

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



**ROL DE KLOTHO EN LA REGULACION DE LA NEUROGENESIS
HIPOCAMPAL DEL ADULTO**

FELIPE SALECH MORALES

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

Director Clínico de Tesis: Prof. Dra María Isabel Behrens Pellegrino

Director Básico de Tesis: Prof. Dr. Andrés Couve Correa

2015

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

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

FELIPE SALECH MORALES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de Septiembre de 2015

Prof. Dr. Andrés Couve C.
Director Básico de Tesis
Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular
Biomedical Neuroscience Institute (BNI)
Facultad de Medicina Universidad de Chile

Prof. Dra Maria Isabel Behrens P.
Director Clínico de Tesis
Departamento de Neurología
Hospital Clínico Universidad de Chile
Facultad de Medicina Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Paola Morales

Prof. Dr. Victor Hugo Carrasco

Prof. Dr. Nivaldo Inestrosa

Prof. Dr. Manuel Kukuljan
Presidente Comisión de Examen

Para Daniela y Emilia, cuando tengan canas.

Agradecimientos

Todo el aprendizaje plasmado en esta tesis fue gracias a una red de personas que desde niño me han enseñado el valor de aprender a aprender. Hoy les quiero agradecer por eso.

En primer lugar a mi familia: a mi esposa Daniela y a mi hija Emilia, por todo el tiempo que dejamos de estar juntos por las exigencias del trabajo. A mis padres Gladys y Humberto por enseñarme el valor del trabajo, y a mi Nana y mis hermanas por su aliento constante.

A mis tutores de tesis María Isabel y Andrés por acogerme como un hijo durante este proceso. Por escucharme, por alentarme a explorar mi propio camino, y por enseñarme que ser ambicioso en su justa medida es un valor que mueve los límites de la humanidad.

A los miembros de la comisión revisora del proyecto, por poner altos grados de exigencia, por enseñarme el valor de ser riguroso en la búsqueda de la verdad. A cada uno, gracias por sus aportes, sin ellos esta tesis no habría sido posible.

A cada uno de los integrantes del laboratorio del Dr Couve y Dra Behrens, en especial a Daniela Ponce y Patricia Ayala, por su especial paciencia, dedicación y apoyo en el trabajo en el laboratorio.

A todos aquellos laboratorios externos que me abrieron sus puertas para compartir sus recursos y conocimientos, en especial al de los

profesores Dr. Luis Michea, Dra. Lorena Varela-Nallar y Dr. Claudio Hetz. A los Profesores extranjeros Dr. Theo Palmer, Dr. Nathan DeCarolis y Dr. Reinhard Erben, quienes casi sin conocerme abrieron generosamente las puertas de sus laboratorios con el único objetivo de hacer ciencia y educar.

Finalmente dar gracias a mi país, por financiar mi formación mediante programas de becas y fondos de investigación. En la innovación y el desarrollo está el futuro, Chile será tan grande como lo imaginemos y espero con lo aprendido durante esta tesis aportar en ese proceso.

Indice

Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Abreviaturas	13
Resumen	15
Abstract	18
Introducción	21
1. Envejecimiento, enfermedad y discapacidad:	21
1.1 Envejecimiento y deterioro cognitivo.....	22
2. Neurogénesis en el cerebro adulto.....	23
2.1 Regulación de la neurogénesis del adulto.....	26
2.1.1 Factores producidos localmente en el nicho.....	26
2.1.2 Factores solubles y la regulación de la neurogénesis hipocampal.....	28
3. Klotho.....	29
3.1 Klotho y Cerebro.....	31
3.2 Klotho, Wnt, y FGF2	33
3.3 Klotho y Células Progenitoras.....	36
3.4. Klotho y neurogénesis.....	36
Hipótesis	37
Objetivo General	37
Objetivos Específicos	37
Métodos	38
1.1 Determinar la expresión del transcrito klotho hipocampus de ratones adultos mediante PCR.....	38
Extracción del Hipocampo.....	38
Extracción de RNA.....	38
Tratamiento con DNAsa.....	39

Revisión Integridad RNA.....	39
Cuantificación de RNA.....	39
Trascrición Reversa.....	40
PCR convencional.....	40
Gel de PCR.....	41
1.2 Determinar la expresión de la proteína klotho mediante Western blot.....	41
Extracción de Proteína.....	41
Cuantificación de Proteína.....	41
Western blot.....	41
1.3 Precisar el sitio de expresión de klotho mediante IHQ.....	42
Obtención de rebanadas de tejido hipocampal.....	42
Inmunohistoquímica.....	43
1.4 Precisar el sitio de expresión de klotho mediante Inmunofluorescencia.....	44
Inmunofluorescencia en rebanadas de Hipocampo.....	44
1.5 Evaluar la estirpe celular que expresa klotho en el hipocampo adulto mediante IF.....	45
Cultivo primario de neuronas Hipocampales.....	45
Inmunofluorescencia en células en covers.....	46
1.6 Evaluar el cambio de expresión klotho en el hipocampo adulto asociado a la edad.....	47
Animales envejecidos.....	47
Biblioteca de tejidos.....	47
PCR en tiempo real.....	47
Validación del método de cuantificación por PCR tiempo Real.....	48

2.1 Evaluar la neurogénesis hipocampal en el cerebro del ratón	
deficiente de <i>klotho</i>	48
Animales deficientes de <i>klotho</i>	49
Preparación de los cerebros ratones deficientes de <i>klotho</i>	49
IF Ki67 y Dcx.....	49
Cuantificación de neurogénesis.....	50
2.2 Evaluar el efecto de la inhibición local de la expresión del gen <i>klotho</i> en el hipocampo sobre la neurogénesis en el giro dentado de ratones adultos.....	50
shRNA <i>klotho</i>	50
Subclonación de shRNA.....	51
Producción de partículas lentivirales.....	52
Concentración de Partículas Lentivirales.....	53
a) Concentración por PEG.....	53
b) Concentración por Ultracentrífuga.....	53
Titulación de partículas lentivirales.....	53
Estereotaxia.....	54
rtPCR en hipocampo total.....	55
Animales.....	55
Extracción de RNA, síntesis de cDNA y rtPCR.....	56
Perfusión y preparación de Tejidos.....	56
Tratamiento con BrdU.....	56
Perfusión y preparación de Tejidos.....	56
Inmunofluorescencia en tejidos.....	56
a) IF BrdU.....	56
Cuantificación de neurogénesis.....	57
3.1 Cultivos de progenitores hipocampales de ratón adulto.....	58

Técnica de Cultivo de progenitores hipocampales de ratón adulto.....	58
3.2 Estimulo klotho recombinante.....	59
Inmunofluorescencia Nestin - BrdU.....	59
Cuantificación proliferación.....	60
Bioética.....	60
Estadística.....	60
Resultados	61
Objetivo experimental 1: Caracterización de la Expresión de klotho en el hipocampo de ratones adulto.....	61
1.1 Expresión del transcrito y la proteína klotho en hipocampos de ratones adultos.....	61
1.2 Localización de la expresión de hipocampal de Klotho mediante inmunohistoquímica en ratones adultos.....	61
1.3 Tipos celulares que expresan klotho en el hipocampo.....	62
1.4 Cambio en la expresión de klotho en el hipocampo asociado a la edad.....	63
Objetivo experimental 2: Evaluar el efecto de la pérdida de función local y sistémica de klotho sobre la neurogénesis hipocampal del adulto.....	64
2.1 Evaluación de la neurogénesis en el hipocampo del ratón deficiente de <i>klotho</i>	64
2.2 Inhibición local de la expresión <i>klotho</i> en el hipocampo de ratones adultos.....	64
2.3 Evaluación de la neurogénesis en el hipocampo del ratón con inhibición local de la expresión hipocampal de <i>klotho</i>	65
Objetivo Experimental 3: Evaluar el efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo.....	67

3.1 Cultivo de progenitores neuronales de hipocampo adulto.....	67
3.2 Efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores neuronales de ratón adulto.....	67
Discusión.....	69
Expresión de klotho en el Hipocampo de ratones adultos.....	69
Rol de klotho en la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto.	70
Limitaciones.....	72
Conclusión.....	74
Figuras.....	75
<i>Figura 1: Expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 2: Localización de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos por Inmunohistoquímica</i>	<i>76</i>
<i>Figura 3: Localización de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos por</i>	<i>77</i>
<i>Figura 4: Expresión de klotho en el giro dentado de ratones adultos por inmunofluorescencia.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 5: Expresión de klotho en cultivos primarios de neuronas hipocampales, por inmunofluorescencia</i>	<i>79</i>
<i>Figura 6: Expresión hipocampal de klotho durante el envejecimiento en ratones</i>	<i>80</i>
<i>Figura 7: Expresión de Ki67 en la región subgranular del giro dentado</i>	

en ratones KO de klotho y WT.81

Figura 8: Expresión de Dcx en la región subgranular del giro dentado en ratones klotho KO y WT.82

Figura 9: Efectividad de la infección Hipocampal con sitio único de punción.83

Figura 10: Cambio de expresión del gen klotho por rtPCR en hipocampo infectado por lentivirus.84

Figura 11: Efecto de la Inhibición de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos sobre el número de células Ki67 positivas en la región subgranular del giro dentado.85

Figura 12: Efecto de la Inhibición de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos sobre el número de células Dcx positivas en la región subgranular del giro dentado.86

Figura 13: Progenitores neuronales hipocampales de ratón adulto en cultivo.87

Figura 14: Expresión del gen klotho Durante la Diferenciación de Progenitores Neuronales de Hipocampo Adulto de Ratón en Cultivo por PCR.88

Figura 15: Efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo.89

Figuras Suplementarias

<i>Figura S1: Localización de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos por Inmunohistoquímica</i>	90
<i>Figura S2: Validación de la técnica de PCR en tiempo Real</i>	91
<i>Figura S3: Control de la expresión de klotho en cultivos primarios de neuronas hipocampales.</i>	92
<i>Figura S4: Apoptosis en los hipocampos infectados por lentivirus shRNA-anti klotho.</i>	93
<i>Figura S5: Efecto de la proteína klotho recombinante en la proliferación de progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo.</i>	94
Referencias	95
Certificado Comité de ética	101

Abreviaturas

Abs:	Absorbancia
ADAMS:	<i>A disintegrin and metalloproteinases</i>
AP	Anteroposterior
BCA	Acido Bicinconínico
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albumina de suero Bovino
C	Celcius
CA1	Región 1 del cuerno de amón
CA3	Región 3 del cuerno de amón
Casp3	Caspasa 3
CCG	Capa Celular Granular
cDNA	DNA complementario
CEMC	Centro de Estudios Moleculares de la Célula
Cm	Centímetro
CON	Contralateral
DCL	Deterioro cognitivo leve
Dcx	Doblecortina
DDCt	Delta-Delta-Ciclo umbral
DLV	<i>Dishevelled</i>
DNA	Acido deoxiribonucleico
DS	Desviación estandard
DV	Dorso ventral
EGF	Factor de crecimiento epidermal
Egr-1	Proteina de respuesta temprana al crecimiento 1
ERK	Kinasa regulada por señales extracelulares
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
FGFR	Receptor de los factores de crecimiento fibroblásticos
Fz	<i>Frizzled</i>
GD	Giro dentado
GDF11	Factor de crecimiento diferenciado 11
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína fluorescente verde
GluN2B	Subunidad 2B del receptor de glutamato
Gr	Gramos
H	Hora
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HEK	Riön embrionario de humano
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazineetanesulfonico
HRS	Horas
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IHQ	Inmunohistoquímica
Ip	Ipsilateral

IP	Intraperitoneal
kD	Kilodalton
KO	Knockout
LMP	<i>Low melting point</i>
LPR6	Proteína asociada al receptor de lipoproteínas de baja densidad
LTP	Potenciación de largo plazo
M	Molar
MAP2	Proteína asociada a microtubulos
Mg	Microgramos
Min	Minutos
ml	Mililitro
ML	Mediolateral
Mm	Milimetro
mM	Mili molar
MOPS	Acido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
mV	Milivoltios
ng	Nanogramo
Nm	Nanomolar
NMDA	N-metil-D aspartato
NPC	Células progenitoras neuronales
OCDE	Organización para la cooperación y el desarrollo económicos
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-G	Buffer fosfato salino con glucosa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDD	Papapina-dispasasas
PEG	Poli(etil)englicol
PFA	Paraformaldehído
pFRS2a	Sustrato 2a del receptor de factores de crecimiento fibroblástico
PVP	Poli-vinil-pirrolidona
RG	Región granular
RNA	Acido ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RSG	Región subgranular
rtPCR	PCR en tiempo real
Scr	Scrambled
Seg	Segundos
SENAMA	Servicio Nacional del Adulto Mayor
SFB	Suero fetal bovino
sFRP	Proteína secretada relacionada con <i>frizzled</i>
shRNA	Horquilla de RNA
TA	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WB	Western blot
Wnt	<i>Wingless-type murine-mammary tumour virus integration site</i>
WT	<i>Wild type</i>

Resumen

La población mundial envejece en forma acelerada. Considerando que el deterioro cognitivo es uno de los principales determinantes de enfermedad y discapacidad de los adultos mayores, la comprensión de sus mecanismos fisiopatológicos es fundamental para el desarrollo de medidas orientadas a mejorar su prevención, diagnóstico y tratamiento.

En el giro dentado del hipocampo existe un fenómeno de plasticidad neuronal llamado neurogénesis del adulto, en el cual células progenitoras residentes en ese nicho proliferan y se diferencian en nuevas neuronas, las que son integradas en los circuitos neuronales existentes, y son relevantes para procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. La neurogénesis hipocampal del adulto disminuye en forma progresiva con el envejecimiento, y se encuentra alterada en múltiples enfermedades neurodegenerativas asociadas al él.

La neurogénesis del adulto es un proceso altamente regulado: tanto factores ambientales como señales del propio nicho neurogénico han demostrado ser importantes reguladores de la mantención, proliferación, y posterior diferenciación hacia estirpe neuronal de las células progenitoras.

Klotho es una proteína con efectos antienvjecimiento, expresada principalmente en riñón, pero que ha sido aislada en el hipocampo de ratones adultos. Recientemente fue descrita una asociación entre niveles plasmáticos elevados de klotho y un mejor rendimiento cognitivo en cohortes de humanos adultos.

Se ha observado en tejidos no neuronales que klotho participa en múltiples vías de transducción de señales, varias de ellas vinculadas a la regulación de la neurogénesis del adulto, y estudios realizados en el ratón deficiente de klotho han mostrado que la ausencia del gen correlaciona con un aumento en la tasa de

proliferación de células progenitoras en múltiples nichos como medula ósea y vellosidades intestinales.

Considerando que: 1) klotho se expresa en el hipocampo, 2) que participa en vías de transducción de señales asociadas a la regulación de la neurogénesis del adulto, y 3) que en tejidos no neuronales ha mostrado regular la tasa de proliferación de células progenitoras, se plantea la siguiente hipótesis: **klotho es un inhibidor de la neurogénesis hipocampal del adulto.**

En esta tesis, mediante PCR, Western blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se caracterizó la expresión de klotho en la región granular del giro dentado del hipocampo de ratones adultos, encontrándose que la expresión de klotho se concentra principalmente en las capas 2 y 3 de la región granular del giro dentado. Mediante inmunofluorescencia en cultivos primarios de neuronas hipocampales se evidenció la expresión de klotho en células neuronales, y mediante rtPCR se mostró que no existe un cambio en la expresión hipocampal del gen klotho asociado al envejecimiento de los ratones.

Utilizando como modelo ratones deficientes de klotho, mediante inmunofluorescencia, se encontró un mayor número de células Ki67 y doblecortina (Dcx) positivas en la región subgranular del hipocampo de los ratones deficientes de klotho comparado con controles silvestres, lo que es compatible con un aumento en la neurogénesis hipocampal en ausencia de expresión del gen klotho, y con la hipótesis planteada en esta tesis.

Considerando la expresión de klotho en múltiples tejidos, y que se trata de un factor circulante, se estudió el efecto de la inhibición local de la expresión de klotho en el hipocampo. Para ello se produjeron vectores lentivirales que expresan shRNA capaces de inhibir la expresión del gen klotho, los que fueron inyectados mediante cirugía estereotáxica en el giro dentado de ratones adultos. Los hipocampos infectados con shRNA-antiklotho mostraron un menor número de células Ki67 y dcx

positivas en la región subgranular del giro dentado, lo que es compatible con una menor neurogénesis en hipocampos deficientes del gen klotho, dato opuesto al observado en el ratón deficiente de klotho.

Adicionalmente cultivos de progenitores hipocampales de ratón adulto fueron estimulados con la proteína klotho recombinante, lo que produjo un aumento en la tasa de proliferación de dichas células, resultado concordante con la interferencia local de klotho en el hipocampo.

En conjunto, estos resultados demuestran que klotho participa de la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto. Los datos de modulación local de la expresión del gen klotho, y de estimulación directa de progenitores hipocampales de ratón adulto, son compatibles con que la expresión hipocampal de klotho estimularía la proliferación de progenitores hipocampales en ratones adultos.

Las diferencias encontradas en el efecto sobre la neurogénesis entre el ratón deficiente de klotho y la interferencia local de klotho en el hipocampo pueden explicarse por diferencias entre los modelos -como la temporalidad y/o la intensidad de dicha inhibición- o a la participación de mediadores entre la expresión sistémica de klotho y su efecto sobre los progenitores, los que no se verían alterados en el modelo de interferencia local.

Los datos obtenidos en esta tesis permiten establecer un rol funcional para la expresión hipocampal de klotho en la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto, contribuyendo así con la caracterización de un nuevo regulador de dicho proceso, no descrito previamente. Estos resultados, muestran un rol de klotho en la fisiología normal de la neurogénesis del adulto, abriendo un espacio para el estudio de su rol en el proceso del envejecimiento o condiciones patológicas.

Abstract

The world population is aging at an accelerated rate. As cognitive impairment is one of the main determinants of disease and disability among the elderly, understanding its pathophysiological mechanisms is essential for the development of measures to improve its prevention, diagnosis and treatment.

In the dentate gyrus of the hippocampus occurs a neuroplasticity phenomenon called adult hippocampal neurogenesis, where stem cells resident in that niche proliferate and differentiate into new neurons. These new cells are integrated into existing neural circuits, and are relevant for cognitive functions such as learning and memory. Adult hippocampal neurogenesis decreases progressively with age, and is altered in many neurodegenerative diseases associated with it.

Adult neurogenesis is a highly regulated process: both environmental factors and signals from the neurogenic niche itself have shown to be important regulators of the maintenance, proliferation and subsequent differentiation into neuronal lineage of progenitor cells.

Klotho is a protein with anti-aging effects, mainly expressed in the kidney, but is also isolated from the hippocampus of adult mice. An association between elevated Klotho plasma levels and a better cognitive performance was recently described in adult human cohorts.

In non-neuronal tissues Klotho is involved in several signaling pathways, many of them linked to the regulation of adult neurogenesis. Studies in klotho knockout (KO) mice have shown that the absence of the gene correlates with an increased proliferation rate of progenitor cells in multiple niches, such as bone marrow and intestinal villi.

Considering that: 1) Klotho is expressed in the hippocampus, 2) It is involved in signal transduction pathways associated with the regulation of adult neurogenesis, and 3) that in non-neuronal tissues klotho has been shown to regulate the rate of proliferation of progenitor cells, we propose that Klotho is an inhibitor of adult hippocampal neurogenesis.

In this thesis, using PCR, Western blot, immunohistochemistry and immunofluorescence, we describe that expression of Klotho was observed in the granular region of the dentate gyrus of the hippocampus of adult mice, mainly concentrated in layers 2 and 3 of the granular layer and was almost absent in the subgranular zone where progenitor cells reside. By immunofluorescence in primary cultures of hippocampal neurons Klotho expression in neuronal cells was evident, and by rtPCR we shown that there is no change in hippocampal Klotho gene expression associated with aging of the mice.

Using as a model the klotho knockout mice, and immunofluorescence, we found more Ki67 and doublecortin (DCX) positive cells in the subgranular zone of the hippocampal region of the klotho KO mice compared to wild-type controls, which is consistent with an increased adult hippocampal neurogenesis in the absence of Klotho expression, and with our hypothesis of an inhibitor role klotho on neurogenesis.

However, considering that Klotho expression can be found in several tissues, and that klotho is a circulating factor, we decided to study the local effect of inhibition of Klotho expression in the hippocampus. We produced lentiviral vectors expressing shRNA capable of inhibiting Klotho gene expression. These lentiviral vectors were injected by stereotaxic surgery in the dentate gyrus of adult mice. ShRNA-infected antiklotho hippocampus showed a smaller number of Ki67 and DCX positive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus compared with scrambled infected controls, suggesting that local deficiency of klotho induces lower hippocampal neurogenesis, opposite to what was observed in the Klotho KO mice, which represents a systemic deficiency of klotho.

Additionally cultures of neuronal progenitors cells from adult mice hippocampus were stimulated with the recombinant Klotho protein, resulting in an increase in the proliferation rate of such cells, a result consistent with Klotho's local interference in the hippocampus.

Together these results demonstrate that Klotho is expressed in the adult hippocampus of mice and participates in the regulation of adult hippocampal neurogenesis by regulating the proliferation rate of neuronal progenitor cells.

The differences in the effect on neurogenesis between Klotho KO mice and Klotho local interference in the hippocampus may be explained by differences between models such as the timing and / or intensity of such inhibition or the participation of mediators between systemic Klotho expression and its effect on target tissues, which would not be altered in the model of local interference.

The data obtained in this thesis establish a new functional role for hippocampal Klotho expression in regulating adult hippocampal neurogenesis, thus contributing to the characterization of a new regulator of this process, not described previously. These results show a role of Klotho in normal physiology of adult neurogenesis, opening a new field for the study of its role in the process of aging and pathological conditions.

Introducción

1. Envejecimiento, enfermedad y discapacidad:

La población mundial experimenta cambios demográficos de gran importancia biomédica. Mejoras sociales, sanitarias y de los cuidados de la salud han determinado que la expectativa de vida tanto de hombres como mujeres, haya aumentado en forma lineal desde que se tienen registros confiables a mediados del siglo XIX (Oeppen, Science 2002). Nuestro país no es la excepción y la expectativa de vida actual se encumbra en promedio a los 78,6 años, valor similar al de muchos países desarrollados (Fortes, SENAMA 2009; Oeppen, Science 2002). Si a este aumento en la expectativa de vida se agrega la disminución progresiva de las tasas de natalidad y fecundidad, obtenemos el fenómeno conocido como envejecimiento de la población. Como consecuencia de éste, se espera que en nuestro país el porcentaje de la población determinado por sujetos mayores de 60 años se triplique entre los años 2000 al 2050 alcanzando al 30% de la población total (Fortes, SENAMA 2009) .

La probabilidad de padecer enfermedades crónicas y de que estas cursen con peor pronóstico aumenta en forma progresiva con la edad. Esta mayor carga de morbilidad está asociada además a una mayor probabilidad de discapacidad. Datos nacionales muestran que entre un 10 a 20% de la población adulto mayor presenta algún grado de discapacidad (González, SENAMA 2009). Estos elementos determinan un mayor uso de los sistemas de salud por parte de la población añosa, con una mayor carga en términos de costos. Datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) muestran que el gasto en salud es 3,3 veces mayor en personas mayores de 65 años comparados con sujetos de menor edad, y datos norteamericanos muestran que son los cuidados de salud a largo plazo, determinados principalmente por el cuidado de sujetos añosos discapacitados, los que aumentan a mayor velocidad durante los últimos años, y representan a una mayor carga en términos económicos para los sistemas de salud (Spillman, Nejm 2000).

1.1 Envejecimiento y deterioro cognitivo

De los determinantes de discapacidad de la población de mayor edad, el deterioro cognitivo es uno de los más importantes, tanto por su elevada prevalencia como por su impacto en el desempeño en las actividades de la vida diaria (Borson, *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2010). La encuesta Nacional de Salud realizada en Chile en el año 2003, mediante métodos de baja sensibilidad, estimó que al menos un 15% de las personas mayores presentaban algún tipo de deterioro cognitivo, prevalencia que aumenta en forma significativa con la edad, alcanzando a un 43% de las personas mayores de 80 años (González, SENAMA 2009). La posibilidad de presentar dependencia en actividades de la vida diaria es hasta 14 veces mayor en personas con deterioro cognitivo y/o demencia, al ser comparadas con la población general, transformándola en uno de los principales determinantes de discapacidad el adulto mayor (Agüero-Torres *J Clin Epidemiol* 2002; Borson *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2010).

El deterioro cognitivo asociado al envejecimiento es un síndrome que puede ser secundario a múltiples etiologías. En condiciones normales se describe un deterioro asociado al envejecimiento normal en algunas funciones cognitivas, como velocidad de procesamiento. Por otro lado, está descrita una disminución leve del rendimiento cognitivo asociado a la edad, especialmente en aprendizaje y la memoria de trabajo denominada deterioro cognitivo leve (DCL) (Petersen, *Neurology* 1992; Small, *Neurology* 1999). Cuando este deterioro es progresivo, e interfiere en las actividades cotidianas, se está frente a una demencia (DSM-V, 2013). El DCL, por lo tanto, es una etapa intermedia entre el envejecimiento normal y la demencia. La causa más frecuente de demencia es la enfermedad de Alzheimer, que da cuenta de un 50-60% de los casos (Ferri, *Lancet* 2005). Otras causas menos frecuentes son la demencia vascular, la enfermedad por cuerpos de Lewy, la demencia frontotemporal y la

demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, todas estas asociadas al envejecimiento (Morris, Alzheimer Dis Assoc Disord, 2005).

Frente a este escenario epidemiológico, el estudio de los mecanismos determinantes del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento es fundamental para el desarrollo de políticas de salud orientadas a prevenir, diagnosticar y manejar la discapacidad asociada al envejecimiento de la población.

2. Neurogénesis en el cerebro adulto

Actualmente es ampliamente aceptado que el cerebro adulto de los mamíferos contiene células madres *-stem cells-* y células progenitoras neuronales capaces de proliferar y diferenciarse, generando así nuevas neuronas y células gliales durante toda la vida del individuo (Gage, Annu Rev Neurosci 1995; Gage, Cell 2014).

Existen dos nichos bien definidos donde ocurre este fenómeno: la zona subventricular en los ventrículos laterales -que nutre de nuevas neuronas al bulbo olfatorio y a los ganglios de la base-, y la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo. Estas nuevas neuronas se integran en los circuitos ya existentes y han mostrado ser relevantes para múltiples procesos cognitivos tales como el aprendizaje, la memoria, y la regulación del ánimo (Deng Nat Rev Neurosci 2010; Inestrosa Nat Rev Neurosci 2010, Lazarov Trends Neurosci 2010, Ernst, Cell 2014) (Figura 1).

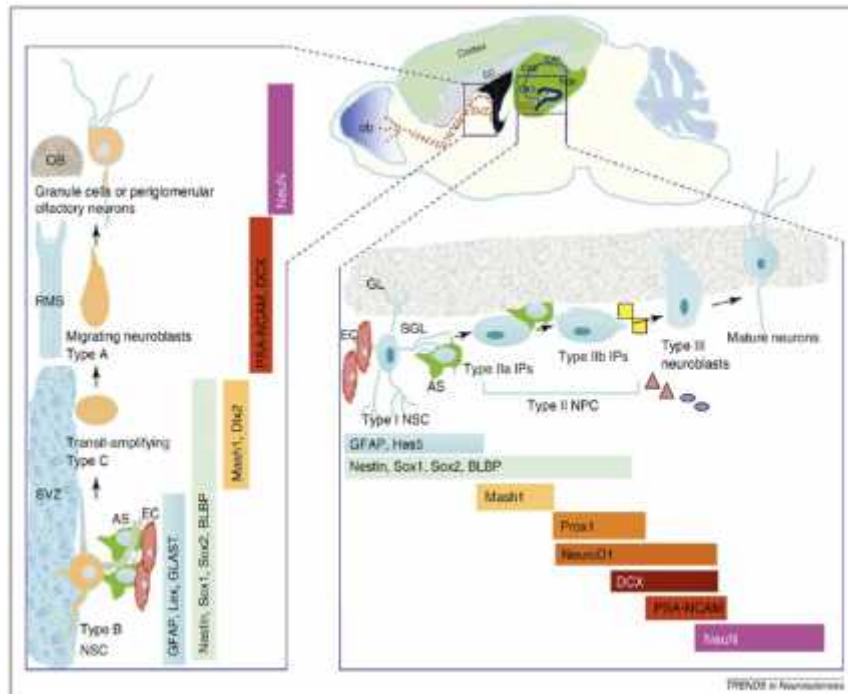


Figura 1: Neurogénesis en el cerebro del ratón adulto (Lazarov, Trends Neurosc 2010)

Existe evidencia de que alteraciones de la neurogénesis hipocampal del adulto pudieran ser parte de la fisiopatología del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento y de algunas enfermedades neurodegenerativas. En ratas y ratones la neurogénesis hipocampal del adulto disminuye en forma progresiva con la edad y correlaciona bien con el menor desempeño cognitivo asociado al envejecimiento (Lazarov, Trends Neurosci 2010). Por ejemplo, es sabido que las ratas presentan una amplia dispersión en su desempeño cognitivo durante los últimos meses de vida. En un estudio donde se clasificó a las ratas añosas normales en buena o mala capacidad cognitiva, en función de su desempeño en el laberinto de agua, se muestra que las ratas con mal rendimiento tienen significativamente menos neurogénesis hipocampal comparadas con aquellas con buen desempeño (Drapeau, PNAS 2003; Li Neurosc Lett 2009). Intervenciones genéticas que llevan a un aumento de la neurogénesis durante la vida adulta mejoran el rendimiento cognitivo en pruebas de separación contextual (Sahay, Nature, 2011), mientras que aquellas que la inhiben lo empeoran (Deng, Nat Rev Neurosc 2010). Estudios basados en imágenes anatómico-funcionales con resonancia magnética en humanos han mostrado que el giro dentado -región donde hay neurogénesis del adulto- es la zona hipocampal que sufre mayores cambios asociados al envejecimiento (Small, Nat Rev Neusoci 2011). Existen datos indirectos en humanos de que intervenciones que modifican la neurogénesis tienen impacto en el rendimiento cognitivo. Es así como el ejercicio físico aeróbico, un reconocido inductor de la neurogénesis hipocampal, ha demostrado mejorar el rendimiento cognitivo de adultos mayores (Lautenschlager, JAMA 2008), y por otro lado, tratamientos quimioterapéuticos, que actúan como inhibidores inespecíficos de la proliferación celular, se asocian a un deterioro de éste (Monje, Behav Brain Res 2011). La neurogénesis hipocampal ha sido vinculada además a la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas. Estudios anatomopatológicos realizados en pacientes con enfermedad de Alzheimer, y algunos modelos animales de ésta patología, muestran que éstos presentan un aumento de la neurogénesis hipocampal. Estos cambios en la neurogénesis parecen estar relacionados con la etapa de la enfermedad, siendo mayores en estadios iniciales, y se ha planteado que pudiera

corresponder a un fenómeno compensatorio en respuesta a la neurotoxicidad asociada a la enfermedad (Jin, PNAS 2004, Martínez-Canabal, Front Neurosci 2014).

2.1 Regulación de la neurogénesis del adulto

La neurogénesis del adulto es un proceso altamente regulado. Estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito múltiples vías regulatorias que determinan la proliferación, mantención, diferenciación y posterior integración de las nuevas neuronas (En revisión: Gage, Cell 2014).

Se han descrito factores ambientales que juegan un rol importante en la regulación de la neurogénesis: las experiencias odoríferas, el enriquecimiento medioambiental y el ejercicio aeróbico son capaces de estimular la neurogénesis en ratones (Ma Ann N Y Acad Sci 2009, Brown Eur J Neurosc 2003, Varela-Nallar Birth Def Res 2010), mientras que el estrés psicológico sostenido es capaz de inhibirla (Perera J Neurosci 2007).

El nicho que aloja a las células progenitoras ha mostrado ser de gran relevancia, proveyéndoles factores que son importantes en la regulación de la mantención, proliferación y su posterior diferenciación. La estructura del nicho neurogénico es de gran importancia: grupos de progenitores hipocampales se agrupan en relación a vasos sanguíneos rodeados por astrocitos. Esta estrecha relación espacial permite la interacción de los progenitores con factores secretados localmente por los astrocitos y con factores circulantes de distribución sistémica (Ming, Neuron 2011).

2.1.1 Factores producidos localmente en el nicho

Estudios de co-cultivo *in vitro* y la modulación local de factores de crecimiento *in vivo* han demostrado la gran relevancia de los factores producidos localmente en el

nicho neurogénico. Si bien la lista de estos factores es muy amplia, dentro de los más reconocidos están los agonistas de la vía canónica de wnt, en particular wnt3a, y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2). (Varela-Nallar, Birth Def Res 2010).

Las células madres neuronales adultas expresan receptores y agonistas de la vía canónica de wnt (Lie, Nature 2005; Wexler, Stem Cell 2009). El grupo de Gage demostró que la vía canónica de wnt es clave en la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto. Determinó que los astrocitos hipocampales producen el agonista wnt, wnt3a, y en un modelo de rata adulta (replicado también en ratón) demostró que la sobre-expresión en el hipocampo de wnt3 por técnica estereotáxica fue capaz de estimular de manera importante la neurogénesis hipocampal. Mostró además que la introducción de un dominante negativo del agonista de wnt en el hipocampo, era capaz de abolir casi por completo la neurogénesis (Lie, Nature 2005).

Estudios posteriores mostraron que β -catenina (Un mediador intracelular que participa de la vía canónica de wnt) actúa como un factor de transcripción en las células precursoras neuronales, que aumenta la expresión del gen *neurod1*, el que se encuentra basalmente inhibido por Sox2/LEF. La expresión de *neurod1* estimulada por wnt ha demostrado ser clave en la supervivencia y posterior diferenciación de los precursores hacia estirpe neuronal, y su inhibición disminuye notablemente la sobrevivencia y maduración de las nuevas neuronas generadas en la región subgranular de giro dentado (Kuwabara, Nat Neurosci 2009; Gao, Nat Neurosci 2009).

FGF-2, un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento fibroblástico, es también un regulador de la neurogénesis hipocampal del adulto.

La familia de los factores de crecimiento fibroblásticos está compuesta por 22 miembros (FGF-15 es el ortólogo en ratón de FGF-19 en humano), que actúan como agentes endocrinos y/o paracrinos a través de la interacción con alguno de los cuatro receptores de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFR). La interacción ligando-receptor activa la vía de las MAP kinasas río abajo de ellos, estimulando la expresión de genes blanco de la vía como *egr-1* (Kuro-O, Trends in Endocrinol Metab 2008). En

múltiples experimentos *in vitro*, FGF-2 ha demostrado ser de gran importancia en promover la proliferación y mantención de las células progenitoras neuronales en cultivo (Gage, Annu Rev Neurosci 1995; Gosh, Neuron 1995).

La primeras evidencias de un rol de FGF-2 *in vivo* provienen de estudios embrionarios que muestran que el ratón deficiente para el gen FGF-2 presenta alteraciones importantes en el desarrollo cortical (Ortega, Prot Natl Acad Sci 1998). FGF-2 es expresado por astrocitos en el hipocampo adulto, y su concentración tisular disminuye progresivamente con la edad (Shetty, Glia 2005). La infusión intraventricular de FGF-2 en ratones senescentes estimula la proliferación celular en el giro dentado (Jin, Aging Cell 2003).

FGFR1, el receptor 1 de FGF, es expresado en la región subgranular del giro dentado adulto por células BrdU positivas (Mudó, J Neural Trasm 2009). Experimentos realizados en un ratón deficiente condicional para la expresión de FGFR1 muestran que la ausencia del receptor se asocia a una disminución en la proliferación celular en el giro dentado y a alteraciones en la consolidación de la memoria y del desarrollo de potenciaciones de largo plazo (LTP), un correlato molecular de memoria y aprendizaje en tejido hipocampal (Zhao, Biol Psychiatry 2007).

2.1.2 Factores solubles y la regulación de la neurogénesis hipocampal

Durante los últimos años la evidencia que soporta el rol de factores circulantes en la regulación de la neurogénesis del adulto ha crecido en forma importante (Yates, Nat Rev Neurosc 2014).

Utilizando una técnica conocida como parabiosis –mediante la cual dos animales integran sus sistemas circulatorios, permitiéndoles compartir plasma y con ello factores solubles- Villeda y su grupo demostraron que factores circulantes en

animales jóvenes, podían aumentar la proliferación celular en el giro dentado de animales añosos (Villeda, Nature 2011). En particular, con estudios controlados con experimentos de ganancia y pérdida de función local en el hipocampo, demostró que el factor soluble CCL11 –una citokina asociada a la respuesta alérgica- era capaz de promover la proliferación en el giro dentado de ratones viejos. Utilizando una metodología similar, Katsimpardi demostró que el factor circulante GDF11 –previamente asociado a la remodelación cardíaca relacionada al envejecimiento- regulaba la estructura del nicho neurogénico promoviendo la angiogénesis y promovía la proliferación de progenitores en la región subventricular (Katsimpardi, Science 2014).

3. Klotho

El gen *klotho* fue descubierto en forma accidental hacia fines de los años 90 por el grupo de Nabeshima en Japón (Kuro-O, Nature 1997). El ratón deficiente, o knockout (KO) para *klotho* se desarrolla normalmente hasta la tercera semana de vida, tras lo cual presenta en forma progresiva una serie de manifestaciones que recuerdan al envejecimiento humano, entre las que se encuentran aterosclerosis, enfisema, osteopenia, sarcopenia, atrofia cutánea, hipogonadismo hipogonadotrófico, deterioro cognitivo, y disminución importante de su sobrevivencia (Kuro-O, Nature 1997). Posteriormente fueron descritas líneas de ratón que sobre-expresaban el gen *klotho*, las que mostraban un aumento de un 20 a 30% en la sobrevivencia máxima comparada con ratones wild type (WT) (Kurosu, Science 2005). De esta manera *klotho* parece funcionar como un gen supresor del envejecimiento, donde su disrupción se asocia a un fenotipo de progeria y su sobre-expresión aumenta la sobrevivencia máxima.

Compuesto por 5 exones, el gen *klotho* codifica para una proteína transmembrana tipo I de 1012 aminoácidos. Su dominio intracelular es pequeño (10 amino ácidos), y no se han demostrado dominios funcionales en él. Su segmento extracelular de mayor tamaño, está compuesto por dos dominios que muestran una

importante homología con las betaglicosidasas de tipo 1, sin embargo la proteína Klotho carece de esta actividad enzimática (Kuro-O Pflugers Archive – Eur J Physiol 2010).

La proteína Klotho puede ser procesada por las proteasas ADAMS 10 y ADAMS 17 en un sitio cercano a su inserción en la membrana, generando un péptido soluble que ha sido aislado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, planteándose así que klotho pudiese actuar como una hormona (Wang, Ageing Res Rev 2008; Imura FEBS lett 2004). Por empalme alternativo del gen klotho se produce un mRNA que codifica para una proteína que sólo presenta el dominio con homología betaglicosidasa carboxilo terminal, sin segmento transmembrana y que pudiese cumplir también con este rol hormonal de la proteína, sin embargo este péptido no ha sido aislado en suero y se desconoce hasta la fecha su actividad biológica (Kuro-O, Pflugers Archive – Eur J Physiol 2010).

El gen *klotho* es expresado principalmente en el túbulo contorneado del riñón, sin embargo es posible encontrar otros sitios de expresión de menor cuantía en paratiroides, páncreas, ovario, testículo, y cerebro, siendo el plexo coroideo el principal sitio de expresión en este último órgano (Kuro-O, Nature 1997).

Los mecanismos de acción que explican la actividad de klotho han sido motivo de intensa investigación durante los últimos 15 años. Las severas alteraciones del metabolismo calcio fósforo del ratón KO de *klotho*, y su gran similitud fenotípica con el ratón KO para el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), permitió descubrir que Klotho (tanto la proteína transmembrana como el fragmento soluble) interactúa directamente con el receptor de factores de crecimiento fibroblásticos tipo 1 (FGFR1) (Razzaque, FASEB J 2006; Kurosu, J Biol Chem 2006). Esta interacción Klotho-FGFR1 aumenta la afinidad del receptor por su ligando FGF23 en unas mil veces. El complejo klotho-FGFR1-FGF23 activa río abajo a las kinasas de la familia ERK, con la posterior estimulación del factor de transcripción egr-1 (Urakawa, Nature 2006). FGF23 es la principal fosfatona del organismo, regulando los niveles plasmáticos de fósforo. A

través de esta vía Klotho participa de la homeostasis del fósforo, y del eje hueso-calcio-fósforo-riñón. (Kuro-O, Pflugers Archive – Eur J Physiol 2010).

En el año 2012 Anour publicó un estudio que muestra que el fenotipo de progeria del ratón KO de klotho era inhibido al evaluar un doble transgénico KO de klotho y del receptor de vitamina D. Este dato es relevante, pues considerando los múltiples sitios de expresión de klotho en el organismo, su rol como factor soluble y su vinculación a múltiples otras vías de transducción de señales, como veremos a continuación, han puesto en duda cuales de estos efectos son directos de klotho o secundarios a mediadores (Anour, PlosOne 2012).

3.1 Klotho y cerebro

Durante los primeros años luego de la descripción del gen klotho, se atribuyó la expresión cerebral de éste como exclusiva del plexo coroideo. Sin embargo datos posteriores han demostrado la expresión de klotho en otras regiones como la corteza cerebral, el cerebelo, y la sustancia blanca pericortical (Duce, Glia 2008; Li, PNAS 2010; Clinton, Brain Res 2013), y si bien múltiples trabajos han demostrado que el transcrito *klotho* se expresa en el hipocampo de ratones adultos, la expresión de la proteína klotho en el hipocampo ha sido un tema controversial, con un patrón de expresión no bien caracterizado a la fecha. En el año 2012 se publicó una caracterización de la localización de la expresión de la proteína klotho en distintas regiones del cerebro de ratones adultos basada en inmunohistoquímica (Germain, Neurobiol Aging 2012), mostrando que la expresión de klotho se encontraba principalmente en el plexo coroideo y en células de purkinje en el cerebelo, sin encontrar expresión en el hipocampo. En la discusión argumentan que no haber encontrado proteína en el hipocampo puede ser secundario a una baja expresión de ésta, o a un fenómeno represión traduccional del transcrito en ese tejido. Ese mismo año se describió la expresión del transcrito y la proteína klotho mediante Western blot (WB) en la sustancia blanca e hipocampo de monos Rhesus adultos, reportando

además que la expresión hipocampal de la proteína *klotho* se mantenía estable durante el envejecimiento en esos tejidos (King, Age (Dordr) 2012). Posteriormente Clinton publicó un artículo donde describe la expresión de la proteína *klotho* en el cerebro de ratas adultas mediante inmunofluorescencia. En dicho trabajo utilizó como control del anticuerpo inmunofluorescencias realizadas en el ratón KO de *klotho*, presentando imágenes donde se observa la expresión de la proteína *klotho* en el hipocampo adulto de ratones adultos (Clinton, Brain Res 2013).

Estudios realizados en el ratón KO de *klotho* evidenciaron las anomalías morfológicas en el cerebro de estos animales, mostrando atrofia hipocampal, aumento de células apoptóticas y disminución importante en el número de sinapsis. Sin embargo, utilizaron para el análisis ratones en los que el fenotipo de progeria se encuentra avanzado, y se asocia a niveles muy elevados de fósforo y calcio, por lo que es difícil atribuir dichas alteraciones a la ausencia del gen o a los trastornos metabólicos secundarios (Shiozaki, Neuroscience 2008).

Los efectos cognitivos asociados a cambios en la expresión de *klotho* han sido estudiados tanto en modelos de deficiencia como de sobre-expresión de *klotho*. En el ratón KO de *klotho* se han descrito alteraciones motoras y de rendimiento cognitivo en pruebas dependientes de hipocampo (Nagai, FASEB J2002). Sin embargo, similar a la descripción del cerebro del ratón KO de *klotho*, estos experimentos fueron realizados cuando el ratón tenía ya el fenotipo de progeria, y presentaba una serie de alteraciones metabólicas y sistémicas que hacen imposible determinar si estos cambios cognitivos estaban o no en relación al cambio de expresión de *klotho*.

Recientemente se publicó un estudio donde se describe el rendimiento cognitivo de 3 cohortes independientes de humanos que tienen una variante alélica de *klotho* (Kl-VS) que se asocia a mayores niveles plasmáticos de esta proteína. Todas estas cohortes mostraban un aumento en el rendimiento cognitivo (Dubal, Cell Reports 2014). Los mecanismos fisiológicos tras este cambio cognitivo fueron estudiados utilizando como modelo un ratón que sobre-expresaba *klotho* de forma

sistémica. En dicho modelo se observó un aumento en la expresión hipocampal de la subunidad 2B del receptor NMDA, GluN2B (Dubal, Cell Reports 2014). Rebanadas de hipocampo de este animal mostraban un aumento en la potenciación de largo plazo comparada con las controles, aumento que es abolido al inhibir el cambio de expresión en GluN2B.

Así como la expresión, los efectos morfológicos y cognitivos asociados a cambios en la expresión de klotho, se ha descrito también una asociación entre la expresión del transcrito klotho en el hipocampo y enfermedad de alzheimer. Un estudio mostró que la expresión del transcrito se encuentra aumentada en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer, y que es regulada por el fragmento intracelular que resulta del procesamiento del péptido amiloide (Li, PNAS 2010),

3.2 Klotho, Wnt y FGF2

Además de la interacción con FGF23 antes mencionada, se ha descrito que klotho participa en la regulación de otras vías de transducción de señal tales como la vía canónica de wnt, y otros tipos de factores de crecimiento fibroblástico como FGF2 (Figura 2), todas ellas vinculadas al proceso de neurogénesis del adulto.

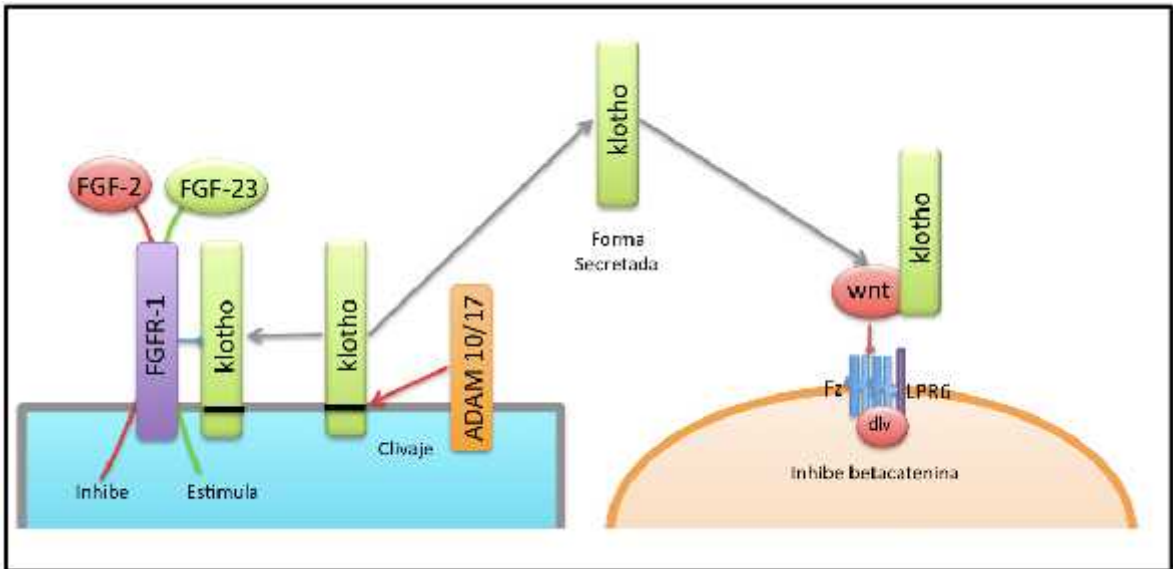


Figura 2: Mecanismos de acción descritos para la proteína Klotho (Adaptado de Kuro-O, *Biochem Biophys Acta* 2009, Liu, *Science* 2007 y Kurosu, *J Biol Chem* 2006).

El proceso de envejecimiento se asocia a la senescencia y depleción de múltiples nichos de células progenitoras. Dado que la actividad de la vía de wnt regula la proliferación y posterior diferenciación de éstas células, se estudió la interacción entre *klotho* y la vía de wnt (Liu, Science 2007). La cruce del ratón KO de *klotho* con un ratón que expresa un reportero de la actividad de la vía de wnt, mostró que la ausencia de *klotho* se asocia a un aumento importante de la actividad de la vía wnt en nichos de progenitores. Estudios *in vitro* mostraron que *klotho* co-inmunoprecipita con varios agonistas de las vía wnt (entre ellos wnt3), lo que impediría la interacción de éste con su receptor, planteándose así que *klotho* pudiera ser un inhibidor soluble de la vía de wnt, (como los ya descritos de la familia sFRP, (Kawano, J Cell Sci 2003)), que ejerce su efecto antienvjecimiento a través de la inhibición de la proliferación de las células progenitoras, evitando su senescencia y posterior depleción (Liu, Science 2007).

Como se mencionó previamente, FGF-2 requiere del receptor FGFR-1 para ejercer su efecto en la célula, receptor que interactúa directamente con *klotho*. De manera interesante, los experimentos realizados para demostrar la interacción *klotho*-FGFR1-FGF23 antes descritos, demostraron en sus controles que la actividad de la vía de las MAP kinasas (pFRS2a, ERK1/2 y p-ERK1/2) frente al estímulo de FGF-2, era inhibida por *klotho* (Kurosu, J Biol Chem 2006), dato que ha sido replicado por otros estudios. A modo de ejemplo, un trabajo realizado en células pancreáticas tumorales demostró que *klotho* es capaz de disminuir la proliferación de estas células secundaria al estímulo de FGF-2, lo que correlaciona con una disminución en la actividad de la vía intracelular (Abramovitz, Clin Cancer Res 2011). Aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual *klotho* inhibe la actividad de FGF-2, especulándose que el cambio conformacional del receptor que favorecería la afinidad con FGF-23 pudiera ser perjudicial para la interacción con FGF-2.

Es importante destacar en este punto que todas las descripciones que se han realizado en relación al efecto de *klotho* sobre la actividad de vías de transducción de señal, han sido hechas en tejidos o modelos celulares no neuronales.

3.3 Klotho y células progenitoras

Estudiando mecanismos que expliquen los cambios fenotípicos del ratón KO de klotho, se analizó la proliferación de células progenitoras en la médula ósea de dicho animal. En el ratón KO de klotho, previo a presentar el fenotipo de progeria, se observa un mayor número de células progenitoras en estadio G1 del ciclo celular comparadas con ratones controles, lo que es compatible con un aumento en la tasa de proliferación de células progenitoras en ese nicho (Liu, Science 2007; Vadakke, Am J Pathol 2014). Dicho cambio en la proliferación se asocia a un menor número de progenitores totales en médula ósea y a un mayor marcaje de betagalactosidasa –un marcador reconocido de senescencia celular- en múltiples nichos que dependen de la proliferación de células progenitoras como intestino y capilares pilosos (Liu, Science 2007; Vadakke, Am J Pathol 2014). Estos hallazgos sugieren que la ausencia de klotho se asocia a una mayor proliferación de células progenitoras, a expensas de un mayor paso de éstas a estado de senescencia y con ello a una depleción de su número total (Liu, Science 2007).

3.4. Klotho y neurogénesis

Basados en que Klotho (i) se expresa en el hipocampo adulto, (ii) inhibe vías de transducción de señal asociadas a la neurogénesis del adulto, y que (iii) regula la tasa de proliferación de células progenitoras, planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Klotho inhibe la neurogénesis hipocampal en ratones adultos

Objetivo general

Determinar el efecto de la expresión hipocampal de klotho sobre la neurogénesis en el giro dentado de ratones adultos.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la expresión de Klotho en el hipocampo adulto, determinando el sitio y estirpe celular involucrada en su expresión, y si existen cambios en su abundancia asociado a la edad.
2. Evaluar el efecto de la inhibición de klotho sobre la neurogénesis hipocampal en ratones adultos.
3. Evaluar el efecto de la proteína Klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores neuronales de ratón adulto en cultivo.

Métodos

Objetivo específico 1:

Caracterizar la expresión de Klotho en el tejido hipocampal de ratones adultos:

1.1 Determinar la expresión del transcrito klotho en hipocampos de ratones adultos mediante PCR.

Extracción del hipocampo. Ratones C57B6 WT fueron decapitados y sus cabezas puestas en placas petri en hielo. Los cerebros fueron retirados del cráneo y dispuestos en PBS 1X estéril frío. Los hipocampos fueron disecados del cerebro utilizando una lupa, y dejados en PBS 1X estéril frío, sobre hielo.

Extracción de RNA: El hipocampo fue transferido a un tubo de homogenización de tejido (MP Biomedicals, REF 6913-500) con 1 ml de Trizol® y homogenizado en homogenizador Fastprep - 24 (MP Biomedicals inc), potencia 6,5 (máxima) por 40 seg, por una vez. Posteriormente se traspasó a un tubo eppendorff de 1,6 ml libre de nucleasas, donde se mantuvo a TA por 10 min. Luego se agregó 200 µl de cloroformo y se dejó la muestra a TA por 3 min, tras lo cual se centrifugó a 11,000 rpm por 15 min a 4 °C. Luego, se traspasó la fase acuosa a un tubo eppendorff de 1,6 ml libre de nucleasas y se agregaron 500 µl isopropanol y 2 µl glycobblue (carrier de RNA), dejando precipitar por 60 min a menos 20 °C. Posterior a ello la muestra fue centrifugada a 11,000 rpm por 10 min con lo que se obtiene un pellet, el que fue lavado con 1 ml de 75% ETOH, y luego la muestra fue centrifugada nuevamente a 8,500 rpm por 5 min, para finalmente retirar el sobrenadante y secar cuidadosamente el tubo evitando que queden restos de ETOH, resuspendiendo el pellet de RNA en 20 µl de agua DEPC.

Tratamiento con DNAsa: El RNA extraído fue tratado con DNAsa para asegurar la pureza de DNA genómico utilizando el kit DNase de Ambion (Ambion cat# 1906). Para ello, se traspasó la muestra de 20 μ l de RNA a un tubo de 0.2 ml libre de nucleasas y se agregaron 2 μ l de Buffer DNase I más 1 μ l de enzima DNase I (2 U/ μ l). Esta mezcla fue incubada a 37 °C por 30 min en termociclador, tras lo cual la reacción fue detenida con 2 μ l de buffer DNase I *Inactivation Reagent*. Para ello la mezcla fue incubada por 2 min con 2 μ L de buffer de inactivación a TA con agitación ocasional, y luego el buffer fue precipitado con centrifugación a 10,000 rpm por 2 min a TA. El sobrenadante que contenía el RNA fue removido y almacenado a -80 °C en alícuotas.

Revisión integridad RNA: La integridad del RNA fue examinada mediante una electroforesis en gel de agarosa (1.44 %; 0.720 mg agarosa en 50 ml de MOPS). Luego se preparó solución de carga mezclando con formamida con solución A (120 μ l glicerol, 200 μ l MOPS 10X, 10 μ l de bromuro de etidio, 358 μ l formaldehído 37 %, azul de bromofenol) en proporción 1:1, la cantidad necesaria según la cantidad de muestras a cargar, considerando diluciones 1:1 de muestra / solución de carga. El RNA en solución de carga fue denaturado en termociclador a 55 °C por 15 min, para luego correr el gel a 60 V por 30 min. El gel fue fotografiado en un transiluminador UV (Foto/UV 21, Fotodyne incorporated), y la integridad estimada por la definición de las bandas de las subunidades mayor y menor de RNA ribosomal (Figura S1a).

Cuantificación de RNA: El RNA fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro. Para ello se prepararon diluciones 1:80 del extracto de RNA en Buffer TE (Quiagen cat#1018499), y se realizó la lectura en un espectrofotómetro Biomatte-3, Thermo Spectronic, utilizando una cubeta de cuarzo a una densidad óptica de 260 y 280 nm. A partir de la lectura se estimó la pureza de la extracción utilizando la relación Abs 260/Abs 280 (si es igual o mayor a 2 la muestra de RNA es

considerada pura), y luego calculando la concentración total mediante la fórmula (Abs 260 x factor de dilución x 40)/1000) ug/ul.

Transcripción reversa: A partir de 500 ng de RNA se realizó una transcripción reversa utilizando el kit IMPROM II de promega, en un termociclador Multigene Optimax de Labnet. Como control se realizaron reacciones de transcripción reversa en ausencia de enzima transcriptasa reversa. El cDNA producto de estas reacciones fue almacenado a -20 °C.

PCR convencional: Para el PCR convencional se utilizaron los siguientes partidores: mouse klotho forward: TCCATCTGGGACACTTTCAC ; mouse klotho reverse TAACTATCGCTGGCCACATC ; mouse GADPH forward AGAAGGTGGTGAAGCAGGCA; mouse GADPH reverse CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG, el kit MasterMix Promega (cat# M7502) y un termociclador Multigene Optimax de Labnet.

La preparación de la solución para PCR se realizó de la siguiente manera:

Reactivo	Cantidad
Master Mix	10 ul
cDNA	2 ul
Primer Sense	1 ul
Primer Anti-Sense	1 ul
Agua Libre de Nucleasas	96 ul

Y se utilizó siguiente patrón térmico en el termociclador:

Ciclos	Duración del ciclo	Temperatura
1	5 minutos	95 °C
35	30 segundos	95 °C
	30 segundos	60 °C
	30 segundos	72 °C
	30 segundos	72 °C

Gel de PCR: Se preparó un gel de agarosa al 2 % mezclando 1 gr de agarosa en 50 ml de buffer TAE a 60 °C. Una vez gelificado se corrió la muestra a 70 V por 50 min utilizando una fuente de poder PS 304 de Life-Technologies. El gel fue fotografiado en un transiluminador UV (Foto/UV 21, Fotodyne incorporated).

1.2 Determinar la expresión de la proteína Klotho mediante WB

Extracción de proteína: El hipocampo fue extraído como se describió previamente, y transferido a un homogenizador de vidrio de tejido (MP Biomedicals cat# 6913-500) con 300 ul de buffer RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6 ; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 1 % Na-DOC; 0.1 % SDS) más inhibidor de proteasas (1/4 de pastilla por 5 ml de buffer RIPA), y un cocktail de inhibidores de fosfatasa (Na₄P₂O₇ 0,33 mM. NAF 0,5 M, Na₃VO₄ 1 mM). El tejido fue homogenizado utilizando un vástago de teflón. Se traspasó luego el homogenizado a un tubo eppendorf de 1,6 ml, el que se mantuvo en hielo por 30 min, y luego fue centrifugado a 1000 G por 5 min para finalmente retirar el sobrenadante, el que se mantuvo en hielo hasta la cuantificación.

Cuantificación de proteína: Para la cuantificación de proteínas se utilizó el Kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific cat#23225), basado en la técnica de micro BCA según las condiciones del fabricante.

Western blot: Se preparó un gel de Tris/Acrilamida al 10 %, donde se cargaron las muestras de proteínas en buffer carga 1:5 hipocampo de ratón adulto 50 ug, hígado de ratón adulto 50 ug, riñón de ratón adulto 10 ug, previa denaturación a 95 °C por 5 min. Se utilizó el estándar de carga bicolor NEB P7711S, 6 ul Se inició la corrida a 90 mV hasta la separación del estándar (25 min), y luego se mantuvo a 130 mV hasta el final de la corrida. La transferencia se realizó a 4 °C a amperaje constante a 350 mV por 90 min, sobre membrana de nitrocelulosa. Se revisó la transferencia de proteínas a la membrana mediante la tinción con rojo ponceau. Se cortó la membrana a 90 kD para obtener 2 fragmentos que permitieran

visualizar klotho (117kD) y tubulina (60 kD). Se bloquearon ambas membranas con leche 5% en PBS tween por 120 min. La incubación con anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4 °C, con agitación, con anticuerpo 1:1000 anti-klotho - ABCAM ab75023 en leche 5 % (PBS tween), y con el Anticuerpo 1:2000 anti-Tubulina Sigma T6199 en leche 5 % (PBS tween). Luego, se lavó 3 veces por 10 min en PBS-tween, previo a incubar con anticuerpo secundario HRP-donkey antimouse 1/5000 en leche 5 % por 1 hr a TA para beta tubulina y HRP-donkey antirabbit 1/3000 en leche 5 % por 1 hr a TA para Klotho. Posterior a ello se lavó 3 veces por 5 min en PBS-tween y luego 1 vez por 10 min en PBS 1X. Para el revelado se utilizó la reacción de luciferasa con peroxidasa de rabanito utilizando el kit WestPico® (cat# 34080, Thermo Scientific), revelando la membrana en cámara oscura por 3 min.

1.3 Precisar el sitio de expresión de klotho mediante IHQ.

Obtención de rebanadas de tejido hipocampal: Ratones C57B6 de 12 semanas de edad wild type (WT) fueron anestesiados con Ketamina/xylacina intraperitoneal. El animal profundamente anestesiado (ningún tipo de reactividad al estímulo nociceptivo) fue dispuesto entonces en una tabla operatoria. Se realizó una disección de la piel del tórax, la cual fue separada del plano óseo del tórax, luego se realizó una toracotomía sub-xifoídea en línea media, lo que permitió exponer el corazón que aún late. Se realizó un corte en la orejuela de la aurícula derecha para permitir el drenaje venoso, y se insertó una cánula de perfusión en el ápice del ventrículo izquierdo, iniciando una perfusión de PBS 1X frío a 10 ml / min. utilizando la bomba peristáltica Dynamax RP-1, Rainin®. Tras eliminar la sangre del animal (el flujo que emerge de la aurícula derecha es transparente) se inició la perfusión con PFA 4 % pH 7,2 frío a 10 ml / min., hasta completar un volumen aproximado de 70 ml por animal. Posterior a la perfusión el animal fue decapitado, el cerebro extraído del cráneo y dispuesto en un tubo estéril con 5 ml de PFA 4 % frío, donde fue mantenido durante toda la noche a 4 °C. Luego los cerebros fueron traspasados a tubos estériles con PBS 1X frío, y conservados a 4

°C hasta su corte. Para ser cortados los cerebros fueron embebidos en un gel de agarosa 1mp 2% (winkler cat# BM-0130), y luego cortados en rebanadas de 40 μ m utilizando un vibrátomo Leica VT1000-S (Leica Biosystems). Las rebanadas de cerebros fueron conservadas a -20 °C en solución de criopreservación (Na₂HPO₄ 0,75 %, NaH₂PO₄*H₂O 0,2 %, Etilenglicol 30 %, sacarosa 30 %, PVP (poli-vinil-pirrolidona) 1 %).

Inmunohistoquímica en rebanadas de hipocampo: Los cortes de cerebro de ratón almacenados a -20 °C en solución de criopreservación, fueron lavados 3 veces por 5 min en PBS 1X. Luego la inmunohistoquímica se realizó utilizando el kit Histostain-PLUS (Invitrogen cat# 85-8943). En breve, primero se realizó un bloqueo de peroxidasas endógenas sumergiendo el tejido por 15 min en una solución de metanol 10 % y H₂O₂ al 3 % en PBS. Posterior a ello los tejidos fueron lavados 3 veces por 2 min con PBS 1X. Para el bloqueo los tejidos se mantuvieron en solución de bloqueo (10 % suero normal de cabra, 2,5 % de BSA y 0.3 % Tritón) por 1 hr a TA. Posterior a ello fueron incubados con anticuerpo primario (Anti-klotho Calbiochem 423500) durante toda la noche a 4 °C en solución de bloqueo, en cámara húmeda. Luego, los tejidos fueron lavados 3 veces por 3 min con PBS 1X. Para la incubación con anticuerpo secundario biotinilado, los tejidos fueron embebidos por 1 hr a TA, usando el anticuerpo secundario del kit (Reactivo B). Luego los tejidos fueron lavados 3 veces por 3 min con PBS 1X. Para activar el conjugado enzimático los tejidos fueron incubados por 20 min a TA, usando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Reactivo C). Posterior a ello los tejidos fueron lavados 3 veces por 3 min con PBS 1X, y se adiciona el cromógeno: DAB (Dako) por 10 seg a TA. Para la contratinción los tejidos fueron lavados en agua destilada y teñidos en solución de azul de toluidina 0.01 % en agua destilada por 10 min para luego realizar 2 lavados en agua destilada por 1 min, y en agua corriente una vez por 5 min. Finalmente los tejidos fueron deshidratados embebiendo secuencialmente en Alcohol 70 % 5 min, Alcohol 95% 5 min, Alcohol 100% 5 min, Xilol 5 min. y montados en portaobjetos con Entellan.

Los cortes fueron observados y fotografiados en un microscopio Nikon Eclipse E400 en aumento 4X y 20X.

1.4 Precisar el sitio de expresión de klotho mediante inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia en rebanadas de hipocampo: Se utilizaron cortes de cerebro de 40 μm de espesor obtenidos de ratones C57B6 de 12 semanas de edad almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en solución de criopreservación. Los tejidos fueron lavados 3 veces en TBS 1X por 5 min cada lavado. Luego fueron bloqueados durante 2 hrs con agitación con solución de bloqueo (3 % suero normal, 0,25 % Triton X-100, en TBS 1X. 1 ml por pocillo) en placa de 12 pocillos con filtros. Posterior a ellos fueron incubados con anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 16 hrs a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación, y se realizó la incubación en pocillos de vidrio en un volumen final de 120 μl . Posterior a ello fueron lavados en TBS 1X por 3 veces, 5 min cada vez, en placa de 12 pocillos con filtros. Luego fueron incubados con anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 2 hrs con agitación a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después de eso fueron lavados 3 veces con TBS 1X, 5 min cada vez, en placa con filtros y luego se tiñeron los núcleos utilizando Dapi. Para ello los tejidos fueron incubados en una solución 1:1000 Dapi en TBS 1X por 10 min, y luego lavados 3 veces con TBS 1X, 5 min cada vez. Finalmente los cortes fueron dispuestos en portaobjetos, y tras dejar secar unos 2-3 min hasta que los cortes se vean blancos/opacos fueron cubiertos con medio de montaje (6 μl de Vectashield) y los bordes fueron sellados con esmalte transparente. Estas inmunofluorescencias fueron almacenadas fuera de la luz a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los anticuerpos primarios, sus concentraciones y anticuerpos secundarios se describen en la siguiente tabla:

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario
Antiklotho Calbiochem 423500	1:100	FIT-C Donkey anti-rabbit 1/250
AntiNeuN MAB377 Millipore	1:200	TRITC Donkey anti-mouse para 1/250
AntiSox2 MAB4343 Millipore	1:400	FIT-C Donkey anti-rabbit 1/250

Las inmunofluorescencias fueron observadas y registradas utilizando un microscopio spinning-disk Olympus BW61WI con aumentos 4X, 20X agua y 60X aceite, y las imágenes procesadas con el programa Image J 1.47v.

1.5 Evaluar la estirpe celular que expresa klotho en el hipocampo adulto mediante IF.

Cultivo primario de neuronas hipocampales: Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron preparados a partir de ratones en el día 18 de gestación (E18). Los ratones fueron sacrificados por luxación cervical, de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Copyright 1996, Academia Nacional de Ciencias). Luego se extrajeron los hemisferios cerebrales de los embriones de donde fueron disecados los hipocampos, en medio de disección (HBSS 1X, HEPES 10 mM), utilizando una lupa. El tejido obtenido fue digerido con tripsina 0.25 % p/v disuelta en PBS 1X (Buffer fosfato salino: Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 1.7 mM, NaCl 200 mM, pH 7.4), durante 15 min a 37 °C y posteriormente disgregado mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur. La suspensión celular fue sembrada sobre cubreobjetos de vidrio pre-tratados con poli-L-lisina en medio de adhesión (medio MEM, suero de caballo 10 %, ácido pirúvico 1 mM y glucosa 0.6 % v/v) a una densidad 3-5 x 10⁵ células/ml en placas de cultivo celular de 60 mm. Luego de 2 hrs de incubación a 37 °C el medio junto con las células no adheridas fue removido y reemplazado con medio de mantención (medio Neurobasal, suplemento B27 2% v/v, L-glutamina 0.5 mM, fungizona 1% v/v y penicilina/estreptomicina 1% v/v) y mantenidas en incubadora a 37 °C.

Para la mantención de las células, cada 72 a 96 hrs. se adicionó 1 ml de medio de mantención fresco en cada placa.

Inmunofluorescencia de cultivos neuronales sobre covers: Se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón 12 div, sembrados sobre covers de 10 mm de diámetro pre-tratados con polyilisina. Dichos covers fueron lavados una vez con 500 ul de PBS 1X, y luego incubados con 500 ul de PFA 4 % por 10 min a TA. Posterior a ello fueron tratados con 500 ul de solución de permeabilización (NP40 0,05 %, BSA 0,5 % en PBS 1X) por 10 min a TA. Y luego con 500 ul de NH₄Cl 50 mM por 10 min cada uno a TA para disminuir la autofluorescencia del tejido. Para el bloqueo se incubó con 500 ul de solución de bloqueo (BSA 0,5 % en PBS) por 10 min a TA. La incubación con anticuerpo primario se realizó en cámara húmeda a 4 ° C con 60 ul del anticuerpo primario diluido en solución de inmunofluorescencia (SFB 10 %, BSA 0,5 % en PBS 1X). Posterior a ello los covers fueron lavados 3 veces con solución de inmunofluorescencia por 5 min cada vez con agitación a TA. La incubación con anticuerpo secundario se realizó en cámara húmeda durante 1 hora a TA con 60 ul del anticuerpo secundario diluido en solución de IF, protegido de la luz. Luego los covers fueron lavados 3 veces con solución de IF 5 min cada una, a TA, con agitación. Para el montaje, los covers fueron lavados sumergiéndolos 3 veces en PBS 1X, luego 3 veces en PBS 0,1X. Tras eliminar el exceso de agua con un papel secante son montados en un portraobjetos con 2 ul de Vectashield. Los bordes son sellados con esmalte para evitar deshidratación y almacenados a 4 °C, protegidos de la luz.

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario
Antiklotho ABCAM ab75023	1:100	FIT-C Donkey anti-rabbit 1/400
Antiklotho Calbiochem 423500	1:100	FIT-C Donkey anti-rabbit 1/400
AntiMAP2 MAB378 Millipore	1:400	TRIT-C Donkey anti-mouse para 1/400
AntiGFAP sc166481 Santacruz	1:400	Cy5-C Donkey anti-mouse 1/400

1.6 Determinar si existen cambios en la expresión de klotho asociados a la edad mediante PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) a partir de tejido hipocampal obtenido de ratones de 3, 6, 12, 18, y 24 meses de edad.

Animales envejecidos: Camadas de ratones C57B6 hembras fueron mantenidos en bioterio en cajas de hasta 5 animales, con ciclos de luz oscuridad fijos de 12 hrs, con alimentación ad libitum hasta completar 3, 6, 12, 18, y 24 meses de edad.

Biblioteca de tejidos: Los animales fueron anestesiados con ketamina xylacina intraperitoneal, luego la sangre es extraída por punción cardiaca con jeringa heparinizada y el suero es separado por centrifugación a 3500 rpm por 5 min a TA. Se extrajeron muestras de corazón, pulmón, hígado, riñón y piel. Del cerebro es disecada la corteza, el cerebelo, y el hipocampo, las que son congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C.

PCR en tiempo real: Para la extracción de RNA hipocampal y posterior síntesis de cDNA se utilizó el método descrito previamente en métodos 1.1. Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el kit Brilliant II SYBRGreen QPCR Master Mix de Agilent Technologies (Catalog #600828), y un termociclador Stratagene Mx3005P QPCR system. Los primers utilizados fueron: mouse klotho sense: TCCATCTGGGACACTTTCAC ; mouse klotho antisense TAACTATCGCTGGCCACATC ; mnouse GADPH sense AGAAGGTGGTGAAGCAGGCA;

mouse GADPH antisense CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG, y la preparación del mix se hizo mediante la siguiente combinación de reactivos:

Reactivo	Cantidad
Master Mix	12,5 ul
cDNA	1 ul
Primer Sense	1 ul
Primer Anti-Sense	1 ul
Reference Dye	0,3 ul
Agua Libre de Nucleasas	9,2 ul

Y el siguiente patrón térmico:

Ciclos	Duración del ciclo	Temperatura
1	15 min	95 ° C
40	10 s	95 ° C
	30 s	60 ° C

Todas las muestras fueron procesadas en duplicado.

Validación del método de cuantificación por PCR tiempo real: Para validar la cuantificación utilizando el método de Delta Delta Ct (DDCt), se realizó una curva estándar basada en diluciones seriadas de un templado de cDNA de hipocampo de ratón control. Dicha curva estándar demostró un $r > 0.99$ y una eficiencia de 100 % en la amplificación del transcrito para los genes klotho y GADPH, lo que permite validar este método de cuantificación (Figura S2b).

Objetivo específico 2

Evaluar el efecto de la inhibición de klotho sobre la neurogénesis hipocampal en ratones adultos.

2.1 Evaluar la neurogénesis hipocampal en el cerebro del ratón KO de klotho

Animales KO de klotho: Cerebros fijados de 3 ratones KO de klotho y 3 compañeros de camada WT de 4 semanas de edad fueron donados por el Dr Reinhard Erben de la Universidad Veterinaria de Viena. Estos animales fueron perfundidos con PFA 4 % por inyección intracardiaca. Los cerebros fueron retirados del cráneo, dispuestos en tubos estériles de 2 ml en PFA 0,1 % y enviados a Chile.

Preparación de los Cerebros de los animales KO de klotho: Dichos cerebros fueron deshidratados en un gradiente de sacarosa al 30 % a 4 °C por 48 hrs, y luego fueron cortados utilizando un vibrátomo Leica VT1000-S (Leica Biosystems), obteniendo cortes seriados de hipocampo de 40 um de grosor. Estos cortes fueron recolectados en forma consecutiva en placas de 12 pocillos, de tal manera que al completar el corte de todo el hipocampo se obtienen 12 series con 5 cortes representativos de todo el hipocampo desde el polo anterior hasta el posterior. Estos cortes fueron almacenados en solución de criopreservación a -20 °C.

IF Ki67 y Dcx: Se utilizaron series de 5 cortes de cerebro almacenados a -20 °C en solución de criopreservación. Los tejidos fueron lavados 3 veces en PBS 1X por 5 min cada lavado. Luego fueron bloqueados durante 2 hrs con agitación con Solución de bloqueo (3 % suero normal, 0,25 % Tritón X-100, en PBS 1X. 1 ml por pocillo) en placa de 48 pocillos. Posterior a ello fueron incubados con anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 16 hrs a 4 °C con agitación. Luego, los cortes fueron lavados con PBS 1X por 3 veces, 5 min cada vez, en la misma placa, y posterior a ello incubados con anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 2 hrs con agitación a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después de eso fueron lavados 3 veces con PBS 1X , 5 min cada vez, y luego se tiñeron los núcleos utilizando Dapi por 10 min, y luego lavados 3 veces con PBS 1X , 5 min cada vez. Finalmente los cortes fueron dispuestos en portaobjetos, y cubiertos con medio de montaje vectashield (Vector Laboratories cat#H-1000) y los bordes sellados

con esmalte transparente. Estas inmunofluorescencias fueron almacenadas fuera de la luz a 4 °C.

Los anticuerpos primarios, sus concentraciones y anticuerpos secundarios se describen en la siguiente tabla:

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
AntiDoblecortina Santacruz 8066	1:200	TRITC Donkey anti-rabbit	1:250
AntiKI67 AB16667 ABCAM	1:400	TRITC Donkey anti-rabbit	1:250
AntiNeuN MAB377 Millipore	1:200	FITC Donkey anti-mouse	1:250
Dapi Thermo 62248	1:1000	No	No

Cuantificación de neurogénesis: La cuantificación de la neurogénesis se realizó contando el número total de núcleos Ki67 positivos en la región subgranular del giro dentado (considerada como la capa de hasta 2 núcleos por debajo del borde de la región granular delimitada por Dapi), así como el número total de células Dcx positivas en el giro dentado del hipocampo, utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon E400 con un aumento 40X, un contador de células y un tabla de registro. El número total de células Ki67 y Dcx positivas por animal corresponde al número total de células contadas en los 2 hipocampos de 5 cortes seriados de cerebro multiplicadas por 12, esto considerando que el volumen total de hipocampo fue distribuido en doce pocillos al momento de cortar los cerebros perfundidos.

2.2 Evaluar el efecto de la inhibición local de la expresión del gen *klotho* en el hipocampo sobre la neurogénesis en el giro dentado de ratones adultos

shRNA *klotho*: Cinco stock de bacterias, cada una portadora de un plasmidio pKO-U6 que contenía un shRNA anti-*klotho* fueron adquiridas en la compañía

Sigma-Aldrich, cat# SHCLNG-NM_013823. Las secuencias de los shRNA se detallan a continuación:

shRNA klotho	Secuencia
44	CCGGGCCTGCTTGTGGAGATTCTTCTCGAGAAGAATCTCCAACAAGCAGGCTTTTTG
45	CCGGGCCGACCATTTTCAGGGATTATCTCGAGATAATCCCTGAAATGGTCGGCTTTTTG
46	CCGGCGATAGTTACAACAACGTCTACTCGAGTAGACGTTGTTGTAACATCGTTTTTG
47	CCGGCCTAACATGAAGTTCGCCAACTCGAGTTGGCGGAACTTCATGTTAGGTTTTTG
48	CCGGGCGAATCAGTTTTGAGCCCAAACCTCGAGTTTGGGCTCAAACGATTCGCTTTTTG

Subclonación de shRNA: Los shRNA se encontraban clonados en el vector pLKO-U6, el cual permitía producir partículas lentivirales, pero sin expresar GFP, marca importante para la evaluación de la infección lentiviral *in vivo*. Por esta razón los shRNA fueron subclonados en el vector FUX-off mediante cortes con enzimas de restricción. Para ello 4 ug del vector pLKO-U6 portador del shRNA fueron digeridos con las enzimas de restricción ECOR1 (Fermentas cat# ER0271) y Cla I (NEB cat#R0197S) en Buffer 4 (NEB cat#B7004S) a 37 °C durante toda la noche. El producto de la digestión fue separado en un gel de agarosa al 1%, 80 V, por 75 min. La banda de DNA portadora del shRNA fue seleccionada por peso, y recuperada del gel utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28704). Diez micrógramos del vector FUX-off fueron digeridos utilizando la enzima EcoR1 (Fermentas cat# ER0721) en Buffer Tango 2X (Fermentas cat# BY5) a 37 °C toda la noche. Para la ligación 8 ul del DNA inserto y 1,6 ul del DNA del vector (relación 1:5) fueron ligados utilizando la enzima T4 ligasa (Fermentas Cat# EL0014) en buffer T4-Ligasa a temperatura ambiente durante toda la noche. A partir de estas ligaciones se transformaron bacterias E. coli TOP10 quimiocompetentes (Invitrogen cat# C4040-10) y para cada screening fueron clonados 3 colonias de bacterias a partir de las cuales se purificó el DNA plasmidial utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen Cat# 27106). Con este DNA se realizó un

screening de la clonación mediante corte con la enzima de restricción. Para ello, 1 ug de DNA fue digerido con la enzima Xho1 (Fermentas cat# ER0691) a 37 °C durante toda la noche. El producto de la digestión fue separado en un gel de agarosa al 1 %, a 80 V por 75 min. A partir de las colonias bacterianas con screening positivo se aisló el DNA plasmidial, utilizando el kit QIAprep Spin Maxiprep (Qiagen Cat#12362). Para confirmar la clonación el DNA plasmidial fue secuenciado por la empresa Retrogen, Inc. San Diego, California, Estados Unidos. Para ello, 1,5 ug de DNA de cada vector fueron enviados a la compañía, y la secuencia fue amplificada utilizando el partidador LK01.5: GACTATCATATGCTTACCGT. La secuencia obtenida fue revisada utilizando el programa Serial Cloner versión 2.1.

Producción de partículas lentivirales: La producción de partículas lentivirales se realizó mediante la transfección del DNA viral en células HEK-293T con fosfato de calcio. Para ello 24 hrs previo a la transfección 6 millones de células HEK-293T fueron sembradas en una placa de 10 cm previamente tratada con polyisina. 2 a 4 hrs antes de la transfección se reemplazó el medio por 10 ml de DMEM 10 % SFB a 37 °C. En un tubo de 15 ml estéril rotulado A fueron mezclados: 10 ug de vector de transferencia, 7,4 ug del DNA lentiviral Δ8.9, 5 ug del DNA lentiviral VSVg. Y 87 ul CaCl₂ 2M, y llevados a 700 ul con HEPES 2.5 mM pH 7.3. Con pipeta estéril se agregó gota a gota la solución del tubo A a un tubo de 15 ml estéril rotulado B que contenía 700 ul de HeBS 2x pH 7.00. Mientras se agregó la solución A sobre la B se mantuvo esta en burbujeo continuo. La mezcla fue incubada durante 20 min a TA, y luego fue agregada gota a gota sobre las células distribuyendo uniformemente. 16 hrs posterior a la transfección se lavan las células 2 veces con DMEM sin suero, y luego se dejaron incubando con 10 ml de DMEM 10 % SFB. 24 hrs post transfección (8 hrs después del paso anterior) se reemplazó el medio por 4 ml de DMEM 10 % SFB. y luego de 16 hrs fueron recolectadas las partículas lentivirales. Para ello, el medio de las células fue recolectado y centrifugado a 3000 rpm durante 5 min a TA. Luego el sobrenadante fue filtrado con un filtro estéril de 0.45 um, y el producto guardado en hielo para su concentración.

Concentración de partículas lentivirales:

a) Concentración por PEG: Por cada 16 ml de medio recolectado (4 placas de 10cm) se adicionaron 320 ul de SFB y 5,3 ml de PEG 8000 40 % estéril. La mezcla es almacenado a 4 °C. Por 72 h. Luego, fue centrifugada a 4000 rpm por 10 min a 4 °C, se retiró el sobre nadante y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 1 min a 4 °C y luego fue retirado el exceso de PEG. El pellet obtenido fue resuspendido en 150 ul de PBS 1X frío, y conservado en hielo. Se generaron alícuotas de 10 ul, las que se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

b) Concentración por ultracentrífuga: 40 ml de sobrenadante, proveniente de 10 placas de 10 cm transfectadas, fueron centrifugados a 28000 rpm durante 90 min a 4 °C, en un rotor 80 Ti en una ultracentrífuga Beckman, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile. Posterior a la ultracentrifugación el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 100 ul de PBS 1X frío. Se generaron alícuotas de 10 ul, las que fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Titulación de partículas lentivirales: Fueron sembradas 2×10^5 células Hek 293-T por pocillo en placas de 6 pocillos, en 2 ml de medio de cultivo DMEM suplementados con SFB 10 %, considerando 2 pocillos por cada punto de dilución (habitualmente 5), y un blanco. Cinco ul del virus a titular fueron diluidos en 45 ul de PBS estéril asegurando una mezcla homogénea. Se toman 5 ul de esta dilución y se diluyen nuevamente en 45 ul de PBS estéril. Se repitió el procedimiento hasta tener 4 puntos dilución. 2 a 4 hrs. posterior a la siembra (observando que las células estén completamente adheridas al fondo de la placa), se retiró 1 ml del medio de cultivo y se agregaron 10 ul de la dilución de virus en PBS. Las células fueron llevadas a la incubadora a 37 °C por 72 hrs. Posterior a ello se retiró cuidadosamente el medio de cultivo, se lavó la placa 1 vez con 1 ml de PBS estéril

a 37 °C, se agregaron 300 ul de tripsina y se llevó a 37 °C por 1 min. Se agregan 700 ul de medio DMEM suplementado con SFB 10 %, y se recolectaron las células en tubos de 1,5 ml estériles. Luego, estos tubos fueron centrifugados a 2000 rpm por 2 min, TA, se retiró el sobrenadante y se agregaron 250 ul de buffer de lavado (BSA 1 %, NaN₃ 0,1 % en PBS) y 250 ul de formalina al 4 % en PBS. Estas muestras fueron almacenadas a 4 °C en oscuridad hasta ser observadas en citómetro. Para ello, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 2 min, se retiró el sobrenadante, y el pellet fue resuspendido en 500 ul de medio de citómetro de flujo (FACSFlow cat# 342003) Estas células fueron analizadas por un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California) cuantificando el número de cuentas GFP positivas de un total de 10.000 eventos, utilizando el programa FACSDiva v1.4. Para determinar el título se determinó la menor dilución con la que se observaron células GFP positivas, se cuantificó el porcentaje de células GFP positivas con dicha dilución (habitualmente entre 5 y 10 %), y con ello se calculó el número de células infectadas, considerando que al momento de la infección habían 2x10⁵ células HEK por pocillo. El título (número de células infectadas por microlitro de virus) corresponde al número de células infectadas multiplicado por el factor de dilución del virus, número que habitualmente se expresa en la literatura como número de células infectadas por ml de virus.

Virus	%	HEK	Dilución	Células infectadas	Título	Por ul	Por ml
shRNA-scr	8,5	2x10 ⁵	1:10	17000	170000	1,7x10 ⁵	5,3x10 ⁸
shRNA-kl1	3,6	2x10 ⁵	1:100	7200	720000	7,2x10 ⁵	7,2x10 ⁸
shRNA-kl2	8	2x10 ⁵	1:10	16000	160000	1,6e10 ⁵	1,6e10 ⁸

Estereotaxia: Procedimiento se realizo en sala de cirugía del laboratorio CEMC. Se utilizaron ratones C57B6J, hembras, de 5 meses de edad. Para la anestesia se utilizó una inducción con isoflurano seguida de una mezcla de ketamina y xilacina en dosis ajustada por peso, y administrada por vía intraperitoneal. Todo el material quirúrgico es esterilizado por UV. Para la inyección se utilizó una jeringa Hamilton 95RN (cat# 7647-01) con una aguja hamilton 33G; 1,5"; PT4 (cat# 7803-05) la que fue cargada con solución con lentivirus en campana para virus, y

luego montada en micromanipulador de estereotaxia con contador digital de la compañía Stoeling® (Cat# 51928). Una vez anestesiado, el animal fue dispuesto en el micromanipulador donde se fijó desde el cráneo, ajustando el maxilar superior y los canales auditivos. Se administraron lagrimas artificiales en gel y se realizó una incisión en la línea media del cuero cabelludo. Tras localizar el bregma, se establecieron las coordenadas que corresponden al punto cero. Se localizaron las coordenadas en el sitio de inyección en giro dentado -0,2 posterior (X) y -0,2 lateral (Y). Con dremmel se realiza una craniectomía en el punto definido. Tras bajar la punta de la aguja hasta el punto de la craniectomía se utilizó un contador digital y se introdujo la aguja en parénquima cerebral a una velocidad de 0.01 mm por segundo hasta -1,85 mm bajo bregma (Z). En la posición adecuada se inyectó 1,5 ul de solución con lentivirus a una velocidad de 0,3 ul por minuto. Una vez inyectado, se esperó 5 min. con la aguja en dicha posición. Se retiró la aguja a una velocidad de 0.01 mm por segundo hasta la posición -1,40 mm bajo bregma, y se esperó un min. Luego, se completa el retiro de la aguja. Se liberó el animal del micromanipulador, y se suturó la herida, con dos puntos separados, para luego llevar al animal a la caja postoperatoria previamente entibiada. El material desechable utilizado fue eliminado en contenedores para desecho con riesgo biológico en campana de virus. Se considero como una buena infección aquella que mostraba células GFP en todos los cortes desde anterior hasta posterior y que en los cortes tenia células GFP positivas en todas las capas de la región granular determinada por Dapi.

rtPCR en hipocampo total

Animales: 12 ratones C57B6 hembras de 5 meses de edad que fueron infectados con lentivirus shRNA-kl1, shRNA-kl2 y shRNA-scr (4 animales por grupo) fueron sacrificados y se extrajo el hipocampo infectado cuatro semanas posterior a la cirugía, como fue descrito previamente en estos métodos.

Extracción de RNA, síntesis de cDNA y rtPCR: La extracción de RNA y la síntesis de cDNA a partir de hipocampos de ratones adultos fue descrita previamente en esta metodología, así como la validación y metodología del rtPCR. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Perfusión y preparación de tejidos:

Tratamiento con BrdU: 4 semanas posterior a la cirugía estereotáxica, los animales recibieron 100 mg/kg/día de BrdU ip. por tres días consecutivos (BrdU Sigma cat# B5002).

Perfusión y preparación de tejidos de animales: 24 hrs. posterior a la última inyección de BrdU, los animales fueron perfundidos con paraformaldehído 4 % mediante punción intracardiaca como se describió previamente en los métodos. Estos cerebros fueron cortados utilizando un vibrátomo Leica VT1000-S (Leica Biosystems), obteniendo cortes de hipocampo de 40 μ m, los que fueron recolectados en forma consecutiva en placas de 12 pocillos, y almacenados en solución de criopreservación a -20 °C como se describió previamente.

a) Inmunofluorescencia de BrdU en tejidos: Se utilizaron series de 6 cortes de cerebro almacenados a -20 °C en solución de criopreservación. Los tejidos fueron lavados 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada lavado y tratados con HCL 2M por 15 min a 37 °C. Luego fueron lavados 6 veces en PBS 1X por 5 min cada lavado. Para el bloqueo, los cortes fueron embebidos con solución de bloqueo (3 % SFB, 0,25 % Tritón X-100, en PBS 1X. 1 ml por pocillo) en placa de 48 pocillos durante 2 hrs con agitación. Posterior a ello fueron incubados con anticuerpos primarios antiBrdU (ABCAM cat# AB6326) y anti-Dcx (Santacruz cat# 8066) en solución de bloqueo durante 16 h a 4 °C con agitación. Luego fueron lavados con PBS 1X por 3 veces, 5 min cada vez, en la misma placa. Posterior a ello fueron incubados con anticuerpos secundarios en solución de bloqueo por 2 hrs con agitación a

temperatura ambiente protegidos de la luz, y luego fueron lavados 3 veces con PBS 1X , 5 min cada vez, y marcados con el trazador nuclear Dapi. Para ello los tejidos fueron incubados en una solución 1:1000 Dapi en PBS 1X por 10 min, y luego lavados 3 veces con PBS 1X , 5 min cada vez. Finalmente los cortes fueron dispuestos en portaobjetos, y tras dejar secar unos 2-3 minutos fueron cubiertos con 6 ul de medio de montaje Vectashield (Vector Lab cat#H-1000) y los bordes sellados con esmalte transparente. Estas inmunofluorescencias fueron almacenadas fuera de la luz a 4 °C.

Cuantificación de neurogénesis en hipocampos infectados por estereotaxia:

La cuantificación de la neurogénesis se realizó contando el número total de núcleos Ki67 positivos en la región subgranular del giro dentado (Considerada como la capa de hasta 2 núcleos por debajo del borde de la región granular delimitada por Dapi), así como el número total de células Dcx positivas en el giro dentado del hipocampo, utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon E400 con un aumento 40X, un contador de células y un tabla de registro. Fueron cuantificados tanto los hipocampos infectados como los contralaterales, llevando registros independientes para ambos conteos. El número total de células Ki67 y Dcx positivas por hipocampo corresponde al número total de células contadas en 6 hipocampos, en 6 cortes consecutivos de cerebro, multiplicadas por 12, esto considerando que el volumen total de hipocampo fue distribuido en doce pocillos. El espesor de las rebanadas de cerebro al momento del corte era de 40 um, y pero posterior al proceso de inmunofluorescencia median 28 +/- 2,2 um, y en promedio se cuantificaron 23 células con tinción positiva por corte, lo que hacia posible la cuantificación del nomer total de células positivas para una determinada tinción.

Objetivo específico 3:

Evaluar el efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores neuronales de ratón adulto en cultivo

3.1 Cultivos de progenitores hipocampales de ratón adulto

Técnica de Cultivo de progenitores hipocampales de ratón adulto: Los ratones fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestésico (ketamina/xilacina). El cerebro fue removido del cráneo y puesto en una placa de petri estéril con PBS-G (Glucosa 30 mM en PBS) Se recolectaron 6 cerebros (12 hipocampos) por cultivo de progenitores. Bajo lupa fueron disecados los hipocampos, y puestos en medio NPC basal (Neurobasal-A 95 ml (Gibco cat# 10888), B27 sin vitamina A 2 ml (Gibco, cat# 12587010) Glutamax 1 ml (Gibco, cat# 35050) Fungizone 1 ml (Gibco, cat. no. 15290-018) Penicilina/Estreptomicina 1 ml (Gibco, cat# 15070-063)). Luego se extrajo el medio y se adicionó solución PDD ((750 ul Papain (Worthington cat# LS003126) 200 mg Dispase (Roche cat# 165859) 14,7 mg DNase (Worthington cat# X1B656) precalentada a 37 °C, considerando una cantidad aproximada de 1 ml por hipocampo. Los hipocampos en PDD fueron dejados en un baño a 37 °C por 20 min y mezclados suavemente cada 5 min. Se trituraron los tejidos en PDD pasándolos por una pipeta 3 a 4 veces, se regresaron al baño a 37 °C por 20 min. Los hipocampos fueron triturados nuevamente pasándolos por una pipeta 8 a 10 veces más. Posterior a ello se centrifugó cada el tubo a 200G rpm por 5 min. Posterior a ello se remueve el PDD y se agregaron 10 ml de medio NPC basal a 37 °C y nuevamente se centrifugó a 200 G por 5 min. Se Repetió este lavado dos veces. Se removió el medio y se adicionan 3,9 ml de PBSG y 1,1 ml de solución de percoll (9 ml de percoll en 1 ml de PBS 10X). Los hipocampos disgregados en percoll fueron mezclados cuidadosamente y el tubo fue centrifugado a 250G por 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue removido cuidadosamente manteniendo el pellet, el cual fue resuspendido en medio NPC basal. Este fue centrifugado a 200G por 5 min. El sobrenadante fue removido y el pellet resuspendido en medio NPC de proliferación (Neurobasal-A 95 ml (Gibco cat# 10888), B27 sin vitamina A 2 ml (Gibco, cat# 12587010) Glutamax 1 ml (Gibco,

cat# 35050) Fungizone 1 ml (Gibco, cat# 15290-018) Pen/Strep 1 ml (Gibco, cat# 15070-063) FGF-2 20 ng/ml (Peprotech, cat# AF-100-18B-B) EGF 20 ng/ml (Peprotech, cat# AF-100-15)). Esta mezcla fue sembrada en una placa de 60mm pretratada con polyilisina (Sigma cat#P7405) y laminina 5 ug/ml en DMEM (Roche cat#11243217001) Luego de dos días el medio fue removido y cambiado por medio fresco.

3.2 Evaluar la proliferación celular en cultivos de progenitores hipocampales de ratón adulto estimulados con la proteína klotho recombinante

Estimulo klotho recombinante Progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo fueron sembrados en placas de 24 pocillos sobre covers para inmunofluorescencia pretratados con polyilisina (Sigma cat#P7405) y laminina 5ug/ml (Roche cat#11243217001) a una densidad de 4×10^4 células por pocillo. Cinco covers fueron mantenidos en medio NPC proliferación y 5 en NPC proliferación más proteína klotho recombinante (R&D cat kl-5334) a una concentración de 400 nM por 24 hrs. Posterior a ello todos fueron marcados con BrdU por 3 hrs, y luego fijados con paraformaldehido-sacarosa al 4 % en PBS.

Inmunofluorescencia Nestin - BrdU: Para ello, dichos covers fueron lavados una vez con 500 ul de PBS 1X, y luego incubados con 500 ul de HCL 2 M por 20 min a TA. Posterior a ello fueron lavados con 500 ul de PBS por 7 veces, 5 min cada vez, con agitación. Posteriormente fueron tratados con 500 ul de solución de permeabilización (Tritón-X100 0,2% en PBS) por 5 min a TA, y luego se lavaron con 500 ul de PBS 1X 3 veces por 3 min cada uno a TA. Para el bloqueo se incubó con 500 ul de solución de bloqueo (BSA 1% en PBS. 1 ml por pocillo) por 10 min a TA. La incubación con anticuerpo primario se realizó en cámara húmeda a 4 °C con 60 ul de solución de anticuerpo primario en solución de bloqueo. Posterior a ello los covers fueron lavados 3 veces con PBS 1X por 5 min cada vez con agitación a TA. La incubación con anticuerpo secundario se realizó en cámara húmeda

durante 1 hora a TA con 60 ul del anticuerpo secundario diluido en BSA 1 % en PBS, protegido de la luz. Luego los covers fueron lavados 3 veces con PBS 1X 5 minutos cada una, TA, con agitación. Para el montaje, los covers fueron lavados sumergiéndolos 3 veces en PBS 1X, luego 3 veces en PBS 0,1X. Tras eliminar el exceso de agua con un papel secante fueron montados en un portraobjetos con 2 ul del medio de montaje Vectashield (Vector Lab cat#H-1000). Los bordes fueron sellados con esmalte para evitar deshidratación y almacenados a 4 °C, protegidos de la luz.

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
Anti-Nestin	1:100	FIT-C Donkey anti-mouse	1:400
Anti-BrdU	1:100	FIT-C Donkey anti-rat	1:400
Dapi	1:1000	No	No

Cuantificación proliferación: De cada cover se obtuvieron 10 fotos aleatorias con magnificación 40X, y se contabilizó el numero de células Nestin/BrdU positivas en relación al total de núcleos (Dapi). Para todos los covers el número de células Nestin correspondía a más del 90% de los núcleos. El resultado fue expresado como el número de células BrdU/Nestin positivas por cada 100 núcleos.

Bioética: El proyecto, y el uso de animales de experimentación asociados a él, fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad de Chile, resolución CBA#0481 FMUCH 02 de Noviembre de 2011.

Estadística: Los resultados fueron analizados utilizando el programa Prism® versión 6, de Graphpad Incorporated. Se realizó comparación de promedios utilizando la prueba no paramétrica de Mann Whitney, y los resultados fueron presentados como promedio +/- desviación estándar (ds), considerando como significativa una diferencia asociada a un error alfa menor al 5%.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Caracterización de la Expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos.

1.1 Expresión del transcrito y la proteína klotho en hipocampos de ratones adultos.

Mediante PCR se determinó la expresión de klotho en hipocampo de ratones adultos a partir de una biblioteca de cDNA de hipocampo total. Como control positivo se utilizó cDNA obtenido a partir de riñón de ratón adulto, como control negativo cDNA de hígado de ratón adulto WT, y como control de carga el gen GADPH (Figura 1a).

Utilizando WB se determinó la expresión de la proteína klotho en hipocampo total, utilizando el anticuerpo anti-klotho ABCAM ab75023. Como control positivo se utilizó extracto de proteínas obtenido a partir de riñón de ratón adulto WT, como control negativo extracto de proteínas de hígado de ratón adulto WT, y como control de carga tubulina (Figura 1b). La banda obtenida con el anticuerpo anti-klotho fue de 117 kDa, y mostró un doble-bandeo descrito por el proveedor del anticuerpo, pues éste detecta tanto la proteína transmembrana como la clivada por metaloproteinasas.

1.2 Localización de la expresión de hipocampal de klotho mediante inmunohistoquímica en ratones adultos.

El sitio de expresión hipocampal de klotho fue determinado mediante inmunohistoquímica, la que fue controlada utilizando dos anticuerpos anti-klotho distintos, cuya región antigénica estaba dirigida a diferentes epítopes de la proteína: 1) el anticuerpo ABCAM ab69208, dirigido a un epítope ubicado cerca de la región N-terminal, y 2) el anticuerpo Calbiochem 423500 dirigido a un epítope ubicado cerca de la región C-terminal de la proteína. La señal obtenida a partir de inmunohistoquímicas

realizadas con ambos anticuerpos fue similar, mostrando que la expresión de la proteína klotho se encontraba en la región granular del giro dentado (región donde se insertan las nuevas neuronas producidas durante la neurogénesis del adulto), en el hilus del giro dentado, y en las regiones CA1 y CA3 del Cuerno de Amón (Figura 2 y S1).

El anticuerpo Calbiochem 423500 permitió realizar experimentos de inmunofluorescencia en tejido. La señal fluorescente de estos experimentos fue controlada utilizando cortes de cerebro del ratón KO de klotho, el que fue obtenido mediante una colaboración con el Dr Erben Reinhold, Universidad de Medicina Veterinaria, Viena, Austria. El patrón de expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos obtenida por inmunofluorescencia fue similar al observado por inmunohistiquímica (Figura 3), encontrándose expresión en la región granular del giro dentado, en el hilus del giro dentado, y en las regiones CA1 y CA3 del Cuerno de Amón. Se encontró además la expresión de klotho en otras regiones cerebrales con conocida expresión de klotho, como la sustancia blanca y el plexo coroídeo. Mediante co-inmunofluorescencia se estudió con más detalle la expresión de klotho en el giro dentado. Al comparar la expresión de klotho con la de NeuN (marcador neuronal que permite delimitar la extensión de la región granular) se observó que la expresión de klotho se concentraba en las capas 2 y 3 de la región granular del giro dentado, con una menor expresión en la capa 1 y en la región subgranular (Figura 4a), siendo un patrón de expresión opuesto al que se observó con el marcador de progenitores neuronales Sox-2 (Figura 4b). La expresión de klotho observada en el hilus del giro dentado se vio tanto en células NeuN positivas (neuronas), como con células NeuN negativas, probablemente glías que residen en esa región (Figura 4a).

1.3 Tipos celulares que expresan klotho en el hipocampo.

A partir de experimentos de inmunofluorescencia en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón se demostró la expresión de la proteína klotho en células que expresan el marcador neuronal MAP2 (Figura 5). No se observaron células

que coexpresaran el marcador astrocitario GFAP y klotho. Se observó una señal klotho positiva, MAP2 negativa, GFAP negativa (Figura 5), que correspondería a la expresión en oligodendrocitos, previamente descrita en la literatura (Clinton Brain Res 2013).

Experimentos realizados utilizando dos anticuerpos comerciales dirigidos contra epítipes distintos de la proteína mostraron el mismo resultado (ABCAM cat#ab75023 y Calbiochem cat#423500) (Figura S3).

1.4 Cambio en la expresión de klotho en el hipocampo asociado a la edad.

Utilizando muestras de hipocampo total obtenidas de grupos de ratones de 6, 12, 18 y 24 meses de edad (4 a 5 animales por grupo) se evaluó el cambio de expresión de klotho hipocampal asociado a la edad mediante qRT-PCR. Utilizando esta técnica se observó que la expresión hipocampal de klotho en ratones se mantuvo estable durante el envejecimiento (Figura 6).

Objetivo específico 2: Evaluar el efecto de la pérdida de función local y sistémica de *klotho* sobre la neurogénesis hipocampal del adulto

2.1 Evaluación de la neurogénesis en el hipocampo del ratón KO de *klotho*

Utilizando cortes seriados representativos de todo el hipocampo del ratón KO de *klotho* y controles WT se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para el marcador de proliferación celular Ki67, y se encontró un mayor número de células positivas para Ki67 en la región subgranular del giro dentado del ratón KO de *klotho* que en controles WT (Ratón KO *klotho*: 1272ds +/- 418 versus ratón WT 400 ds +/- 106, t test $p=0,0189$, $n=3$ animales por grupo, conteo de 10 hipocampos por ratón) (Figura 7).

De manera similar se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para el marcador de neuronas en maduración Dcx, donde se encontró un mayor número de células Dcx positivas en el giro dentado del hipocampo de ratones KO de *klotho* comparado con controles WT (Ratón KO *klotho*: 4180ds +/- 616 versus ratón WT 1704 ds +/- 588, t test $p=0,005$, $n=3$ animales por grupo, conteo de 10 hipocampos por ratón) (Figura 8).

2.2 Inhibición local de la expresión de *klotho* en el hipocampo de ratones adultos

Cuatro shRNA para el gen *klotho* y un shRNA scrambled fueron clonados en forma independiente, mediante cortes con enzimas de restricción, en el vector FUX/OFF-GFP. Utilizando estos vectores se produjeron partículas lentivirales. Un screening *in vitro* mostró que dos de estos shRNA anti-*klotho* disminuían de manera importante la expresión del gen *klotho* en líneas celulares medido por qrtPCR, y éstos virus fueron utilizados para pruebas *in vivo* mediante experimentos de inyección del vector en el hipocampo de ratones adultos mediante cirugía esterotáxica. La extensión de la infección lentiviral podía observarse siguiendo la expresión de GFP por parte de

las células infectadas. La infección se extendió desde el polo anterior hasta los segmentos más posteriores del hipocampo utilizando un único sitio de infección (Figura 9). Estudios con inmunofluorescencia contra Caspasa 3 realizados en rebanadas de hipocampos infectados con los lentivirus descartaron un aumento de la muerte celular en los organos infectados (Figura S4).

Utilizando hipocampos de ratón adulto infectados con lentivirus por 4 semanas se observó mediante rtPCR una caída significativa en la expresión del gen *klotho* (n= 4 animales por grupo, Mann Whitney, p=0,0286 para shRNA-kl1 v/s shRNA-scr y para shRNA-kl2 v/s shRNA-scr) (Figura 10).

2.3 Evaluación de la neurogénesis en el hipocampo del ratón con inhibición local de la expresión hipocampal de *klotho*.

Para el estudio de la neurogénesis se analizaron hipocampos de ratones infectados mediante estereotaxia con virus shRNA anti-*klotho* y shRNA scrambled. Para ello se estudió cortes seriados de hipocampo mediante inmunofluorescencia cuantificando el número total de células Ki67 positivas en la región subgranular del giro dentado. Utilizando este marcador se observó un menor número de células Ki67 en los hipocampos infectados con ambos shRNA interferentes de *klotho* comparados con los infectados con shRNA scrambled (shRNA-scr: 948 ds +/- 132 versus shRNA-kl1: 456 ds +/- 24, Mann Whitney p=0,0286, n= 4 animales por grupo; shRNA-scr: 948 ds +/- 132, versus shRNA-kl2: 750 ds +/- 90 p=0,06, n= 4 animales por grupo), y con los hipocampos contralaterales al sitio de la estereotaxia (Contralateral shRNA-kl1: 1002 ds +/- 78 versus shRNA-kl1: 456 ds +/- 24, Mann Whitney p=0,0286, n= 4 animales por grupo; Contralateral shRNA-kl2: 1188 ds +/- 276 versus shRNA-kl1: 750 ds +/- 90, Mann Whitney p=0,0857, n= 4 animales por grupo) (Figura 11).

Utilizando la misma técnica, se evaluó el número total de células Dcx positivas en la región granular del giro dentado. Con este marcador se observó un menor número de células Dcx positivas en los hipocampos infectados con ambos shRNA

interferentes de klotho comparados con los infectados con shRNA scrambled (shRNA-scr: 1821 ds +/- 380 versus shRNA-kl1: 69 ds +/- 30, Mann Whitney p=0,0286, n= 4 animales por grupo; shRNA-scr: 1821 ds +/- 380, versus shRNA-kl2: 594 ds +/- 90, Mann Whitney p=0,0286, n= 4 animales por grupo) o con los hipocampos contralaterales (Contralateral shRNA-kl1: 2541 ds +/- 561 versus shRNA-kl1: 69 ds +/- 30 Mann Whitney p=0,0286, n= 4 animales por grupo; contralateral shRNA-kl2: 1827 ds +/- 513 versus shRNA-kl2: 594 ds +/- 90, Mann Whitney p=0,0286, n= 4 animales por grupo) (Figura 12).

Objetivo específico 3: Evaluar el efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo.

3.1 Cultivo de progenitores neuronales de hipocampo adulto.

La implementación del protocolo de cultivo de progenitores hipocampales de ratón adulto en Chile se realizó en el laboratorio de la Dra Lorena Varela-Nallar, Facultad de ciencias Biológicas Universidad Andrés Bello, como parte de la tesis de magíster de Gabriela Andaur y de pregrado de Sebastián Bustamante. De los cultivos ahí realizados, más del 90% de las células obtenidas mediante esta técnica expresaban los marcadores de progenitores neuronales nestin y sox2 (Figura 13a). Estas células puestas en condiciones de diferenciación cambiaban su morfología y expresaban el marcador neuronal Map2 por inmunofluorescencia. (Figura 13b).

3.2 Expresión de klotho en cultivo de progenitores neuronales de hipocampo adulto.

Utilizando progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo, se estudió la expresión de klotho durante el proceso de diferenciación de dichas células. Mediante PCR convencional se observó que el gen klotho no se expresa en progenitores neuronales en condiciones indiferenciadas, ni tras dos días de cultivo en condiciones de diferenciación, siendo posible encontrar la expresión de klotho tras 4 días de cultivo en condiciones de diferenciación (Figura 14).

3.3 Efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores neuronales de ratón adulto en cultivo.

La adición de la proteína klotho recombinante al medio de cultivo de progenitores hipocampales de ratón adulto produjo un aumento en el número de células BrdU/Nestin positivas (Control: 13.47% ds +/- 1,73 versus Estímulo Klotho: 21,28%

ds +/- 3,7, Mann Withney test $p=0,0079$, $n=5$ experimentos control; $n=5$ experimentos klotho, cada experimento corresponde al conteo de 10 imágenes aleatorias) (Figura 15). Este dato fue concordante, tanto en magnitud como en sentido, con un experimento realizado durante el aprendizaje de la técnica de cultivo de progenitores en el laboratorio en EEUU, donde la proliferación fue cuantificada mediante la técnica de MTT y controlada con el uso de wnt3a y sFRP (Figura S5).

Discusión

En conjunto estos resultados demuestran que klotho se expresa en la región granular del giro dentado de ratones adultos, y que participa de la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto.

Expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos

La expresión del mRNA de klotho en el hipocampo adulto es concordante con una síntesis local de klotho en el hipocampo, y el tipo de señal obtenida con el WB, con una doble banda, es compatible con que el fenómeno de clivaje de la proteína descrito en otros tejidos, ocurriría también en el hipocampo.

Resulta interesante la concordancia entre los experimentos de expresión de klotho en células en cultivo, con la localización espacial de la expresión en el giro dentado y su relación con el nicho neurogénico. Al analizar la expresión de klotho en progenitores hipocampales en cultivo se observó que la expresión del transcrito no ocurre en estadios indiferenciados, sino una vez avanzada la diferenciación (después del cuarto día). En concordancia, los estudios de inmunofluorescencia en cultivos primarios de neuronas hipocampales mostraron la expresión de klotho en neuronas de fenotipo maduro, 12 div. La localización espacial de la expresión klotho en el giro dentado hace sentido con esas observaciones, evidenciando una menor expresión de klotho en la región subgranular y en la capa 1 del giro dentado, nicho donde residen los progenitores neuronales y ocurren los estadios iniciales de diferenciación, y una mayor expresión de klotho en las capas 2 y 3, lugar donde se insertan las neuronas con procesos de diferenciación más avanzado.

La falta de cambio de la expresión hipocampal de klotho durante el envejecimiento es concordante con datos publicados previamente que muestran que

la expresión hipocampal de klotho en monos rhesus se mantiene estable durante el envejecimiento (King, Age (Dordr) 2012).

Rol de klotho en la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto.

La inhibición de la expresión de klotho, tanto en el ratón KO de klotho como en el modelo de inhibición local en el hipocampo, tiene efectos sobre el número de células proliferando en la región subgranular del giro dentado, y sobre el número de células en diferenciación a neuronas en la región granular del giro dentado.

El ratón KO de klotho muestra un mayor número de células proliferando en la región subgranular del giro dentado que controles WT. Estos resultados son concordantes con datos de la literatura, que mostraban que el ratón KO de klotho tiene un mayor número de células progenitoras en proliferación y una mayor actividad de la vía canónica de wnt -conocida estimuladora de la proliferación de progenitores en distintos nichos- en médula ósea (Liu, Science 2007). Este efecto de mayor proliferación en el ratón KO de klotho se observa previo al desarrollo del fenotipo de progeria, mismo estadio de desarrollo en el que se encontraban los animales utilizados para los experimentos de esta tesis.

Se observó además en este modelo un aumento en el número total de células que expresan el marcador de diferenciación neuronal precoz Dcx, en la región granular del giro dentado. Este resultado en conjunto con el aumento del número de células Ki67 positivas es concordante con un aumento en la neurogénesis hipocampal en el ratón KO de klotho. Sin embargo, no es posible afirmar con la metodología desarrollada en esta tesis que el cambio en el número de células Dcx positivas sea secundario a un rol de klotho en el proceso de diferenciación neuronal o al aumento del número total de progenitores proliferando.

En este punto, los resultados son concordantes con la hipótesis planeada de que klotho sería un inhibidor de la neurogénesis hipocampal del adulto. Sin embargo,

el modelo del ratón KO de klotho dificulta la interpretación del papel directo que juega la expresión hipocampal de klotho en la neurogénesis del adulto. Esto debido a los múltiples sitios de expresión de klotho en el organismo y su rol como factor circulante, pues recientemente se han descrito múltiples asociaciones entre factores circulantes capaces de regular la neurogénesis hipocampal (Yates Nat Rev Neurosci 2014). Por otro lado existe gran cuestionamiento en la literatura sobre si los cambios fenotípicos observados en el ratón KO de klotho son efecto directo del déficit de klotho o secundarios a cambios en otros mediadores que actúan como intermediarios, en particular al importante aumento en los niveles de FGF23 y a la hipervitaminosis de D que muestra este animal (Kuro-O, Pflugers Arch – Eur J Physiol 2010; Anour, PlosOne 2012). Este último elemento es relevante pues datos en la literatura muestran que la vitamina D participaría de la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto (Zhu, Hippocampus 2012).

Considerando estos elementos los estudios de inhibición local de la expresión de klotho son fundamentales para comprender su rol directo en la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto.

Los datos de interferencia local de la expresión del gen klotho, y de estimulación directa de progenitores hipocampales de ratón adulto muestran que la expresión hipocampal de klotho estimularía la proliferación de progenitores neuronales en el hipocampo adulto, resultados que son discordantes con el modelo del ratón KO de klotho.

Las diferencias encontradas en el efecto sobre la neurogénesis entre el ratón KO de klotho y la interferencia local de klotho en el hipocampo pueden explicarse por diferencias entre los modelos -como la temporalidad de la inhibición del gen, la intensidad de dicha inhibición, o la presencia de mecanismos compensatorios asociados a la ausencia del gen-, o a la participación de mediadores entre la expresión sistémica de klotho y su efecto sobre los progenitores, los que no se verían alterados en el modelo de interferencia local.

En esta tesis no se abordó el mecanismo mediante el cual klotho regularía la proliferación de progenitores neuronales. Datos publicados en la literatura mostraban que klotho actúa como un inhibidor de la vía canónica de wnt y como un inhibidor del factor de crecimiento fibroblástico FGF-2, ambos reconocidos estimuladores de la neurogenesis del adulto y de la proliferación de progenitores neuronales. Esta información hacía presumir que klotho actuaría como un inhibidor de la neurogénesis, dato opuesto al observado en los resultados de esta tesis (Gosh, Neuron 1995; Lie Nature 2005). En relación a esto, es interesante recordar la interacción de klotho con el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23), pues la activación de esta vía lleva a un aumento en la actividad AKT y con ello a un estado de proliferación celular. A la fecha no se ha descrito ninguna asociación entre FGF-23 y el proceso de neurogénesis.

Los datos obtenidos en esta tesis permiten ahondar el conocimiento sobre la proteína klotho, describiendo su expresión en el giro dentado de ratones adultos, y estableciendo un rol funcional para ésta en la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto, contribuyendo así con la caracterización de un nuevo regulador de dicho proceso, no descrito previamente.

La descripción de klotho como un regulador de la neurogénesis en condiciones normales es el primer paso para estudiar su rol en otras condiciones como el envejecimiento normal o asociado a patologías en las que ha sido descrito un cambio en su expresión, como por ejemplo, en la enfermedad de alzheimer (Li, PNAS 2010).

Limitaciones experimentales del estudio

Entre las limitaciones de este trabajo destaca la dificultad en montar la técnica de WB de klotho. Los resultados expuestos fueron logrados utilizando el anticuerpo anti-klotho ABCAM AB75023 el cual se encuentra actualmente descontinuado por el proveedor. Se intentó replicar este experimento con otros anticuerpos, pero no fue

posible obtener una señal consistente. Esta dificultad limita por un lado la caracterización de la expresión hipocampal de klotho y por otro la evaluación del efecto de los shRNA anti-klotho sobre la expresión de klotho, pues sólo pudo ser caracterizado por rtPCR.

Otra de las limitaciones metodológicas tuvo relación con la reacción inflamatoria hipocampal secundaria a las inyecciones estereotáxicas, las que imposibilitaban la cuantificación de la neurogénesis. La solución de este problema implicó un cambio en las coordenadas de inyección estereotáxica, lo que se asoció a un menor rendimiento de inyecciones exitosas, limitando severamente el número de animales disponibles para el análisis.

El estudio de la neurogénesis basado exclusivamente en la cuantificación de Ki67 es otra limitante, pues permite evaluar sólo el estado de proliferación de los progenitores al momento del experimento. Dado el corto tiempo de expresión de este antígeno nuclear no permite trazar con doble señal células con marcadores neuronales precoces y con ello no permite establecer con certeza el efecto sobre la neurogénesis, y no permite evaluar el efecto de la interferencia sobre el proceso de diferenciación neuronal de los progenitores.

Conclusión

En conjunto, estos resultados demuestran que klotho se expresa en la región granular del giro dentado de ratones adultos, y son concordantes con que participa de la regulación de la neurogénesis hipocampal del adulto, al menos a través de la regulación de la proliferación de progenitores neuronales.

Figuras:

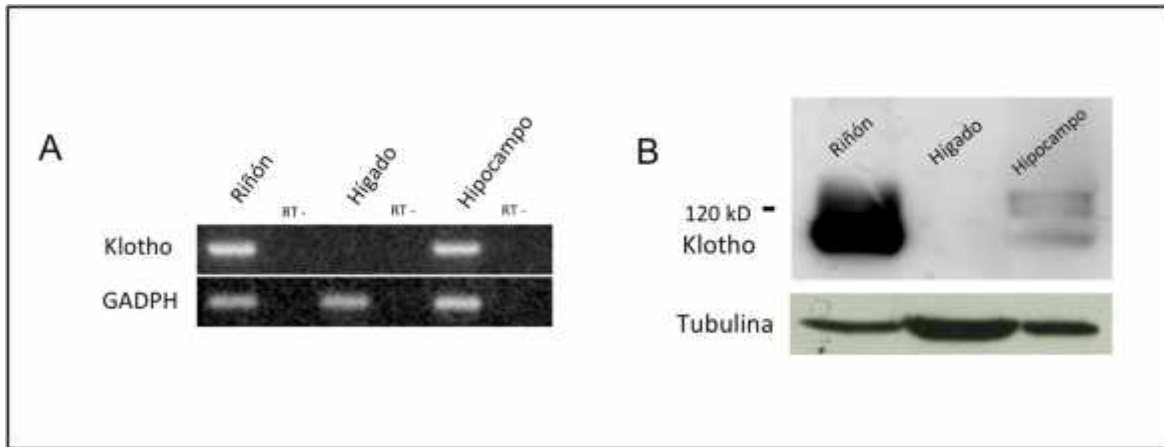


Figura 1: Expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos: A) PCR klotho / GADPH a partir de cDNA de hipocampo, hígado y riñón de ratones de 3 meses de edad. B) WB a partir de extracto de proteínas de hipocampo, hígado y riñón de ratones de 3 meses de edad (PCR en triplicado (con cDNA obtenido de 3 animales distintos). WB en duplicado (extracto de proteínas obtenido de 2 animales distintos), realizado con anticuerpo anti-klotho – ABCAM ab75023; RT-: transcripción reversa realizada sin templado).

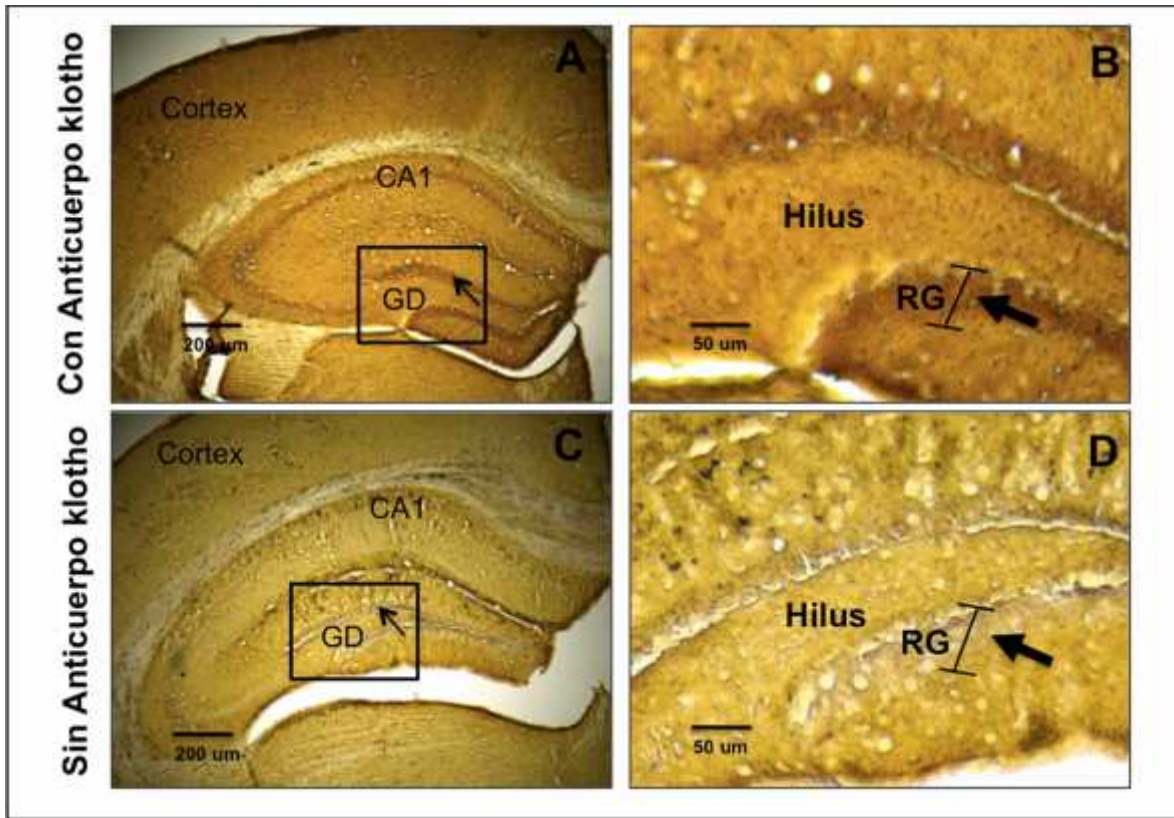


Figura 2: Localización de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos por Inmunohistoquímica A y B) Inmunohistoquímica realizada con anticuerpo primario anti-klotho; C y D) Controles sin primario (Experimento en triplicado (Rebanadas de tejido obtenidas de 3 animales distintos), anticuerpo anti-klotho –Calbiochem 423500; GD: Giro Dentado, RG: Región Granular, CA1: Región 1 del Cuerno de Amón)

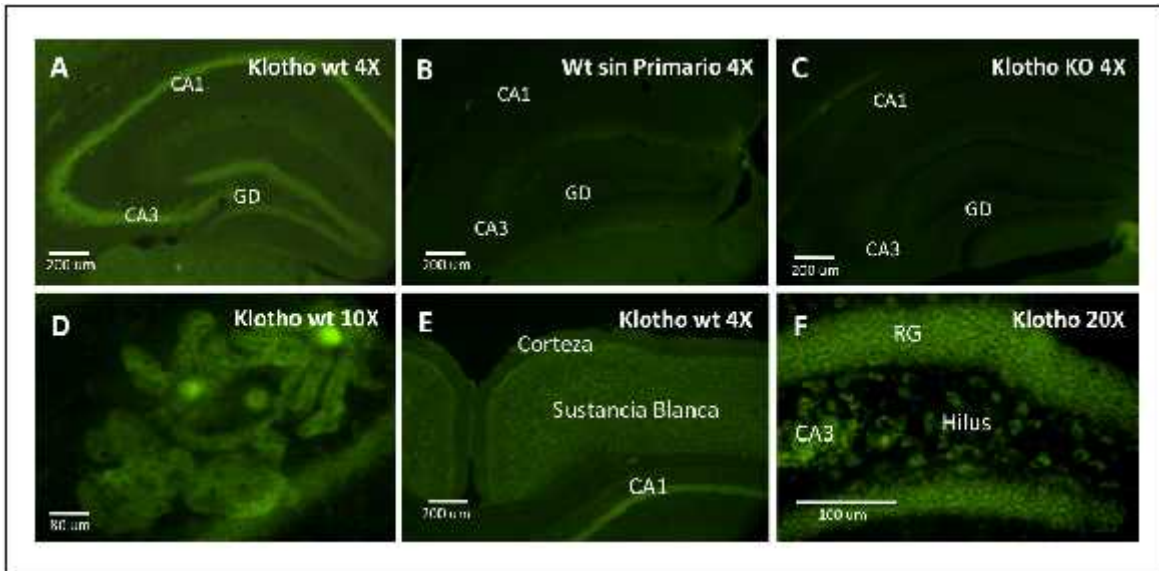


Figura 3: Localización de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos por Inmunofluorescencia A) Expresión de klotho en el hipocampo de ratón adulto WT, aumento 4X. B) Control sin primario, aumento 4X C) Expresión en hipocampo de ratón KO de klotho, aumento 4X. D) Expresión de klotho en el plexo coroídeo, 10X. E) Expresión de klotho en la Sustancia Blanca, 4X F) Patrón de expresión en Giro Dentado, aumento 20X (Experimentos en cuadruplicado (Rebanadas de tejido obtenidas de cuatro animales distintos), anticuerpo anti-klotho – Calbiochem 423500; GD: Giro Dentado, RG: Región Granular, CA: Cuerno de Amón).

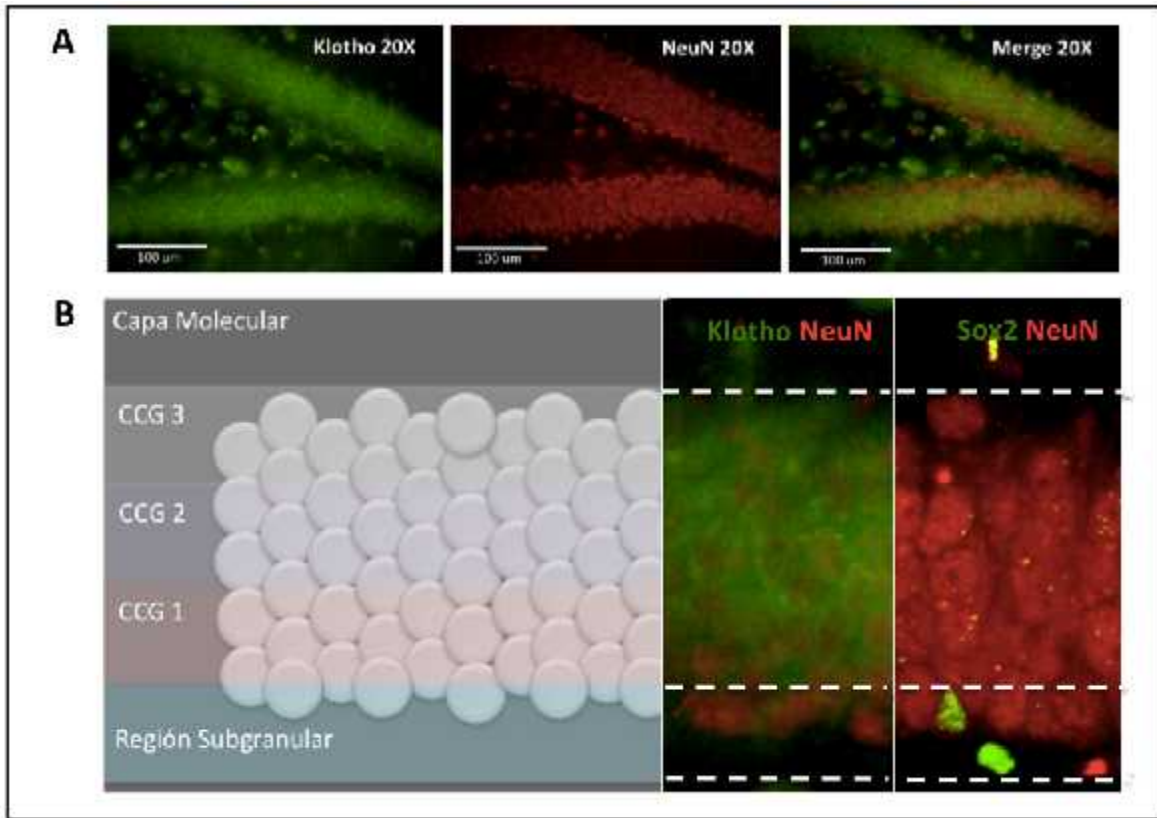


Figura 4: Expresión de klotho en el giro dentado de ratones adultos por inmunofluorescencia. A) Comparación de la expresión de klotho y NeuN en la región granular y en el Hilus del giro dentado. Panel B) Comparación del patrón de expresión de klotho y Sox2 en la región granular del giro dentado (Experimentos en triplicado (Rebanadas de tejido obtenidas de tres animales distintos), anticuerpo klotho #3 – Calbiochem 423500; CCG: Capa Celular Granular)

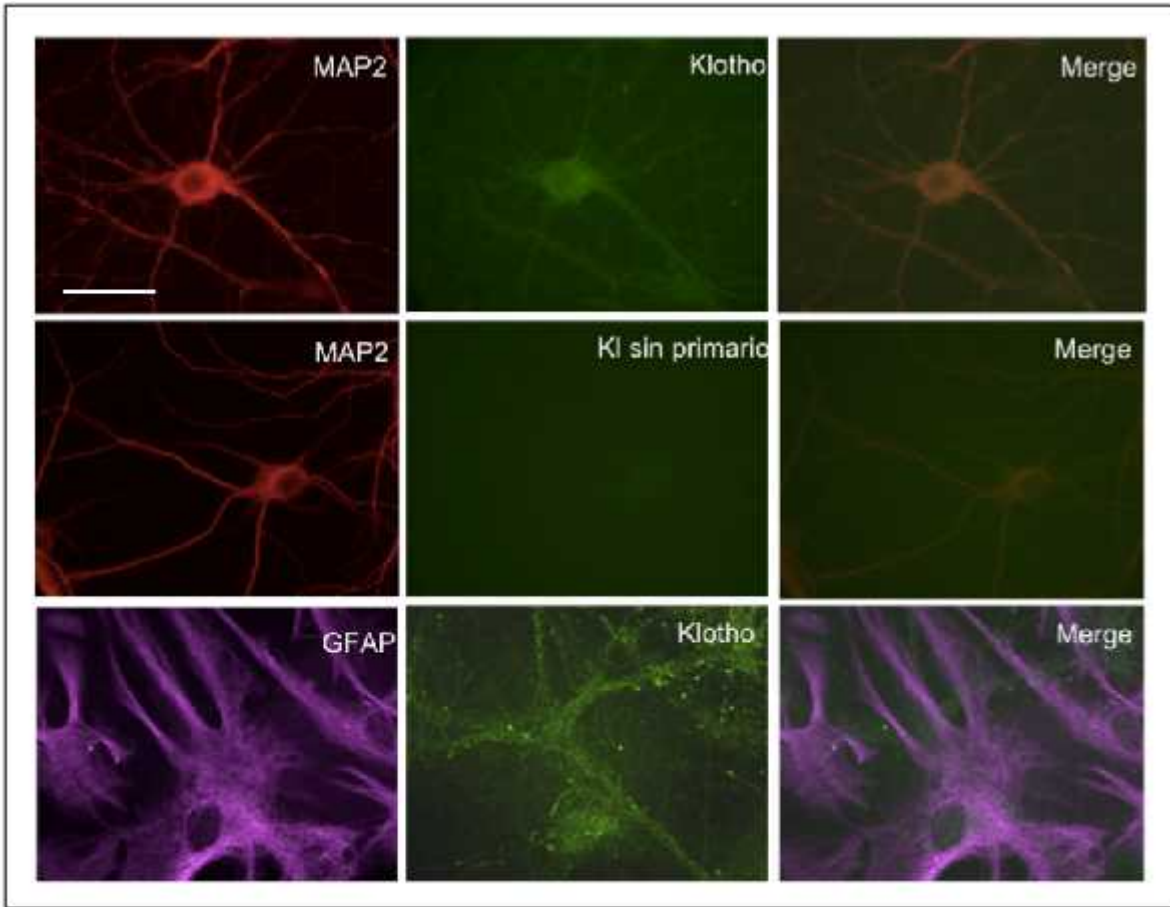


Figura 5: Expresión de klotho en cultivos primarios de neuronas hipocampales, por inmunofluorescencia. Cultivos primarios de neuronas hipocampales 12 div. Comparación de la expresión de klotho con el marcador de células neuronales MAP2 y con el marcador de Astrocitos GFAP.

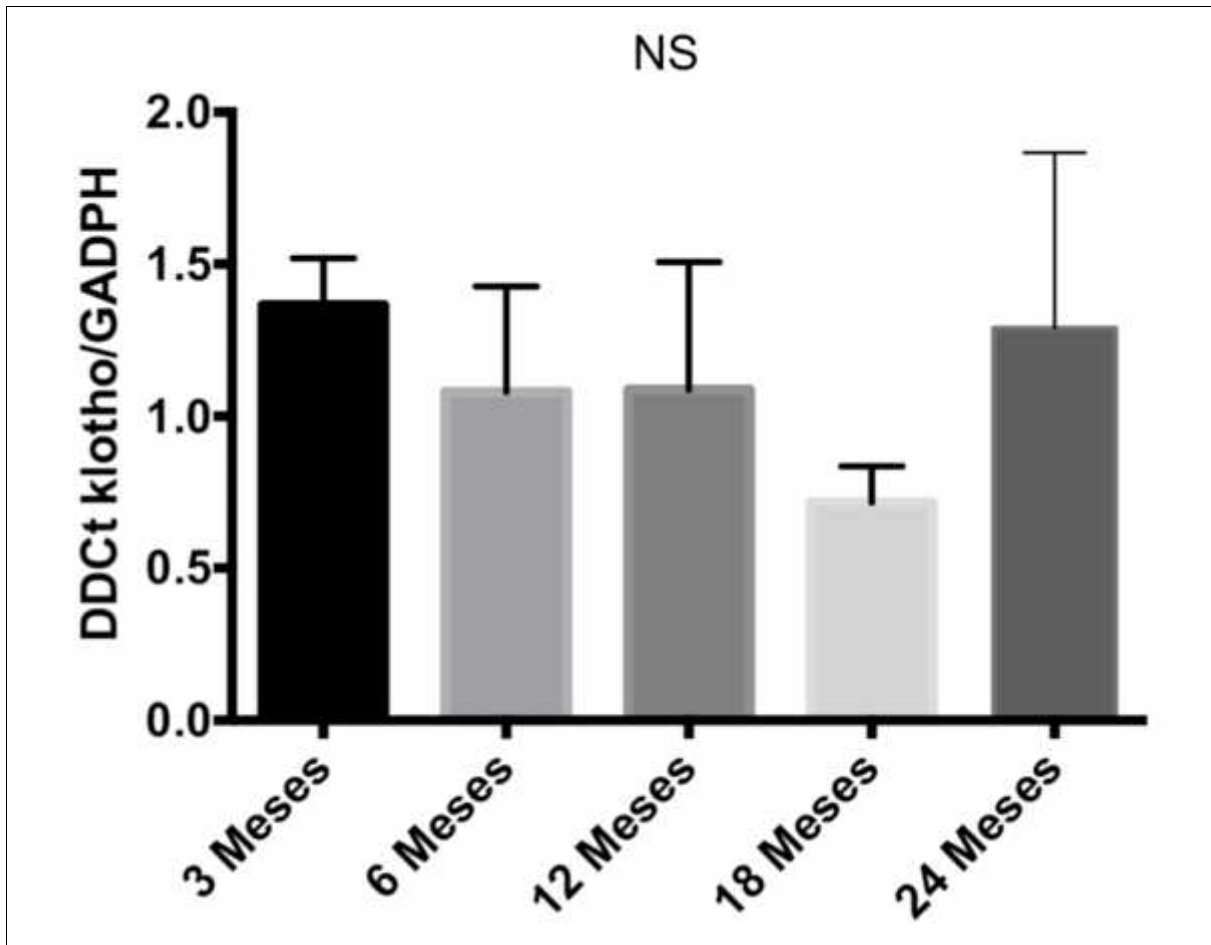


Figura 6: Expresión hipocampal de klotho durante el envejecimiento en ratones. qRT-PCR para comparar la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos durante el envejecimiento (n= 4 animales por grupo. NS: Diferencias no significativas entre los grupos).

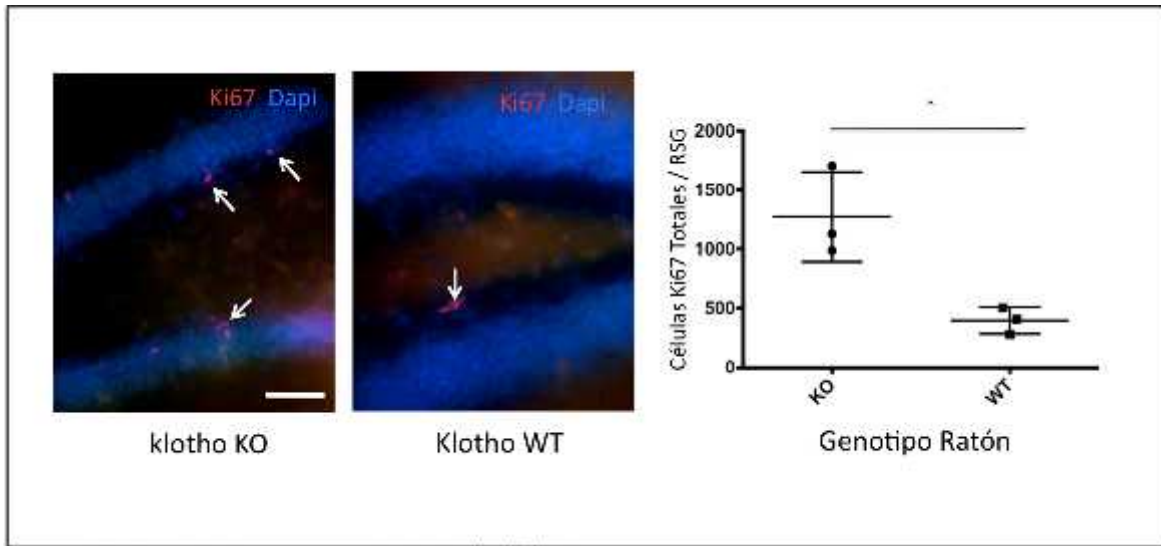


Figura 7: Expresión de Ki67 en la región subgranular del giro dentado en ratones KO de klotho y WT. Datos representados en Dotplot, como promedio +/- ds. (n= 3 ratones por grupo, conteo de 10 hipocampos por ratón T-test $p=0,0189$; RSG: Región subgranular; ds: desviación estándar)

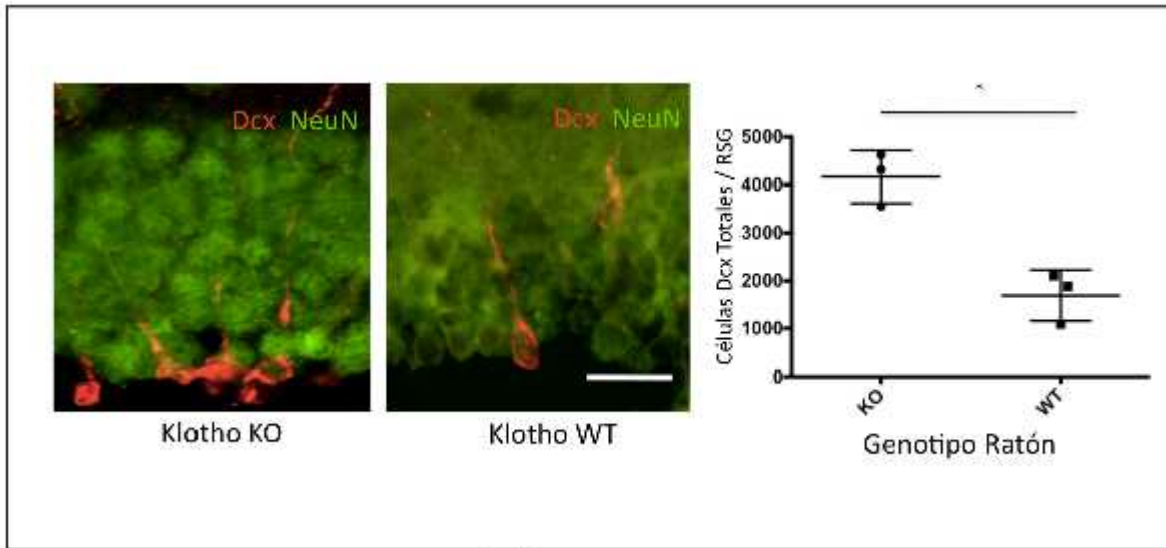


Figura 8: Expresión de Dcx en la región subgranular del giro dentado en ratones *klotho* KO y WT. Datos representados en Dotplot, como promedio +/- ds (n =3 ratones por grupo, conteo de 10 hipocampos por ratón, T-test p=0,005 RSG: Región subgranular; ds: desviación estándar)

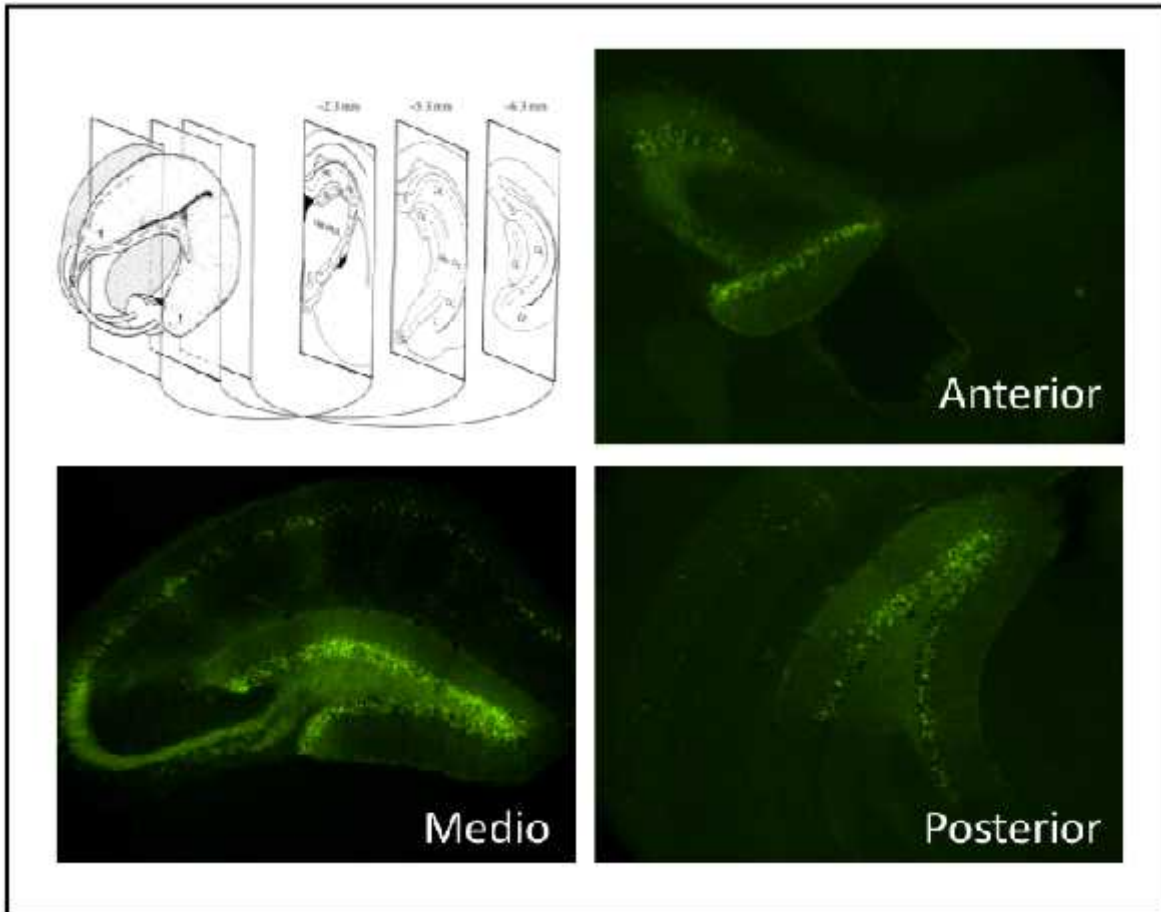


Figura 9: Efectividad de la infección Hipocampal con sitio único de punción. Expresión de GFP en cortes seriados de anterior a posterior de hipocampo de ratón infectado por lentivirus shRNA-kl1, inyección única, en las coordenadas -2,0 AP; 2,0 ML; -1,9DV.

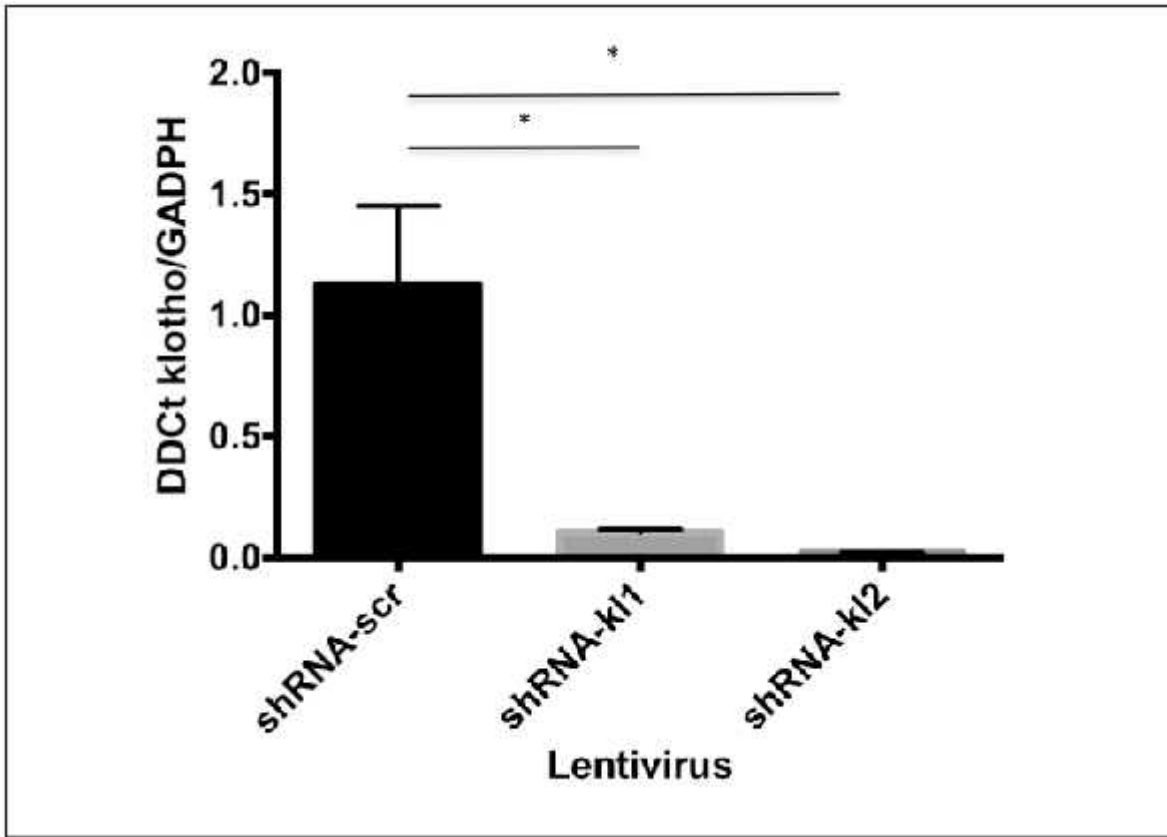


Figura 10: Cambio de expresión del gen klotho por rtPCR en hipocampo infectado por lentivirus shRNA-scr, shRNA-kl1 y shRNA-kl2 (n= 4 animales por grupo, Mann Whitney, p=0,0286 para shRNA-kl1 v/s shRNA-scr y para shRNA-kl2 v/s shRNA-scr)

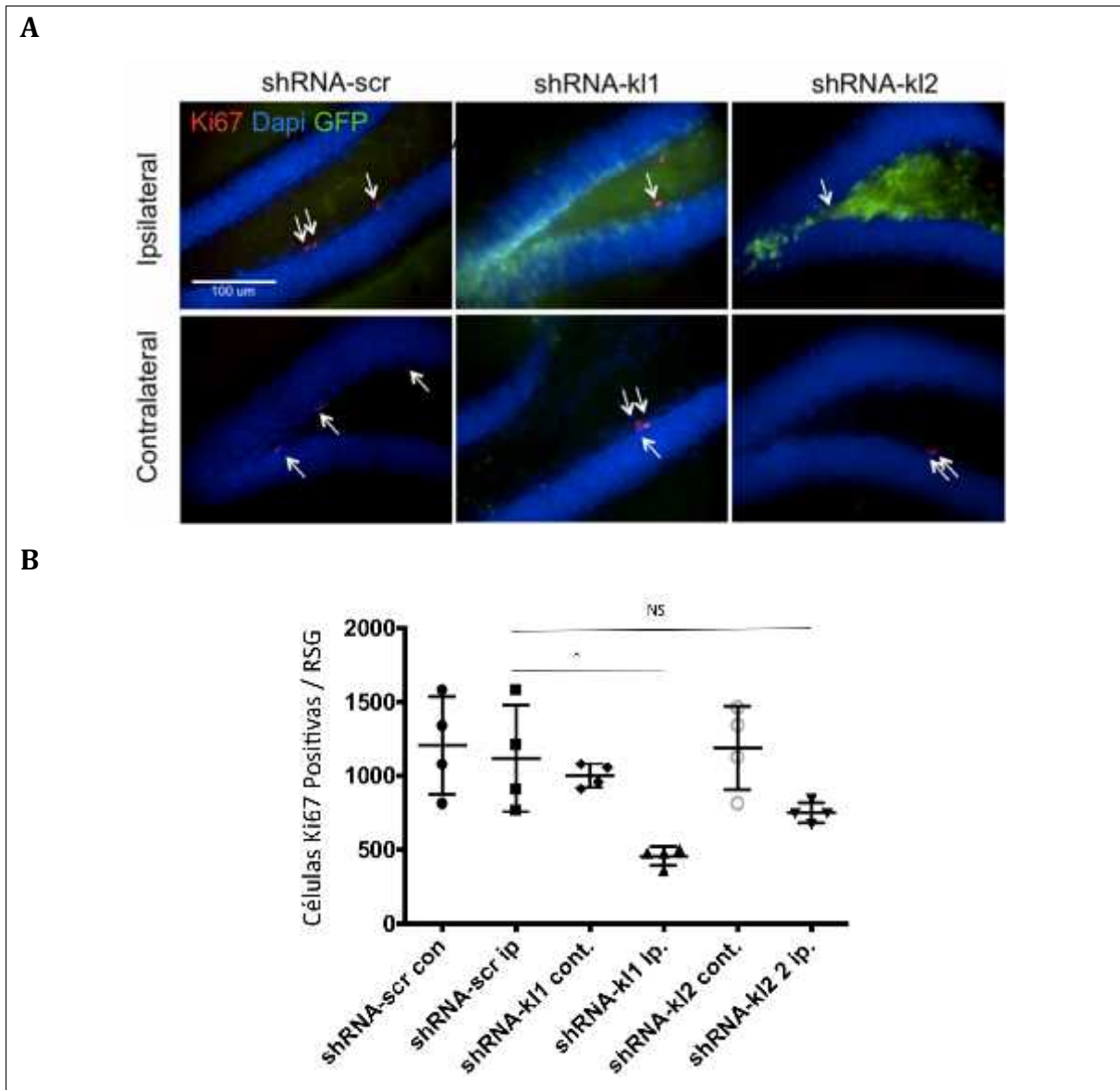


Figura 11: Efecto de la Inhibición de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos sobre el número de células Ki67 positivas en la región subgranular del giro dentado. A) Inmunofluorescencia Ki67 en hipocampos infectados con virus shRNA anti-klotho y scrambled mediante cirugía estereotáxica. B) Cuantificación del número de células Ki67 en la región subgranular del giro dentado en hipocampos infectados con virus shRNA anti-klotho y scrambled mediante cirugía estereotáxica. Datos representados como Dotplot, con promedio +/- ds (n=4 ratones por grupo; cont=hipocampo contralateral ; ip= hipocampo ipsilateral, Mann Whitney $p=0,0286$ para la comparación shRNA-scr ip versus shRNA-kl1 ip. Otras comparaciones $p>0,05$).

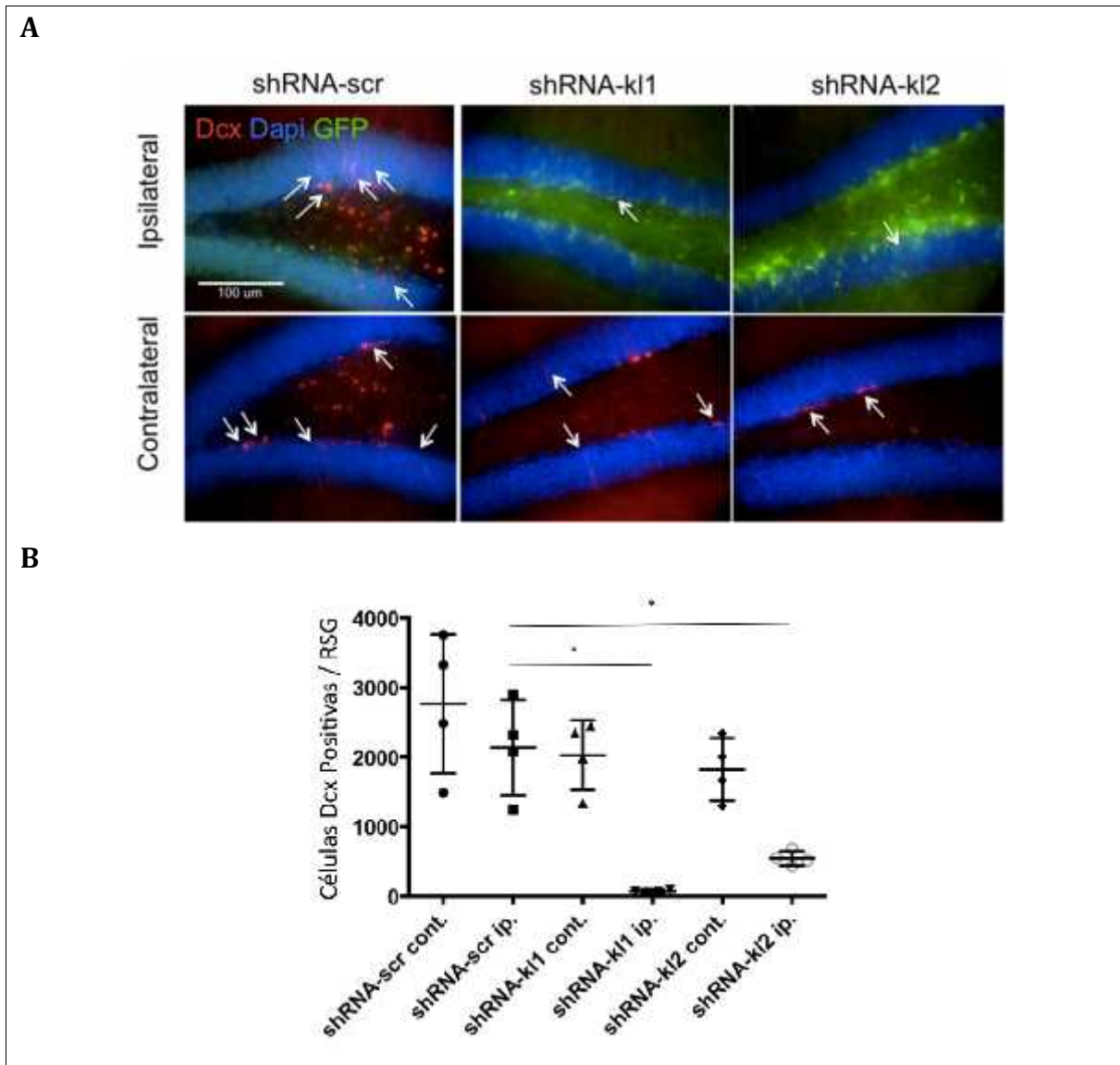


Figura 12: Efecto de la Inhibición de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos sobre el número de células Dcx positivas en la región subgranular del giro dentado. A) Inmunofluorescencia Dcx en hipocampos infectados con virus shRNA anti-klotho y scrambled mediante cirugía estereotáxica. B) Cuantificación del número de células Dcx en la región subgranular del giro dentado en hipocampos infectados con virus shRNA anti-klotho y scrambled mediante cirugía estereotáxica. Datos representados como Dotplot, con promedio +/- DS (n=4 ratones por grupo; cont=hipocampo contralateral; ip= hipocampo ipsilateral, Mann Whitney $p=0,0286$ para la comparación shRNA-scr ip versus shRNA-kl1 ip. y para la comparación shRNA-scr ip versus shRNA-kl2 ip. Otras comparaciones $p>0,05$).

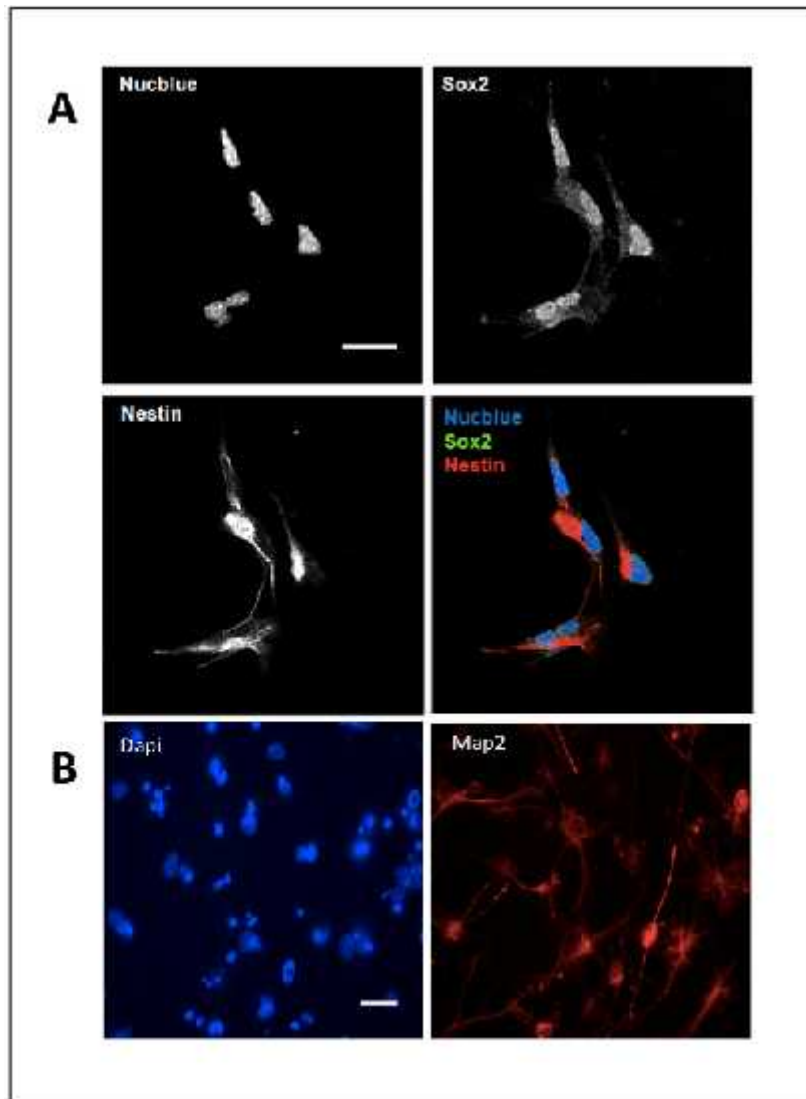


Figura 13: Progenitores neuronales hipocámpales de ratón adulto en cultivo. A) Caracterización de las células en cultivo que en condiciones basales expresan los marcadores Nestin y Sox2. **B)** Progenitores hipocámpales en condiciones de diferenciación, presentan cambios morfológicos, y expresan la proteína MAP2.

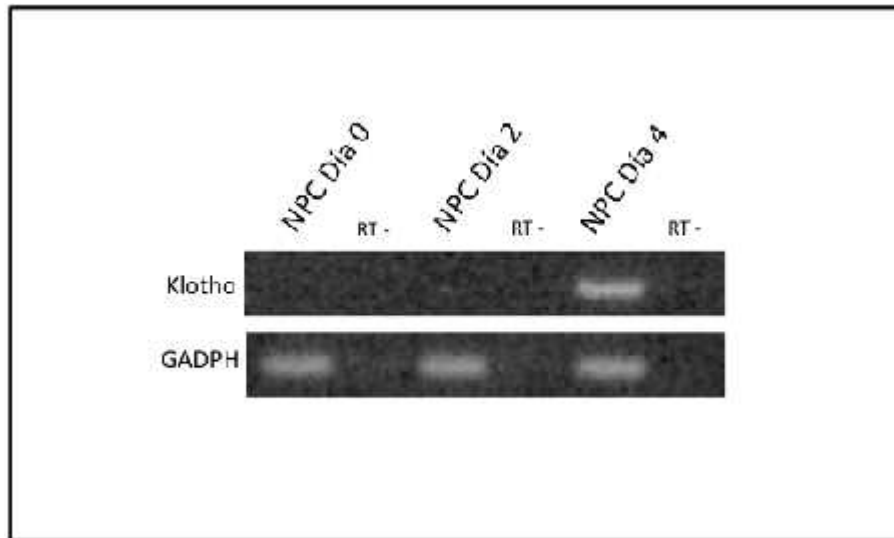


Figura 14: Expresión del gen klotho Durante la Diferenciación de Progenitores Neuronales de Hipocampo Adulto de Ratón en Cultivo por PCR. La Expresión de Klotho fue evaluada tras 0, 2 y 4 días de condiciones de diferenciación. (n=2; NPC: Progenitores Neuronales en Cultivo)

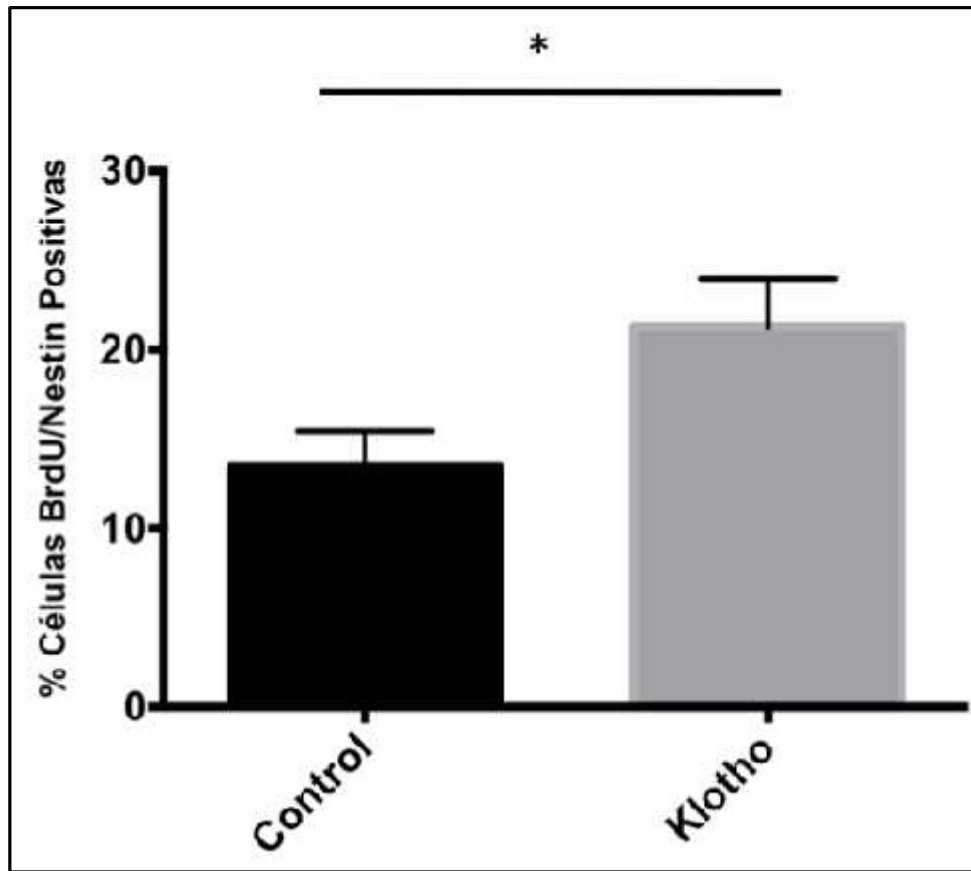


Figura 15: Efecto de la proteína klotho recombinante sobre la proliferación de progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo. Cuantificación del número de células BrdU-Nestin positivas por cada 100 núcleos. ($p=0,0079$, Mann Withney test, $n=5$ experimentos control; $n=5$ experimentos estímulo klotho, cada experimento corresponde al conteo de 10 imágenes)

Figuras Suplementarias

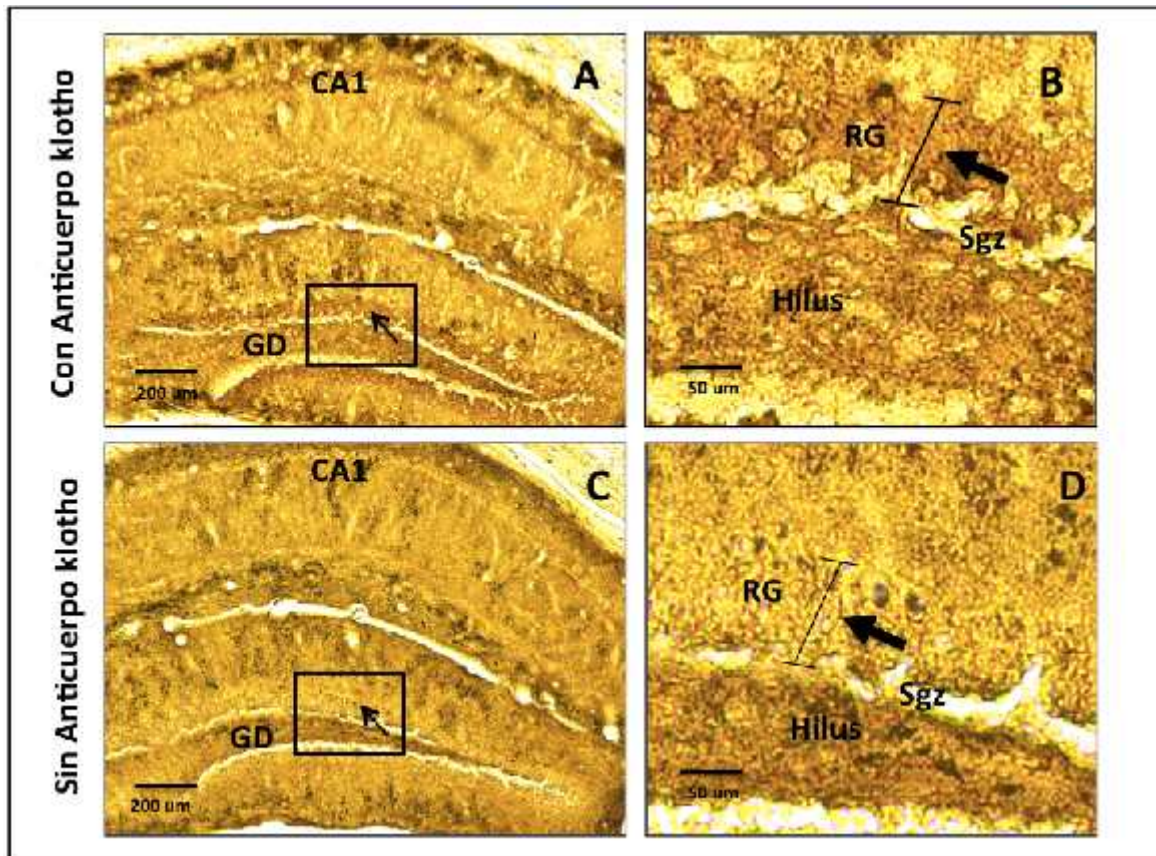


Figura S1: Localización de la expresión de klotho en el hipocampo de ratones adultos por Inmunohistoquímica A y B) Inmunohistoquímica realizada con anticuerpo primario anti-klotho, C y D) Controles sin primario (Experimento en triplicado (Rebanadas de tejido obtenidas de tres animales distintos), Anticuerpo #2 - ABCAM ab69208)

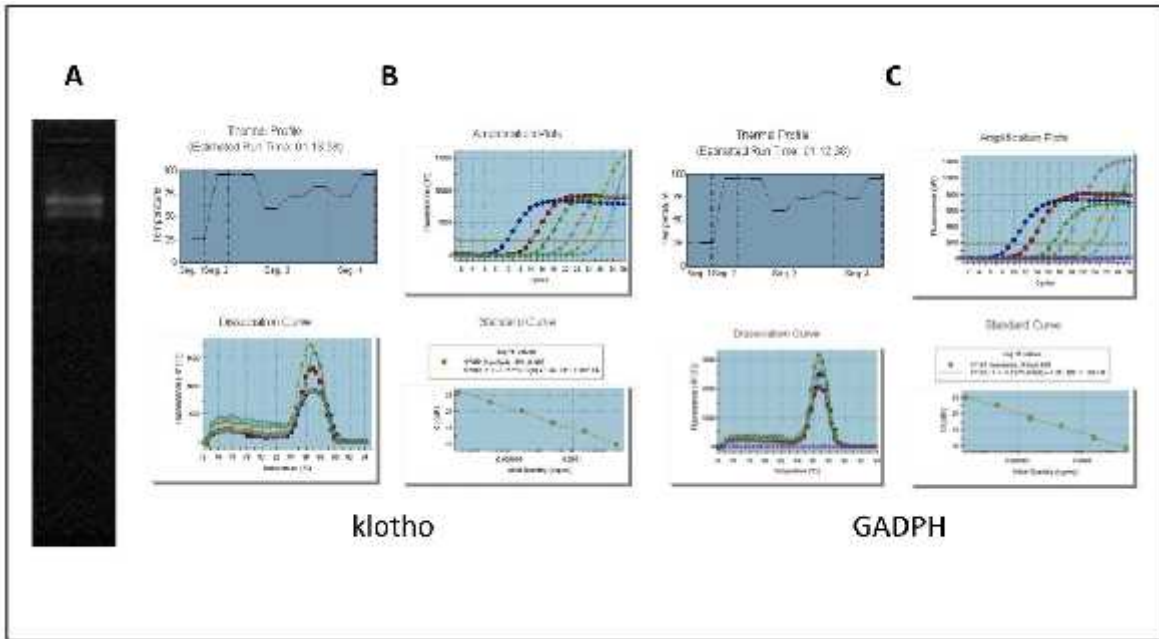


Figura S2: Validación de la técnica de PCR en tiempo Real A) Gel representativo de la extracción de RNA a partir de tejido hipocámpal, B) Curvas de amplificación, disociación y estándar de cuantificación para el gen klotho ratón, y C) Curvas de amplificación, disociación y estándar de cuantificación para el gen GADPH ratón

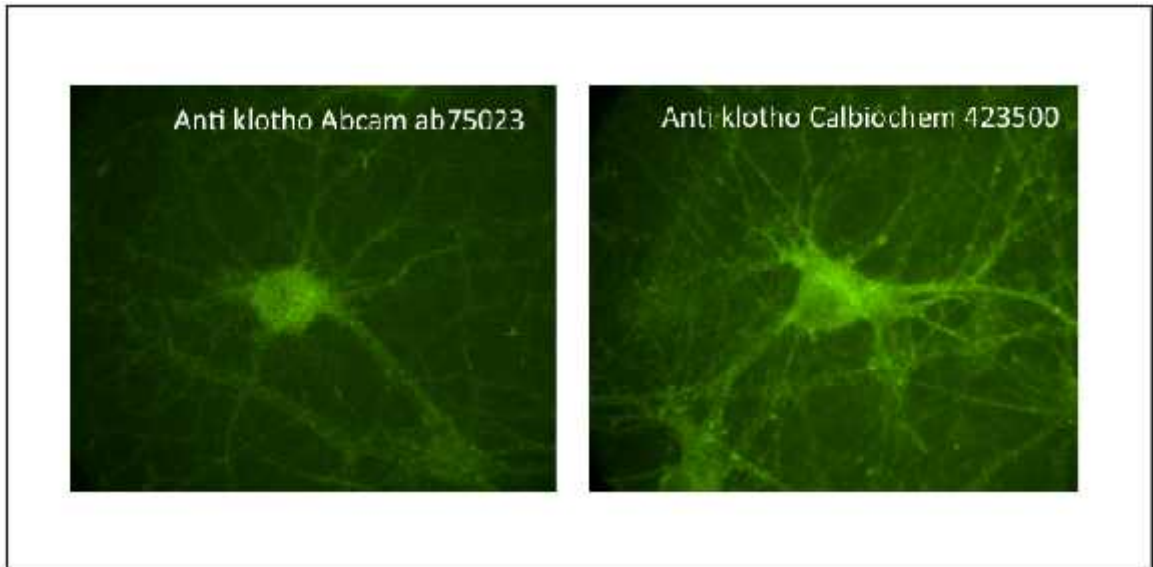


Figura S3: Control de la expresión de klotho en cultivos primarios de neuronas hipocampales, por inmunofluorescencia utilizando 2 anticuerpos distintos dirigidos contra distintos epítopes de la proteína.

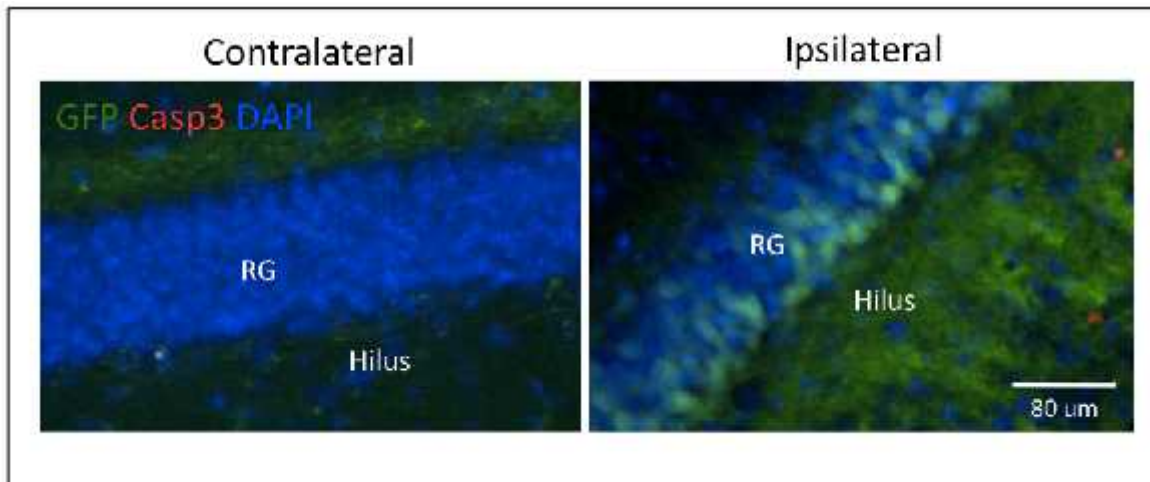


Figura S4: Apoptosis en los hipocampos infectados por lentivirus shRNA-anti klotho. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa 3 en hipocampos infectados con lentivirus sh-RNA klotho (Experimento en triplicado; RG: Región Granular; Casp3: Caspasa 3)

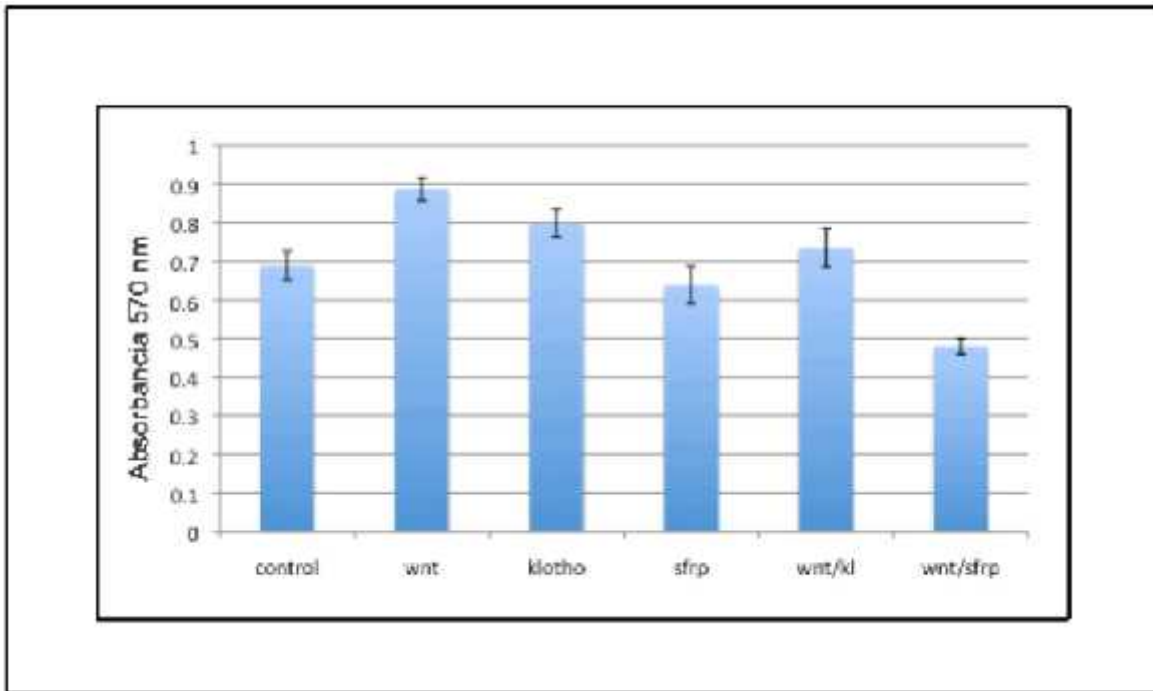


Figura S5: Efecto de la proteína klotho recombinante en la proliferación de progenitores hipocampales de ratón adulto en cultivo. Cuantificado por técnica MTT, (cada experimento en triplicado). Sfrp: Secreted frizzled-related protein (inhibidor soluble vía wnt); Kl: klotho.

Referencias:

Abramovitz et al. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* (2011) vol. 17 (13) pp. 4254-66

Agüero-Torres et al. The impact of somatic and cognitive disorders on the functional status of the elderly. *J Clin Epidemiol* (2002) vol. 55 (10) pp. 1007-12

Anderson et al. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Brain Res Dev Brain Res* (2002) vol. 134 (1-2) pp. 115-22

Anour, R., et al. Klotho Lacks a Vitamin D Independent Physiological Role in Glucose Homeostasis, Bone Turnover, and Steady-State PTH Secretion In Vivo. *PLoS ONE* (2012), 7(2), e31376.

Bondy y Lee. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* (1993) vol. 692 pp. 33-43

Borson. Cognition, Aging, and Disabilities: Conceptual Issues. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* (2010) vol. 21 (2) pp. 375-382

Brown et al. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* (2003) vol. 17 (10) pp. 2042-2046

Carson et al. Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* (1993) vol. 10 (4) pp. 729-40

Clinton. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Research* (2013), 1527(C), 1-14. doi:10.1016/j.brainres.2013.06.044

Deng et al. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?. *Nat Rev Neurosci* (2010) vol. 11 (5) pp. 339-350

Drapeau et al. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) vol. 100 (24) pp. 14385-90

Dubal. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. *Cell Reports* (2014), 7(4), 1065-1076. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.076

Duce et al. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia* (2008) vol. 56 (1) pp. 106-17

Ernst, A., et al. Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* (2014) vol 156(5), pp. 1072–1083.

Ferri et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* (2005) vol. 366 (9503) pp. 2112-7

Fortes et al. 2009. Las Personas Mayores en Chile: Situación, Avances y Desafíos del Envejecimiento y la Vejez. SENAMA. 1ra edición, Santiago de Chile, Maval. 1-155

Gage et al. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* (1995) vol. 18 pp. 159-92

Gao et al. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* (2009) vol. 12 (9) pp. 1090-1092

German et al. Nuclear localization of Klotho in Brain: an anti-aging protein. *NBA* (2012), 33(7), pp. 1483.e25–1483.e30. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.018

Ghosh y Greenberg. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* (1995) vol. 15 (1) pp. 89-103

Gonzalez et al 2009. Estudio Nacional de la Dependencia en las Personas Mayores. SENAMA. 1ra edición, Santiago de Chile, Gráfica Puerto Madero, 1-120.

Imura 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) vol. 565 (1-3) pp. 143-7

Inestrosa y Arenas. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* (2010) vol. 11 (2) pp. 77-86

Jin et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) vol. 101 (1) pp. 343-7

Jin et al. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* (2003) vol. 2 (3) pp. 175-83

Katsimpari. Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science* (2014), 344(6184), 630–634. doi:10.1126/science.1251141

Kawano y Kypta. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* (2003) vol. 116 (Pt 13) pp. 2627-34

Kempermann. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* (2011) vol. 33 (6) pp 1018-1024

King. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age* (2012), 34(6), 1405–1419. doi:10.1007/s11357-011-9315-4

Kuro-o. Klotho. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2010) vol. 459 (2) pp. 333-343

Kuro-o. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol Metab* (2008) vol. 19 (7) pp. 239-45

Kuro-o et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* (1997) vol. 390 (6655) pp. 45-51

Kurosue et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* (2006) vol. 281 (10) pp. 6120-3

Kurosue et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* (2005) vol. 309 (5742) pp. 1829-33

Kuwabara et al. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* (2009) vol. 12 (9) pp. 1097-1105

Lautenschlager et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* (2008) vol. 300 (9) pp. 1027-37

Lazarov et al. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* (2010) vol. 33 (12) pp. 569-579

Li et al. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) vol. 107 (40) pp. 17362-7

Li et al. Changes of autologous neural stem cells in the hippocampi of aging mice. *Neurosci Lett* (2009) vol. 463 (2) pp. 119-24

Lie et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* (2005) vol. 437 (7063) pp. 1370-5

Lichtenwalner et al. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* (2001) vol. 107 (4) pp. 603-13

Liu et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* (2007) vol. 317 (5839) pp. 803-6

Ma et al. Activity-dependent Extrinsic Regulation of Adult Olfactory Bulb and Hippocampal Neurogenesis. *Ann N Y Acad Sci* (2009) vol. 1170 (1) pp. 664-673

Madathil. Klotho Deficiency Disrupts Hematopoietic Stem Cell Development and Erythropoiesis. *The American Journal of Pathology* (2014), 184(3), 827–841. doi:10.1016/j.ajpath.2013.11.016

Martinez-Canabal, A. Reconsidering hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease, *Frontiers in Neuroscience* (2014). doi:10.3389/fnins.2014.00147/full

Ming y Song. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* (2011) vol. 70 (4) pp. 687-702

Monje y Dietrich. Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis. *Behavioural Brain Research* (2012)vol 227 (2) pp. 376-379

Morris. Dementia update 2005. *Alzheimer disease and associated disorders* (2005) vol. 19 (2) pp. 100-117

Mu et al. Signaling in adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* (2010) vol. 20 (4) pp. 416-423

Mudò et al. The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J Neural Transm* (2009) vol. 116 (8) pp. 995-1005

Nagai. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *The FASEB Journal* (2002). doi:10.1096/fj.02-0448fje

Oeppen y Vaupel. Demography. Broken limits to life expectancy. *Science* (2002) vol. 296 (5570) pp. 1029-31

Ortega et al. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) vol. 95 (10) pp. 5672-7

Perera et al. Antidepressant-Induced Neurogenesis in the Hippocampus of Adult Nonhuman Primates. *J Neurosci* (2007) vol. 27 (18) pp. 4894-4901

Petersen et al. Memory function in normal aging. *Neurology* (1992) vol. 42 (2) pp. 396-401

Razzaque et al. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J* (2006) vol. 20 (6) pp. 720-2

Russell y Kahn. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007) vol. 8 (9) pp. 681-91

Sahay et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* (2011) vol. 472 (7344) pp. 466-470

Shetty et al. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* (2005) vol. 51 (3) pp. 173-86

Shiozaki et al. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience* (2008) vol. 152 (4) pp. 924-941

Small et al. Selective decline in memory function among healthy elderly. *Neurology* (1999) vol. 52 (7) pp. 1392-6

Small et al. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nature Reviews Neuroscience* (2011), 12(10), 585–601. doi:10.1038/nrn3085

Sohal y Weindruch. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* (1996) vol. 273 (5271) pp. 59-63

Spillman y Lubitz. The effect of longevity on spending for acute and long-term care. *N Engl J Med* (2000) vol. 342 (19) pp. 1409-15

Trejo et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* (2001) vol. 21 (5) pp. 1628-34

Urakawa et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* (2006) vol. 444 (7120) pp. 770-4

Varela-Nallar et al. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* (2010) vol. 90 (4) pp. 284-296

Varela-Nallar. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis, *Front Cell Neurosci* (2013). vol. 7 pp. 1–11. doi:10.3389/fncel.2013.00100

Vadodaria, K. C., et al. SnapShot: Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell* (2014), 156(5), 1114–1114.e1. doi:10.1016/j.cell.2014.02.029

Villeda. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* (2011), 477(7362), 90–94. doi:10.1038/nature10357

Wang y Sun. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev* (2008) vol. 8 pp. 43-51

Wexler et al. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem Cells* (2009) vol. 27 (5) pp. 1130-41

Yates. Brain aging: Blood-derived rejuvenation. *Nat Rev Neurosci* (2014) vol. 15 (6) 352-3

Yu, et al How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron. *Development* (2014), 141(12), 2366–2375. doi:10.1242/dev.096776

Zhao et al. Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol Psychiatry* (2007) vol. 62 (5) pp. 381-90

Zhu. Abnormal neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice lacking 1,25-dihydroxy vitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃). *Hippocampus* (2010), 22(3), 421–433. doi:10.1002/hipo.20908

Certificado Comité de Etica



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE
INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: "*Rol de Klotho en la Regulación de la Neurogénesis Hipocámpal del Adulto*" cuyo investigador responsable es el Dr (c), Felipe Salech Morales y cuyo tutor es el Dr., Andrés Couve no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0481 FMUCH).

El Dr(c) Salech se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto de Tesis Doctoral.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO" después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 02 de noviembre de 2011.

c.c.: Dr. Andrés Couve, Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Programa de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile