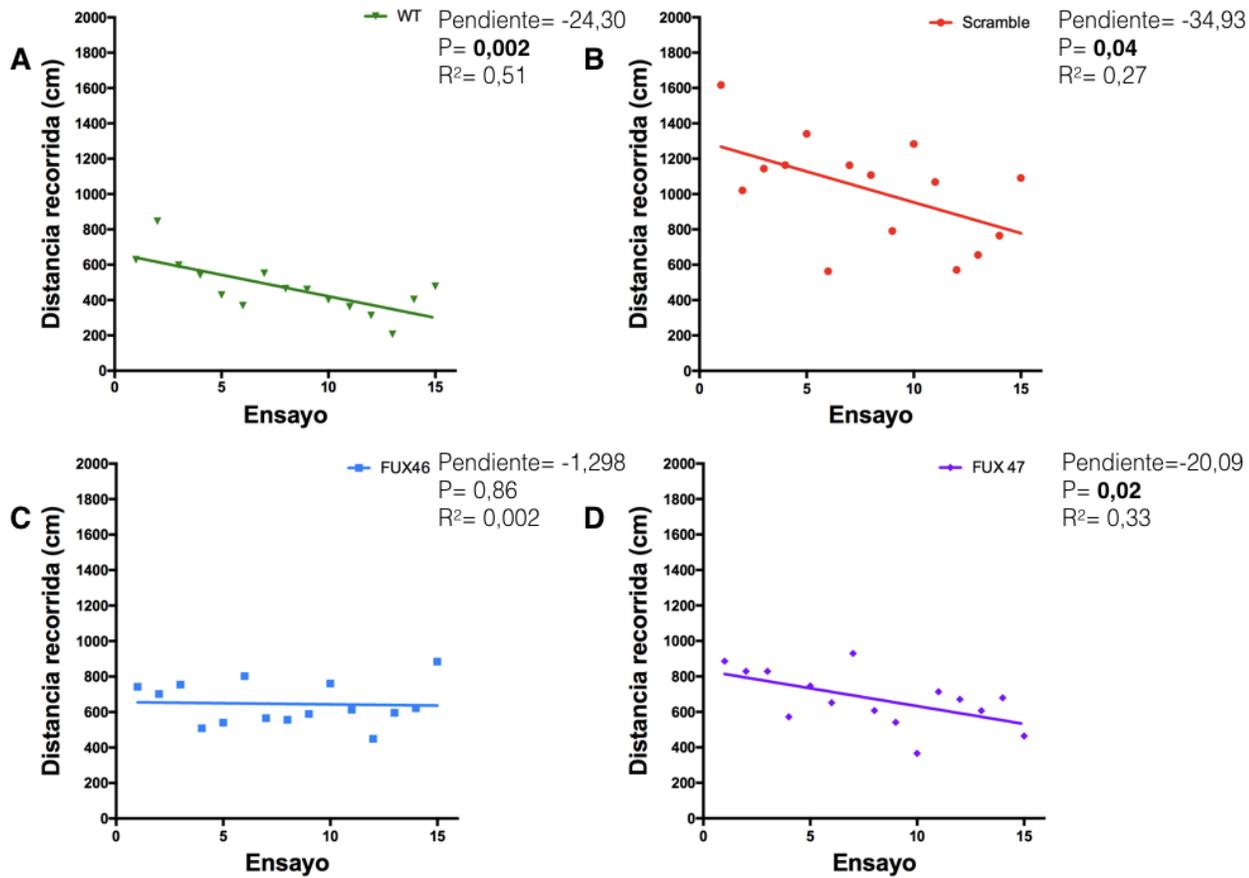


Fig. 5: Resultados tarea de memoria espacial: Distancia recorrida. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A- B y D): Tanto los grupos WT, Scramble y FUX 47 presentan aprendizaje (determinado por una pendiente negativa significativa). C): El grupo interferente FUX 46 no presenta un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en la esquina superior derecha de cada gráfico. (WT n=7; Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

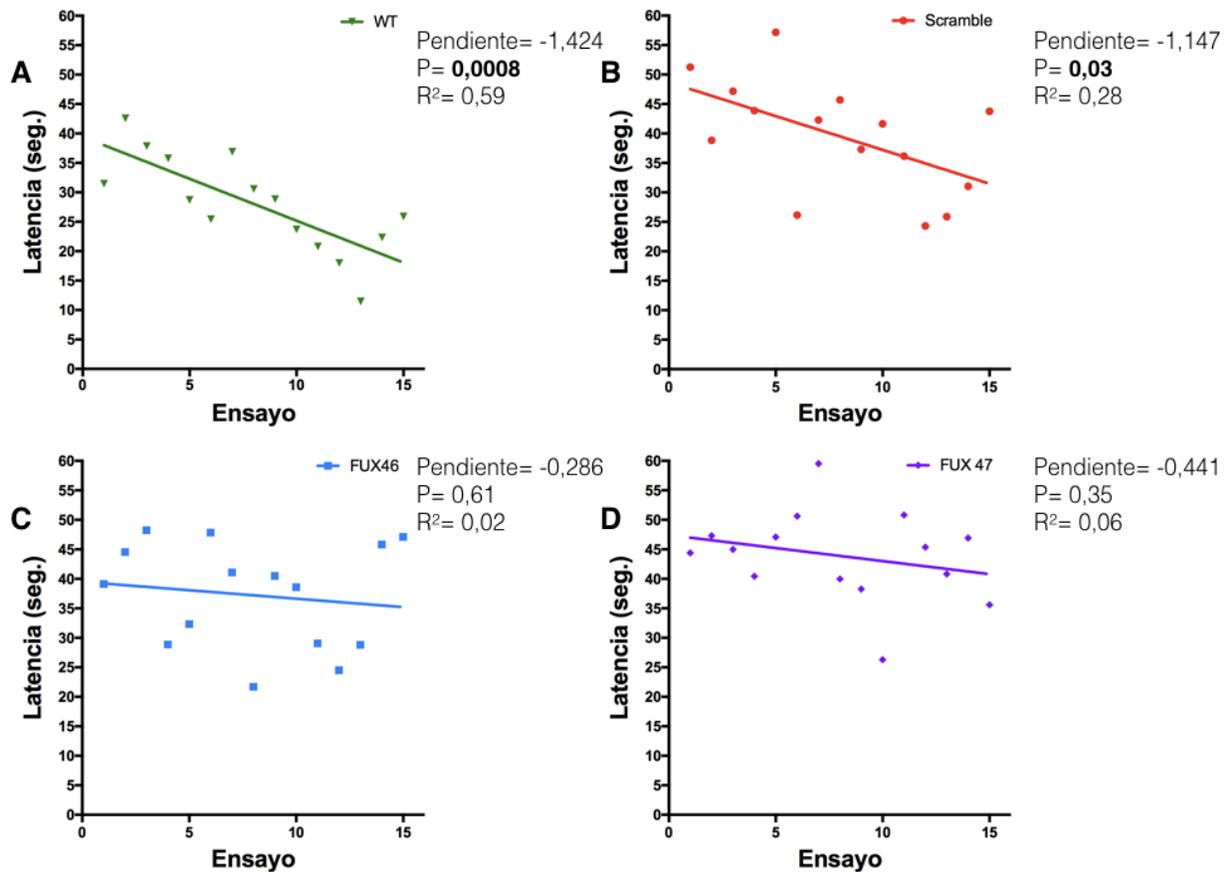


Fig. 6: Resultados tarea de memoria espacial: Latencia. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A-B): Tanto los grupos WT como Scramble presentan aprendizaje (determinado por una pendiente negativa significativa). C-D): Los grupos interferente FUX 46 y 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en la esquina superior derecha de cada gráfico (WT n=7; Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

	WT	Scramble	FUX 46	FUX 47
Errores	P= 0,01; R²= 0,36	P= 0,03; R²= 0,30	P= 0,36; R ² = 0,06	P= 1,00; R ² = 2,2*10 ⁻¹⁷
Razón de distancia	P= 0,01; R²= 0,36	P= 0,14; R ² = 0,15	P= 0,67; R ² = 0,01	P= 0,3; R ² = 0,08
Distancia recorrida	P= 0,002; R²= 0,51	P= 0,04; R²= 0,27	P= 0,86; R ² = 0,002	P= 0,02; R²= 0,33
Latencia	P= 0,0008; R²= 0,59	P= 0,03; R²= 0,28	P= 0,61; R ² = 0,02	P= 0,35; R ² = 0,06

Tabla 1: Resumen de resultados de la tarea de memoria espacial: Se describe los valores de P y coeficiente de determinación (R^2) de las variables evaluadas por grupo. El grupo control WT presenta pendientes negativas significativas en todas las variables evaluadas. El grupo control Scramble presenta pendientes negativas significativas en 3 de 4 variables y el grupo interferente FUX 47 en 1 de 4 variables. Por otra parte, el grupo interferente FUX 46 no presenta una pendientes negativas en las variables estudiadas. Valor en negrita indica significancia estadística.

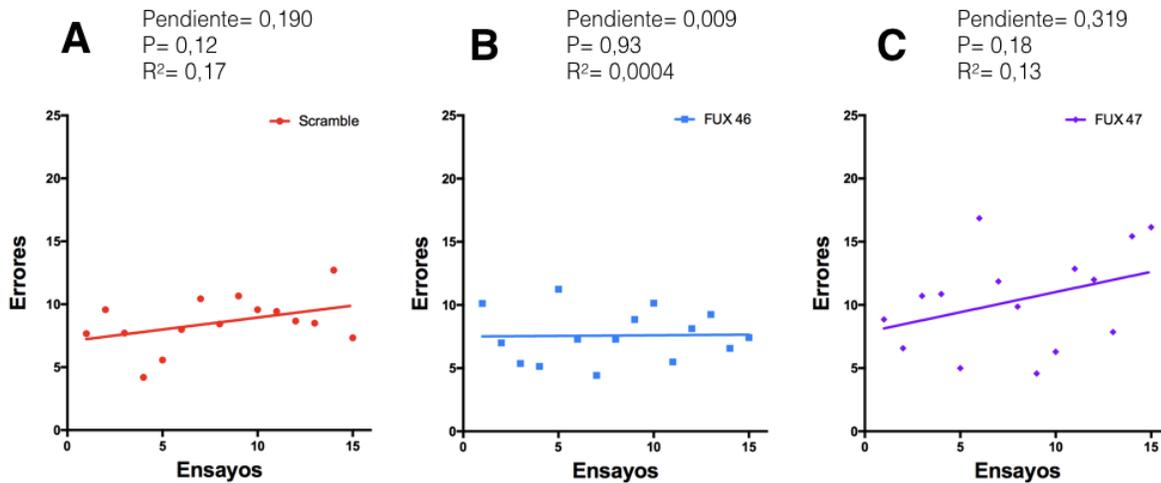


Fig. 7: Navegación espacial modalidad *random*: Promedio de errores. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A-C): Tanto los grupos Scramble, FUX 46 y FUX 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en el borde superior de cada gráfico (Scramble n=7; FUX 46 n=8; FUX 47 n=7)

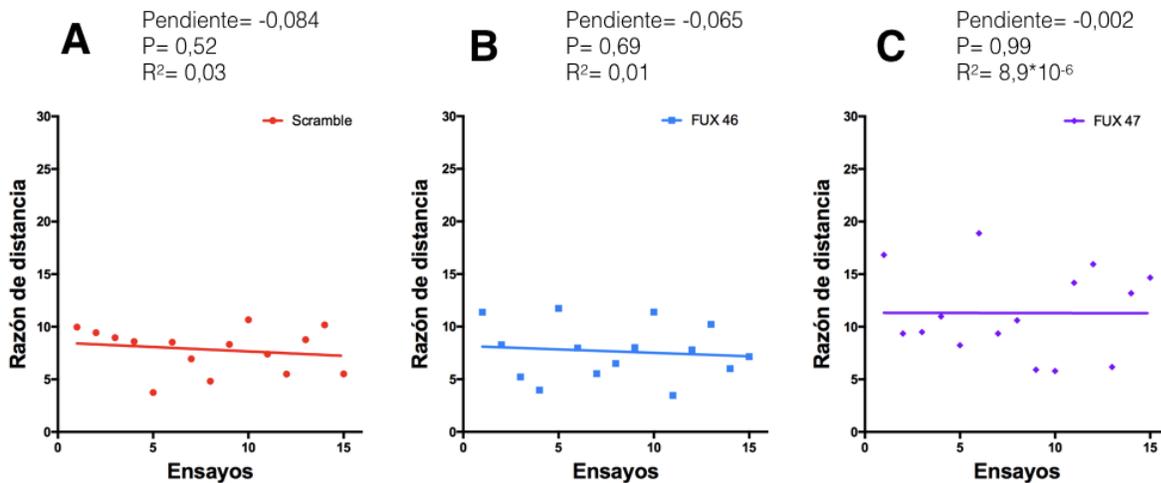


Fig. 8: Navegación espacial modalidad *random*: Razón de distancia. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A-C): Tanto los grupos Scramble, FUX 46 y FUX 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en el borde superior de cada gráfico (Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

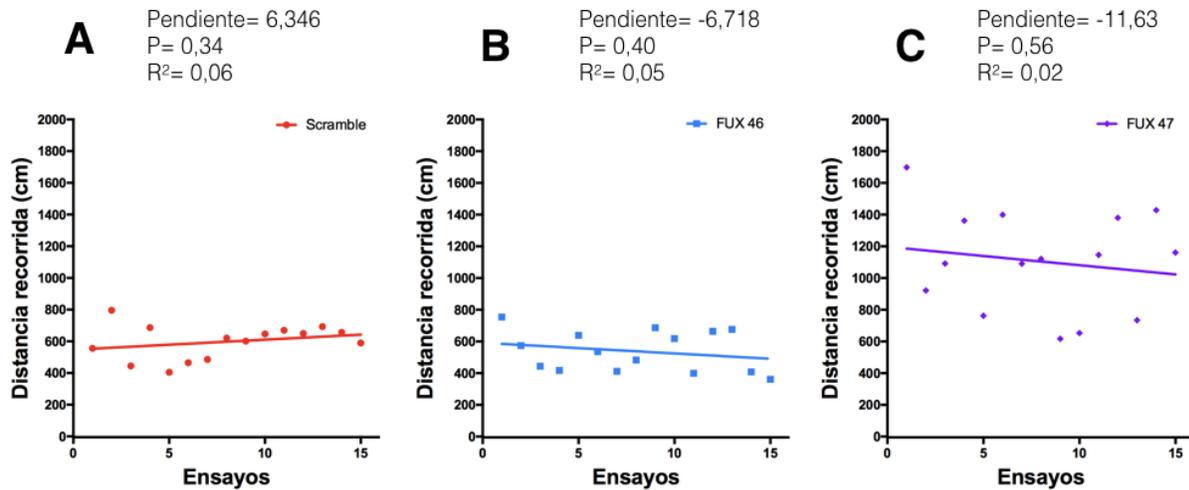


Fig. 9: Navegación espacial modalidad *random*: Distancia recorrida. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A-C): Tanto los grupos Scramble, FUX 46 y FUX 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en el borde superior de cada gráfico (Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

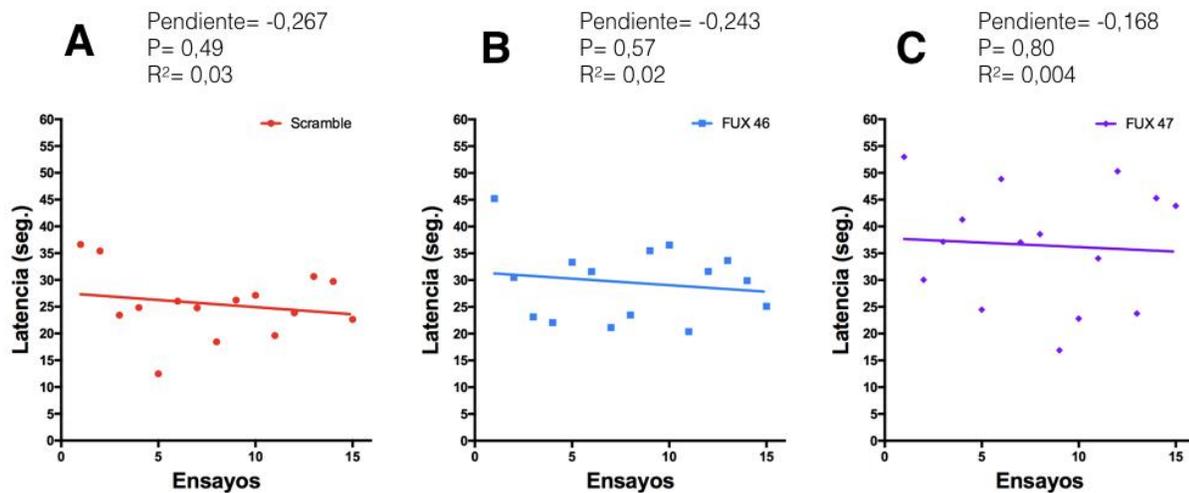


Fig. 10: Navegación espacial modalidad *random*: Latencia. Regresión lineal de los promedios por ensayo de los grupos en estudio para evaluar progreso en ensayos consecutivos. A-C): Tanto los grupos Scramble, FUX 46 y FUX 47 no presentan un resultado compatible con aprendizaje. Valor en negrita indica significancia estadística= $P \leq 0,05$. Los valores de la pendiente, valor P y coeficiente de determinación (R^2) por grupo se muestran en el borde superior de cada gráfico (Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

	Scramble	FUX 46	FUX 47
Errores	P= 0,12; R ² = 0,17	P= 0,93; R ² = 0,0004	P= 0,18; R ² = 0,13
Razón de distancia	P= 0,52; R ² = 0,03	P= 0,69; R ² = 0,01	P= 0,99; R ² = 8,9*10 ⁻⁶
Distancia recorrida	P= 0,34; R ² = 0,06	P= 0,40; R ² = 0,05	P= 0,56; R ² = 0,02
Latencia	P= 0,49; R ² = 0,03	P= 0,57; R ² = 0,02	P= 0,80; R ² = 0,004

Tabla 2: Resumen de resultados de navegación espacial modalidad *random*: Se describe los valores de P y coeficiente de determinación (R²) de las variables evaluadas por grupo. Tanto el grupo Scramble como los grupos interferentes FUX 46 y FUX 47 presenta pendientes negativas significativas en las variables estudiadas. Valor en negrita indica significancia estadística.

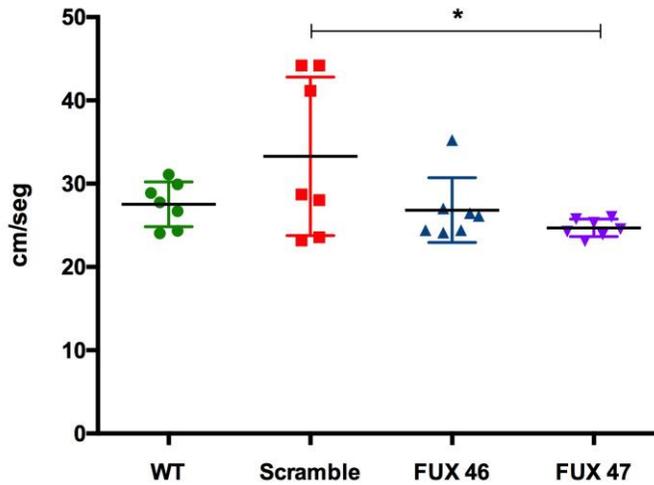


Fig. 11: Control de velocidad en actividad durante entrenamiento espacial: Se expresan los valores como dispersión de promedios \pm Desviaciones estándar en cm/seg. Scramble vs FUX 47 ($P= 0,037$), ANOVA de una vía y análisis *post hoc* de comparación múltiple de Tukey. * = $P \leq 0,05$. (WT n=7; Scramble n=7; FUX 46 n=7; FUX 47 n=7)

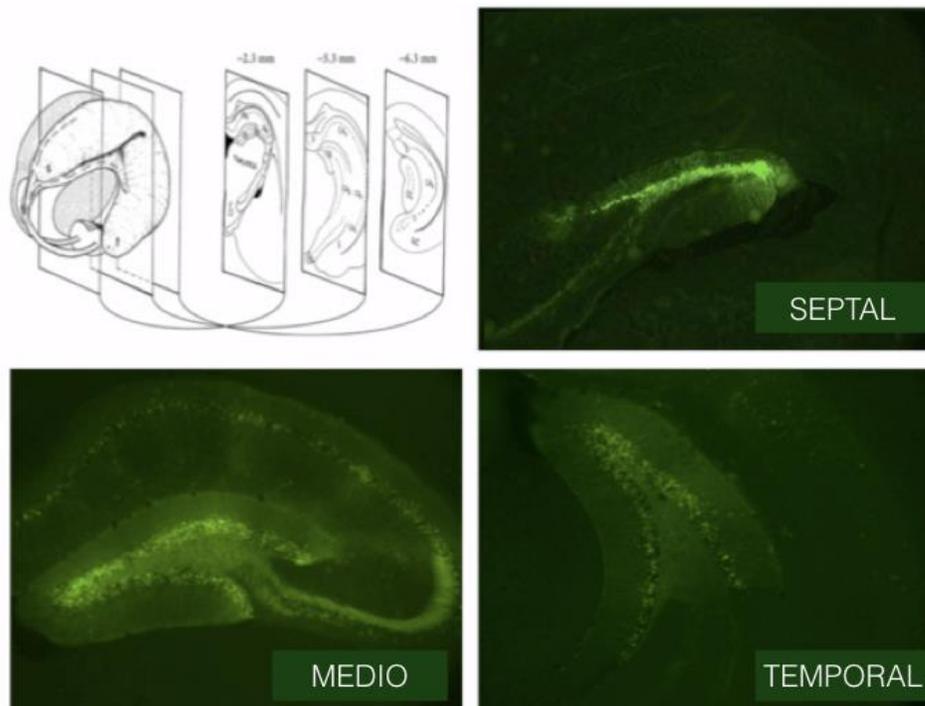


Fig. 12. Validación de la infección en giro dentado de hipocampo inyectado. Patrón de expresión de GFP en diferentes cortes consecutivos de hipocampo derecho de un animal inyectado con FUX 46 demostrando infección satisfactoria.

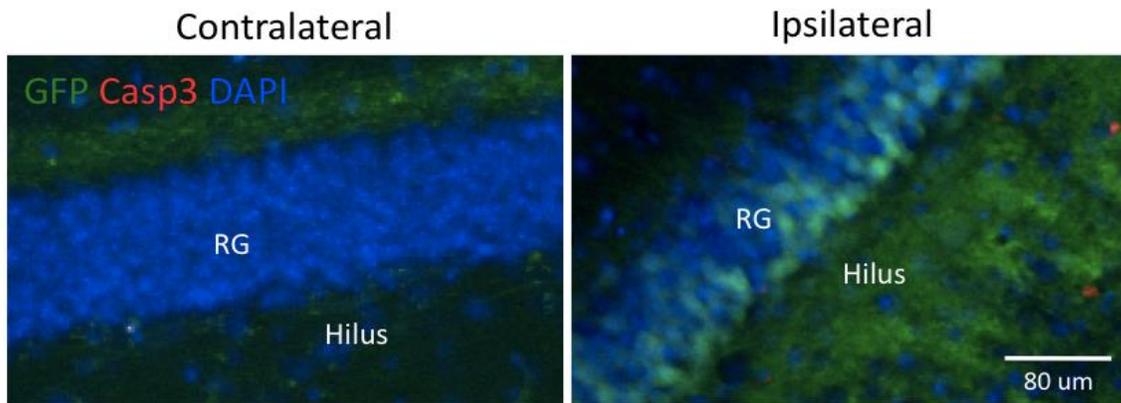


Fig. 13. Apoptosis en los hipocampos infectados por lentivirus con interferente. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa 3 clivada en hipocampos infectados. Experimento en triplicado. (RG: Región granular; Casp3: caspasa 3 clivada) (Salech, *et al.* en revisión)

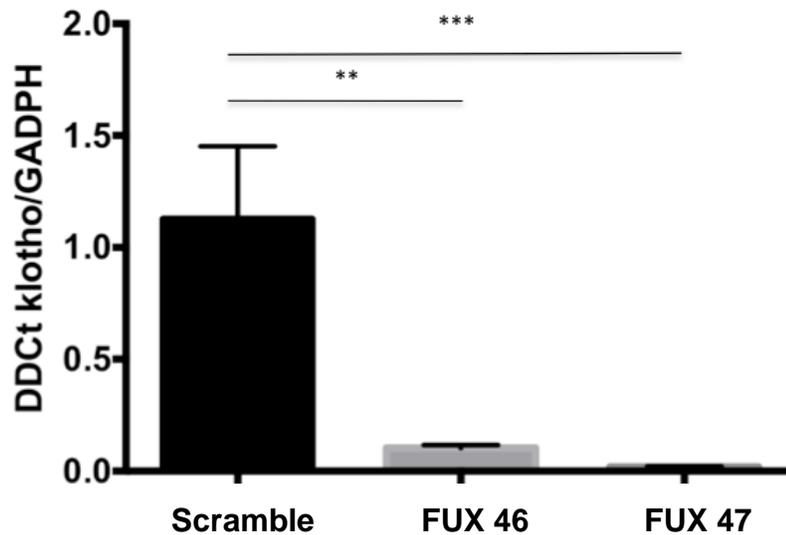


Fig. S1. Cambio de expresión del gen *klotho* por rtPCR en hipocampo infectado por lentivirus Scramble, FUX 46 y FUX 47. Relación klotho/GADPH en los hipocampo infectados de los tres grupos en estudio expresado como medias \pm Desviación estándar. n=4 por grupo, Mann Whitney, **: P= 0,028. (Salech, *et al.* en revisión)

Conclusiones

En conjunto los resultados experimentales demuestran que la disminución de la expresión de *klotho* en hipocampo, particularmente en la región del giro dentado, tendría un efecto deletéreo significativo en el rendimiento del aprendizaje en la tarea de memoria espacial, *oasis maze*.

Durante la fase de aprendizaje espacial, el grupo control WT demostró un comportamiento de aprendizaje en las 4 variables exploradas, evidenciado por una pendiente negativa y significativa en los análisis de regresión lineal, como era de esperar para un grupo control. Pues a lo largo de los ensayos consecutivos el aprendizaje se asoció a menos errores, menos latencia, menos distancia recorrida y menor razón de distancia para completar la tarea. El grupo control Scramble demostró aprendizaje en 3 de las 4 variables, sugiriendo así una capacidad de aprendizaje conservada pero menor relativa al grupo WT. Esta situación parece razonable pues su hipocampo no está intacto, debido al procedimiento quirúrgico de inyección del vector lentiviral. Por el contrario, los grupos interferentes no presentaron un progreso significativo durante los ensayos consecutivos (a excepción de FUX 47 en una sola variable: distancia recorrida) demostrando así un marcado deterioro en su capacidad de aprendizaje espacial en prácticamente todas las medidas realizadas comparado con los grupos controles y Scramble (Tabla 1).

Durante la fase *random* de la prueba, que tiene como objetivo medir las capacidades de navegación del animal sin un componente de memoria, se perdió de forma predecible las diferencias significativas entre todos los grupos (Scramble, FUX 46 y FUX 47). Perdiéndose así también, la ventaja del grupo control Scramble por sobre los interferentes en cuanto a aprendizaje (Tabla 2). Esto era esperable de acuerdo con nuestra hipótesis ya que la prueba en esta configuración permite evaluar como navegan los animales y no como aprenden.

Cabe señalar que la eficiencia de los interferentes de *klotho* es levemente distinta, siendo el interferente FUX 47 el de mayor efectividad. Esta diferencia de efecto de los interferentes de *klotho* fue evaluada por nuestro laboratorio,

mediante rtPCR comprobando que este interferente genera una disminución de la expresión hipocampal de *klotho* mayor en relación al marcador control GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) que el interferente FUX 46, durante las primeras pruebas de infección, (Salech, *et al.*, en revisión), (Fig. S1). El desempeño levemente distinto de los grupos de animales con estos interferentes es un hallazgo nuevo del análisis de los resultados y podría indicar un efecto interferente dependiente, donde el grado de interferencia de *klotho* en hipocampo derecho afecta la capacidad de aprendizaje y la interferencia mayor podría sumar además mecanismos compensatorios no previstos.

Si bien, el desarrollo de esta tesis no se centra experimentalmente en los mecanismos por los cuales *Klotho* tendría relevancia en los procesos de memoria, estos resultados en el rendimiento podrían, en experimentos posteriores, demostrar que *Klotho* ejerce un efecto modulador sobre mecanismos de la funcionalidad hipocampal, como por ejemplo, la neurogénesis del adulto a nivel de giro dentado, pues está demostrado que existe expresión local de *Klotho* en neuronas del giro dentado (Li *et al.*, 2010; Clinton, *et al.*, 2013; Salech, *et al.*, en revisión), como también hay evidencia que esta proteína interfiere con vías de señalización promotoras de neurogénesis como IGF1-insulina /IGFR (Kurosu, *et al.*, 2005; Wolf, *et al.*, 2008), Wnt (Liu, *et al.*, 2007) y FGFR (Urakawa, *et al.*, 2006). Por otra parte, nuestra aproximación experimental ya ha sido demostrada previamente para evaluar posibles cambios en neurogénesis mediante pruebas conductuales equivalentes (Drapeau, *et al.*, 2003; Sahay, *et al.*, 2011; Kesner, 2013), sin embargo, una confirmación mediante caracterización molecular de neurogénesis por marcadores como BrdU (Miller & Nowakowsky, 1988; Taupin, 2007), Doublecortin (Brown, *et al.*, 2003) y/o Ki-67 (Kee, *et al.*, 2002) de los tejidos de los ratones inyectados podría ser una etapa complementaria adecuada para fortalecer esta idea.

Otro mecanismo descrito, mediante el cual la actividad de *Klotho* podría tener un rol sobre el comportamiento, son los hallazgos de mayores niveles de la subunidad GluN2B del receptor NMDA en el hipocampo de ratón que sobreexpresa *Klotho* (Dubal, *et al.*, 2014), los niveles de esta subunidad ya han sido

relacionados a mayor plasticidad sináptica y rendimiento en memoria espacial en ratón (Zhao, *et al.*, 2009). Y bajo este mismo principio es esperable alteraciones de carácter electrofisiológicos que modifiquen la capacidad de generar procesos de plasticidad sináptica como LTP (Dubal, *et al.*, 2014).

Por último la evidencia reciente de la presencia de Klotho en las membranas pre y post sinápticas en hipocampo (Li, *et al.* 2017) podría guiar el descubrimiento de un rol de esta proteína en la microestructura de las redes neuronales en sí. Sin embargo no podemos descartar un efecto conjunto de las hipótesis aquí expuestas o de nuevos mecanismos por descubrir.

Limitaciones experimentales que pueden interferir con la interpretación de los resultados

Uno de los puntos críticos para la validez de los resultados aquí descritos es que los animales no presenten diferencias propias de un deterioro neurológico, ya sea por la cirugía estereotáxica o la infección lentiviral. Para controlar esta situación es que medimos y analizamos las velocidades en actividad de todos los animales durante la tarea de memoria espacial. Considerando al grupo control sin inyección (WT) como el estándar a comparar, ningún grupo se desempeñó más lento que el WT demostrando no existir un déficit motor debido a las intervenciones. Sin embargo, el grupo control Scramble presentó una velocidad significativamente mayor vs el grupo interferente FUX 47. Al revisar los datos de los animales individualmente fue evidente que el efecto está determinado por los últimos 3 animales incorporados al grupo, pertenecientes a un bioterio distinto del resto de los animales (causando además una evidente mayor dispersión de los datos (Fig. 10) pudiendo ser un efecto ya sea individual que interaccione con el sitio de inyección de la cirugía estereotáxica, con la intensidad de la infección, la actividad del interferente u otro factor desconocido que no pudo ser filtrado por nuestro esquema de validación de la infección, test conductuales adicionales pueden ser considerados como por ejemplo navegación espontánea de estos animales o grado de ansiedad de estos animales medidos por pruebas tales como

un *open field test* o *elevated plus maze* que indiquen una actividad locomotora de base mayor en estos animales. Sin embargo estos 3 animales aun cuando parecen navegar más rápido presentan de igual forma capacidad de memoria similares al resto de los animales control.

Inyección unilateral en hipocampo derecho

Los estudios habituales de disfunción hipocampal se realizan mediante lesión bilateral, sin embargo creemos que nuestro esquema no es una debilidad experimental pues, por un lado pudimos demostrar un efecto significativo sobre el aprendizaje y la memoria, controlado no solo con los grupos WT y Scramble si no también por la configuración *random* del experimento al cual se sometieron exactamente los mismos animales de la configuración de aprendizaje espacial. Por otra parte existe la evidencia de lateralización derecha de las funciones en navegación espacial del hipocampo de ratón (Shinohara, *et al.* 2012) y rata (Klur, *et al.* 2009) lo cual apoya nuestro diseño experimental. Adicionalmente la observación de alteraciones cognitivas solo modificando la expresión de Klotho en un hemisferio hipocampal sugiere lo relevante que es este gen para el correcto funcionamiento de esta estructura.

Y por último la inyección unilateral de hipocampo se traduce en rebanadas de cerebro del mismo animal donde su hipocampo contralateral puede servir de control dentro del individuo, generando así un *stock* de muestras con evidente potencial para continuar la investigación en búsqueda de una explicación celular o molecular de los efectos conductuales demostrados por esta tesis.

Contribución y proyección

La presente investigación ha demostrado como la disminución de la expresión de Klotho de forma local en el hipocampo derecho es suficiente para producir un deterioro significativo en el desempeño en memoria espacial en ratones adultos. Esto pone de manifiesto que la presencia de Klotho es

fundamental para el correcto desempeño del hipocampo en aprendizaje espacial. Nuestros resultados contrastan con los estudios en la literatura actual que han centrado su atención en modelos de sobre o sub expresión sistémica de Klotho, esto vuelve al presente estudio una aproximación no descrita que contribuye plenamente con los esfuerzos actuales por descubrir el verdadero rol de Klotho en el sistema nervioso y particularmente el hipocampo, una estructura ampliamente reconocida por su rol en procesos de memoria y alteraciones cognitivas relacionadas con el envejecimiento.

Bibliografía

Anamizu, *et al.*, 2005. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. *Acta Neuropathol*, 109: 457-466

Andrukhova, *et al.*, 2012. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*. 51, 621-628

Anour, *et al.*, 2012. Klotho lacks a vitamin D independent physiological role in glucose homeostasis, bone turn-over, and steady-state PTH secretion in vivo. *PLoS One*. 7, e31376

Arking, *et al.*, 2002. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 2, 856-861

Arking, *et al.*, 2003. KLOTTHO Allele Status and the Risk of Early-Onset Occult Coronary Artery Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72:1154–1161

Banerjee, *et al.*, 2013. Klotho Ameliorates Chemically Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling. *Cell Physiol Biochem*; 31:659-672

Bartke, 2006. Long-lived Klotho mice: new insights into the roles of IGF-1 and insulin in aging. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. Vol.17 No.2, 33-35

Bektas, *et al.*, 2004. Klotho gene variation and expression in 20 inbred mouse strains. *Mamm Genome*.15(10):759-67

Carpinelli, *et al.*, 2011. Vitamin D-deficient diet rescues hearing loss in Klotho mice. *Hearing Research*. 275, 105-109

Cha, *et al.*, 2008. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 105, no. 28, 9805–9810

Cha, *et al.*, 2009. Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K⁺ Excretion by Klotho. *Mol Pharmacol.* 76(1):38-46

Chen, *et al.*, 2007. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104 no. 50, 19796–19801

Chen, *et al.*, 2013. The anti-aging protein klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the central nervous system. *J Neurosci* . 33(5): 1927–1939

Clark, *et al.*, 2005. Hippocampus and Remote Spatial Memory in Rats. *Hippocampus.* 15(2): 260–272

Clinton, *et al.*, 2013. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Research.* 1527, 1-14

Crawley, 1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Research.* 835, 18–26

Deary, *et al.*, 2005. KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals. *Neuroscience Letters.* 378, 22–27

Dubal, *et al.*, 2014. Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep.* 7(4): 1065-1076

Dubal, *et al.*, 2015. Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. *J. Neurosci.* 35, 2358-2371

Eichenbaum, 2017. The role of the hippocampus in navigation is memory. *J. Neurophysiol.* doi: 10.1152/jn.00005.2017

German, *et al.*, 2012. Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein. *Neurobiology of Aging.* 33, 1483.e25–1483.e30

Goetz, *et al.*, 2012. Conversion of a paracrine fibroblast growth factor into an endocrine fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 287, 29134-29146

Good, 2002. Spatial Memory and Hippocampal Function: Where are we now?. *Psicológica.* 23 (1), 109-138

Gotow, 2008. Neurons in the Klotho Mutant Mouse Show Biochemical and Morphological Characteristics Resembling Age-Related Disorders. *TZU CHI MED J.* Vol. 20, No. 3, 155- 159

Hitti & Siegelbaum, 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature.* 508, 88-92

Hu, *et al.*, 2011. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 124-136

Hunsaker, 2012. The Importance of Considering all Attributes of Memory in Behavioral Endophenotyping of Mouse Models of Genetic Disease. *Behav Neurosci.* 126(3): 371–380

Hunsaker & Kesner, 2008. Evaluating the Differential Roles of the Dorsal Dentate Gyrus, Dorsal CA3, and Dorsal CA1 During a Temporal Ordering for Spatial Locations Task. *Hippocampus*.18(9): 955–964

Ikushima, *et al.*, 2006. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 827–832

Imura, *et al.*, 2004. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Letters*. 565, 143–147

Ito, 2013. Frontiers of Model Animals for Neuroscience: Two Prosperous Aging Model Animals for Promoting Neuroscience Research. *Exp. Anim.* 62(4), 275–280

John, *et al.*, 2011. Role of Klotho in Aging, Phosphate Metabolism, and CKD. *Am J Kidney*. 58(1):127-134

Kamemori, *et al.*, 2002. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res* 171: 103-110

Kesner, 2013. An analysis of the dentate gyrus function. *Behav Brain Res*. 254:1-7

Kirstetter, *et al.*, 2006. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* (10):1048-56

Kosakai, *et al.*, 2011. Degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons in klotho mouse related to vitamin D exposure. *Brain Research*. 1382, 109-117

Kuro-o, 2010. Klotho. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 459: 333–343

Kuro-o, *et al.*, 1997. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. Vol 390, 45-51

Kurosu, *et al.*, 2005. Suppression of Aging in Mice by the Hormone *Klotho*. *Science*. 309, 1829-1833

Kurosu, *et al.*, 2006. Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by *Klotho*. *J Biol Chem*. 281(10): 6120–6123

Lanske & Razzaque, 2007. Premature aging in *klotho* mutant mice: Cause or consequence?. *Ageing Research Reviews*. 6, 73–79

Li, *et al.*, 2004. Immunohistochemical Localization of *Klotho* Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. *Cell Structure and Function*, 29: 91-99

Li, *et al.*, 2010. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and *Klotho* gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17362-17367

Li, *et al.*, 2017. *Klotho* regulates CA1 Hippocampal synaptic plasticity, *Neuroscience*. 347. 123-133

Lindberg, *et al.*, 2014. The Kidney is the principal organ mediating *klotho* effects. *J. Am. Soc. Nephrol*. 25, 2169-2175

Liu, *et al.* 2007. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317, 803-806

Liu, *et al.*, 2006. Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 17: 1305–1315

Machado de Oliveira, 2006. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Letters* 580. 5753–5758

Majumdar, *et al.*, 2010. Association of the functional KL-VS variant of *Klotho* gene with early-onset ischemic stroke. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 403, 412–416

Manya, *et al.*, 2010. Antiaging research using *klotho* mice. *The Pharmaceutical Society of Japan*. 130(1) 2-9

Martin, *et al.*, 2012. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol. Rev.* 92, 131-155

Masso, *et al.*, 2015. Secreted and transmembrane alphaklotho isoforms have different spatio-temporal profiles in the brain during aging and Alzheimer`s disease progression. *PLoS One*. 10, e0143623

Masuda, *et al.*, 2005. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 126. 1274–1283

Matsumura, *et al.*, 1997. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*. 242, 626–630

Medina, 1999. Current life expectancy in Chile. *Rev. Med. Chil.* 127(6):637-8

Nagai, *et al.* 2003. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J.* ;17(1):50-2

Morris, *et al.*, 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297, 681-683

Papaconstantinou, 2009. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 299. 89–100

Paxinos & Franklin, 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3th Ed. Academic press. San Diego. California

Quinn, *et al.*, 2013. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, 310-320

Scheller, *et al.*, 2006. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nature Immunology* 7, 1037-1047

Schiller, *et al.*, 2015. Memory and Space: Towards an understanding of the cognitive map. *J. Neurosci.* 35(41): 13904-13911

Semba, *et al.*, 2014. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 558, 37–40

Sheng, *et al.*, 2012. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1; 4(5), 1-23

Shimada, *et al.*, 2004. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.* 113: 561–568

Shiozaki, *et al.*, 2008. Morphological and Biochemical Signs of age-related

Neurodegenerative Changes in Klotho Mutant Mice. *Neuroscience*. 152, 924–941

Shiraki-Iida, *et al.*, 1998. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Letters*. 424, 6-10

Small, *et al.*, 2011. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci*. 12(10):585-601

Urakawa, *et al.*, 2006. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, vol. 444, 770-4

Varela-Nallar & Inestrosa. 2013. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 7:100, 1-11

Wolf, *et al.*, 2008. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*, 27, 7094–7105

Wong, *et al.*, 2006. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Human Gene Therapy*. 17, 1-9

Xie, *et al.*, 2012. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat. Commun*. 3, 1238

Xie, *et al.*, 2013. Klotho Acts as a Tumor Suppressor in Cancers. *Pathol. Oncol. Res*. 19:611–617

Yokoyama, *et al.*, 2015. Variation in longevity gene KLOTHO is associated with greater cortical volumes. *Ann. Clin. Transl. Neurol*. 2, 215-230

Yokoyama, *et al.*, 2016. Systemic klotho is associated with *KLOTHO* variation and predicts intrinsic cortical connectivity in healthy human aging. *Brain Imaging and Behavior*. doi:10.1007/s11682-016-9598-2

Zhao, *et al.*, 2009. The effects of aging on n-methyl-d-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience* 162, 933–945