



Factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23): una nueva hormona con actividad fosfatúrica

A. L. Negri

Cátedra de Fisiología y Biofísica. Facultad de Medicina Universidad del Salvador. Buenos Aires. Argentina.

INTRODUCCIÓN

En la fisiología normal el fósforo tiene diversas funciones fundamentales: 1) es un componente esencial de los ácidos nucleicos; 2) es un elemento de almacenamiento de energía celular a través de la formación de ATP; 3) es un factor modulador de la actividad de proteínas a través de la fosforilación; 4) es parte integral de los fosfolípidos, y 5) forma parte del tejido mineralizado del organismo, el hueso. Dada la gran diversidad de funciones del fósforo, sería de esperar que el organismo tuviera un sistema de regulación especial para este anión. Sin embargo, por años se creyó que el mantenimiento de la homeostasis del fósforo era llevada a cabo por las hormonas calciotrópicas clásicas, el eje PTH/calciotriol, como una acción colateral. En los últimos años un creciente número de trabajos han demostrado que existe una nueva clase de hormonas o factores proteicos cuya acción primaria es la regulación del balance del fósforo. Así se ha acuñado el nombre de fosfatóninas para describir a factores con actividad fosfatúrica. La presente revisión se focalizará en la fosfatónina mejor caracterizada hasta la actualidad, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23).

RAQUITISMO HIPOFOSFATÉMICO AUTOSÓMICO DOMINANTE (ADHR) Y FGF 23

La comprensión de la fisiopatología de los trastornos de pérdida de fosfato se ha ampliado recientemente con los estudios de un trastorno genético denominado raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (del inglés Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets o ADHR). Los individuos afectos

de ADHR se caracterizan por tener una pérdida renal aislada de fósforo, hipofosfatemia con concentraciones de calcitriol sérico inapropiadamente normales¹.

Usando estrategias de posicionamiento clonal el consorcio de estudio de ADHR observó en 4 familias con ese trastorno mutaciones sin sentido en el gen que codifica un miembro de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (en inglés fibroblast growth factor, FGF), el FGF 23². El gen que codifica este factor está localizado en el cromosoma 12p13³ y es uno de los 22 miembros de la familia de los FGF^{4,5}. La longitud completa del FGF es de aproximadamente 26 KDa (251 aminoácidos). Tiene una región aminoterminal que contiene el dominio característico de los FGF y una novedosa porción carboxilo terminal de 77 aminoácidos. Las mutaciones que se detectaron en esas familias de ADHR afectaban a las argininas posicionadas tres aminoácidos aparte (R176Q, R179W y R179Q). La repercusión que esas mutaciones tienen en la estructura del FGF 23 se aclaró cuando varios grupos de investigadores expresaron y estudiaron este factor *in vitro*.

Además de la proteína esperada de 30.000 a 32.000 Mr que comprende al FGF 23 completo, se observaron dos fragmentos más pequeños. Esto mostraba que una parte del FGF 23 secretado era procesado a dos fragmentos de 18.000 y 12.000 Mr. El tamaño de los fragmentos y sus secuencias era consistente con un clivaje de la molécula en un sitio que contiene el motivo RXXR⁵, característico del sitio de clivaje de enzimas del tipo de la pro-convertasa de la familia de serinoproteasas del tipo subtilisina/kesina. Es probable que las proconvertasas sean las enzimas responsables de la degradación del FGF 23. Es más en todas las líneas celulares y sistemas de expresión para generar las proteínas recombinantes evaluadas hasta la fecha contienen enzimas capaces de metabolizar al FGF 23 en sus dos fragmentos, sugiriendo que el sistema de procesamiento del FGF 23 está ampliamente expresado.

Correspondencia: Dr. Armando Luis Negri
Instituto de Investigaciones Metabólicas
Libertad, 836 1 piso
Buenos Aires 1012 (Argentina)

Es importante señalar que las mutaciones identificadas en los pacientes con ADHR reemplazan los residuos de arginina dentro del sitio de consenso de clivaje de la proconvertasa (R¹⁷⁶HTR¹⁷⁹). Como el FGF 23 presente en las familias con ADHR se expresa solamente como una proteína de 30.000 a 32.000 Mr *in vitro*, esto sugiere que las mutaciones impiden el procesamiento o degradación del FGF 23⁶⁻⁸.

SITIO DE PRODUCCIÓN DEL FGF 23

El lugar donde se produce fisiológicamente el FGF 23 así como el tipo celular que lo produce no ha sido determinado con precisión. La información actual del sitio de producción proviene de análisis de RT-PCR (del inglés: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) que señalarían que los sitios donde se produce el FGF 23 están en el hígado, los ganglios linfáticos, el timo y el corazón (aunque con escasa abundancia). No se ha encontrado expresión del FGF 23 en el riñón⁵. Usando RT-PCR cuantitativa de tiempo real en hueso de ratones Hyp, que padecen una enfermedad homóloga al raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (del inglés X Linked Hypophosphatemia XLH), se ha encontrado un incremento significativo en la expresión del FGF 23, así como en cultivos de osteoblastos derivados de esos ratones⁹. Este incremento en la producción de FGF 23 por el hueso podría explicar el incremento en los niveles circulantes de FGF 23 hallados en el XLH. Recientemente Riminucci y cols., han provisto evidencia de que el FGF 23 estaría implicado en la patogénesis de la fosfaturia hallada en la displasia fibrosa del hueso o síndrome de McCune Albright, ya que demostraron que el FGF 23 es producido por los osteoprogenitores óseos tanto normales como aquellos de la fibrodisplasia, tanto *in vivo* como *in vitro*¹⁰.

EL FGF 23 COMO SUSTRATO DE LA ENZIMA PHEX

Un tema controvertido es si el FGF 23 es catabolizado por la metaloproteasa de superficie llamada PHEX, enzima cuyo gen codificante se encuentra mutado en la forma más frecuente de raquitismo hipofosfatémico, el XLH^{11,12}. Algunos han sugerido que la enzima PHEX recombinante es capaz de clivar al FGF 23 a nivel del motivo RXXR o en un sitio próximo *in vitro*, ya que la mutación a nivel del sitio RXXR, sitio probable de clivaje del FGF 23, impide el procesamiento por la PHEX re-

combinante¹⁴. Sin embargo otros estudios no lo han podido corroborar¹⁴. Si la enzima PHEX realmente clivara al FGF 23, las mutaciones inactivadoras del PHEX como las halladas en el XLH, impedirían la degradación del FGF 23 y su incremento en sangre podría producir la hipofosfatemia y el trastorno en el metabolismo de la vitamina D observada en el XLH.

Todavía no se conocen los sustratos fisiológicamente relevantes del PHEX. Recientes estudios *in vitro* indican que el PHEX recombinante es capaz de clivar a ciertos sustratos de otra de las endopeptidasas de membrana, la NEP (del inglés Neutral Endopeptidase; endopeptidasa neutra) o nefrilisina, como el ZAA1-pNA y la leu(encefalina)^{14,15} así como la proteína relacionada a la PTH (PTHrP)¹⁶ y el péptido amiloide (1-40)¹⁵. Estudios recientes sobre la estructura cristalina de la NEP acomplejada con un inhibidor, el fosforamidón, han demostrado que el bolsillo de la enzima que se une al sustrato en este tipo de endopeptidasas es pequeño y sólo capaz de acomodar oligopéptidos¹⁷. Ya que la PHEX es una enzima de una estructura tridimensional similar a la NEP es probable que la PHEX también clive solo oligopéptidos. Eso excluiría al FGF 23 como sustrato por su gran tamaño. Podría ser entonces que la acción de la PHEX para degradar al FGF 23 fuera indirecta regulando la actividad de otra enzima que cataboliza el FGF 23 o actuando directamente sobre sustratos que estimulan o la biosíntesis y la secreción del FGF 23.

ACTIVIDAD REGULADORA DEL FÓSFORO POR EL FGF 23

La evidencia de que el FGF 23 es un factor regulador del fósforo proviene de estudios funcionales que han demostrado que el FGF 23 inhibe el transporte de fosfato *in vitro* y de que es fosfatúrico *in vivo*. Bowe y cols.¹³, demostraron que tanto el FGF 23 normal como el mutado (que se encuentra en los pacientes con ADHR) inhibe la captación de fósforo por células epiteliales renales *in vitro*. La inhibición de la captación de fósforo ocurre a concentraciones pM de FGF 23 que están dentro del rango normal para la acción de otras citocinas y factores de crecimiento. La administración de FGF 23 recombinante a ratones normales induce una pequeña pero significativa disminución del fósforo sérico y un incremento en la fosfaturia⁵. La exposición prolongada al FGF 23 producida por la implantación de células de ovario de hamster chino, conteniendo el gen FGF 23, en ratones desnudos atímicos, induce una severa hipofosfatemia, osteo-

malacia y disminución de los niveles de 1,25 dihidroxivitamina D₃, por disminución del mensajero de la 1 alfa hidroxilasa renal¹⁸. Finalmente la deficiencia de FGF 23 provocada en ratones por ablación dirigida del gen del FGF 23 resultó en hipofosfatemia y aumento en los niveles de 1,25 dihidroxivitamina D₃, así como anomalías esqueléticas. Todo lo anterior sugiere que el FGF 23 es una verdadera fosfatona y confirma su rol esencial y no redundante en el control de la homeostasis del fósforo.

MECANISMO DE ACCIÓN DEL FGF 23

Recién se están investigando los mecanismos moleculares de la acción del FGF 23. El dominio del FGF 23 que aparentemente contiene el sitio de unión su receptor es el sector aminoterminal. Esta es la región que posee analogía con el resto de la familia de los FGFs. El FGF 23 recombinante, en ciertas condiciones experimentales, actuaría directamente en el túbulo proximal *in vitro* a través del receptor para FGF 3C activando el sistema de la MAP quinasa¹⁹. Esto disminuye la expresión del transportador Na/Pi tipo IIa y de la 1 alfa hidroxilasa renal. Estos estudios también mostraron que el FGF 23 requiere que la heparina, cofactor que facilitaría la interacción del FGF con su receptor. Además de su unión al receptor 3C, el FGF 23 se une al receptor 2C pero no se une al receptor 1C. La distribución del receptor 3C del FGF que se expresa en el túbulo proximal y cartílago y del receptor 2C que se expresa en los osteoblastos, es consistente con las acciones renales y esqueléticas del FGF 23^{20,21}. A pesar de todo lo dicho, la función del receptor 3C (FGFR3) como mediador de la respuesta al FGF 23 deben ser confirmadas ya que ni los estados deficientes en FGFR3 ni las mutaciones inactivadoras del mismo alteran el manejo renal del fósforo^{22,23}. La falta de demostración en algunos estudios de acción del FGF 23 sobre el transporte del fósforo en células de riñón de oposum, implicaría que *in vivo* las acciones del FGF 23 para regular el transporte del fósforo podrían ser indirectas, por lo que el blanco molecular de acción del FGF 23 está por definirse.

DETERMINACIONES DEL FGF 23 EN SANGRE

Recientemente se han desarrollado ensayos para la demostración del FGF 23 en sangre. Jonsson y cols.²⁴, desarrollaron un ensayo tipo ELISA que detecta la porción carboxilo terminal del FGF 23. Ya que este

ELISA fue diseñado para reconocer un fragmento carboxilo terminal, FGF 23 (207-244)amida, los valores determinados parecen representar la cantidad total del FGF 23 completo así como los fragmentos inactivos carboxilo terminales en circulación. Estos autores encontraron que el FGF 23 está presente en la circulación de individuos sanos, aunque a niveles bajos, consistente con el rol fisiológico del FGF 23 en la regulación del fósforo. Además el FGF 23 estaba muy elevado en sujetos con tumores inductores de osteomalacia y estos valores se normalizaban luego de la resección quirúrgica del tumor. También encontraron que sujetos con hipofosfatemia inducida por el trastorno hipofosfatémico hereditario más frecuente, el ligado al cromosoma X (XLR), presentaban elevaciones del FGF 23 circulante. Usando un ensayo similar Weber y cols.²⁵, encontraron un incremento significativo en los niveles de FGF 23 y una correlación positiva entre sus niveles y el fósforo sérico en sujetos con fallo renal terminal. Sin embargo no hallaron diferencias en los niveles circulantes de FGF 23 entre sujetos hipofosfatémicos con XLR y sujetos normales. En los pacientes con XLR, el nivel de fósforo sérico se correlacionó en forma negativa con los niveles de FGF 23, sugiriendo que en estos pacientes el FGF 23 también es el causante de la hipofosfatemia. Finalmente Yamazaki y cols.²⁶, desarrollaron un ELISA con dos anticuerpos monoclonales que detecta el FGF 23 completo biológicamente activo, y encontraron niveles elevados de los mismos en sujetos con osteomalacia oncogénica como en sujetos con hipofosfatemia ligada al X.

CONCLUSIONES

Las fosfatoninas representan una clase emergente de factores u hormonas secretados que regulan específicamente la homeostasis de fósforo. El FGF 23 es el mejor caracterizado de ellos hasta el presente y ha demostrado estar alterado en diversas patologías que presentan hipofosfatemia, como el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante, la osteomalacia oncogénica y el raquitismo ligado al X. Existe evidencia creciente de que existen otros factores con actividad de fosfatona, por lo que esta clase de proteínas continuará expandiéndose en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Econs MJ, McEnery PT: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 674-681, 1997.

2. The ADHR Consortium: Autosomal dominante hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF 23. *Nat Genet* 26: 345-348, 2000.
3. Econs MJ, McEnery PT, Lennon Fand Spencer MC: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is linked to chromosome 12p13. *J Clin Invest* 100: 2653-2657, 1997.
4. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7: 165-197, 2000.
5. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Shamashita T: Cloning and characterization of FGF 23 as a causative factor of tumor induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6500-6505, 2001.
6. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B y cols.: ADHR mutations stabilize GFG23. *Kidney Int* 60: 2079-2086, 2002.
7. Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Shamashita T: Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia *in vivo*. *Endocrinology* 143: 3179-3182, 2002.
8. Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karpalis AC: The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances *in vitro* biological potency. *J Biol Chem* 278 (11): 9843-9, 2003.
9. Liu S y cols.: Regulation of FGF 23 expression but not degradation by Phex. *J Biol Chem* 10.1074/jbc.M20454200.
10. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS y cols: FGF 23 in fibrous dysplasia of bone and its relationships to renal phosphate wasting. *J Clin Invest* 112: 683-692, 2003.
11. Holm IA, Huang X, Kunkel LM: Mutational analysis of the PHEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 60: 790-797, 1997.
12. The HYP Consortium: A gene (PHEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 11: 130-136, 1995.
13. Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, Schiavi SC: FGF 23 inhibits tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 977-981, 2001.
14. Guo R, Liu S, Spurney RF, Quarles LD: Analysis of recombinant PHEX: an endopeptidase in search of a substrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E837-E847, 2001.
15. Shirovani K, Tsubuki S, Iwata N y cols.: Nephrylysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 among thiorphan and phosphoramidon-sensitive endopeptides. *J Biol Chem* 276: 21895-21901, 2001.
16. Boileau G, Tenenhouse HS, Desgroseillers L, Crine P: Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide 107-139 as substrate and osteocalcin, PPI and phosphate as inhibitors. *Biochem J* 355: 707-713, 2001.
17. Oefner C, Dárcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE: Structure of human endopeptidase (Nephrylysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296: 341-349, 2000.
18. Shimada T, Yoneya T, Hino R y cols.: Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 (FGF 23) demonstrate hypophosphatemia with low serum 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)2D] and ricketx/osteomalacia [abstract]. *J Bone Miner Res* 16: 2151, 2001.
19. Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, Itoh N: Fibroblast growth factor (FGF) 23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 277: 28265-28270, 2002.
20. Cancilla B, Davies A, Cauchi JA, Risbridger GP, Bertram JF: Fibroblast growth factor receptors and their ligands in adult rat kidney. *Kidney Int* 60: 147-155, 2001.
21. Ornitz DM, Marie PJ: FGF signaling pathways in endochondral and intra-membranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16: 1446-1465, 2002.
22. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM: Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12: 390-397, 1996.
23. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P: Fibroblast receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84: 911-921, 1996.
24. Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren O, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J, Juppner H: Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med* 348 (17): 1656-63, 2003.
25. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD: Serum FGF 23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res* 18 (7): 1227-34, 2003.
26. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Yamashita T, Fukumoto S: Increased circulatory level of biologically active full-length FGF 23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4957-4960, 2002.