

CAIO HENRIQUE YOKOYAMA MAZUCANTI

**EFEITOS DA PROTEÍNA KLOTHO SOBRE A SINALIZAÇÃO DE INSULINA
E METABOLISMO ENERGÉTICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

CAIO HENRIQUE YOKOYAMA MAZUCANTI

**EFEITOS DA PROTEÍNA KLOTHO SOBRE A SINALIZAÇÃO DE INSULINA
E METABOLISMO ENERGÉTICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mazucanti, Caio Henrique Yokoyama
EFEITOS DA PROTEÍNA KLOTHO SOBRE A SINALIZAÇÃO
DE INSULINA E METABOLISMO ENERGÉTICO NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL / Caio Henrique Yokoyama
Mazucanti; orientador Cristoforo Scavone. -- São
Paulo, 2017.
117 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Klotho. 2. Envelhecimento. 3. Astrócitos. 4.
Acoplamento metabólico. I. Scavone, Cristoforo,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Caio Henrique Yokoyama Mazucanti

Título da Tese: Efeitos da proteína Klotho sobre a sinalização de insulina e metabolismo energético no sistema nervoso central

Orientador: Cristoforo Scavone

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado

Reprovado

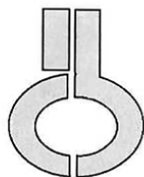
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **63** nas fls. **07** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Cristoforo Scavone**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da proteína Klotho sobre a sinalização de insulina e metabolismo energético no sistema nervoso central*" do qual participam o(s) aluno(s) **Caio Henrique Yokoyama Mazucanti**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **29.05.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 29 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.042.2017

São Paulo, 12 de maio de 2017.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Efeitos da proteína Klotho sobre a sinalização de insulina e metabolismo energético no sistema nervoso central*", registrado sob o protocolo nº **063/2013** e aprovado em 29/05/2013 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 29/05/2021**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongos	C57BL/6	Macho	2 meses	1º: 20

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Cristoforo Scavone**
Departamento de **Farmacologia**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO

O DIRETOR DO INSTITUTO OCEANOGRÁFICO
NOS TERMOS DO ARTIGO 74, PARÁGRAFO ÚNICO,
INCISO 5, ALÍNEA "B", DO
ESTATUTO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
CERTIFICA QUE

CAIO HENRIQUE YOKOYAMA MAZUCANTI



DE NACIONALIDADE BRASILEIRA,
PORTADOR DA CÉDULA DE IDENTIDADE
RG Nº 35.125.507-2 SP,
NASCIDO EM 23 DE SETEMBRO DE 1988
E NATURAL DO ESTADO DE SÃO PAULO,
CONCLUIU O



**CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA NA
MODALIDADE DE ATUALIZAÇÃO:
PROTEÇÃO RADIOLÓGICA COM ÊNFASE NO USO, PREPARO E
MANUSEIO DE FONTES RADIOATIVAS NÃO SELADAS.**

E, PARA QUE POSSA GOZAR DE TODOS OS
DIREITOS E PRERROGATIVAS LEGAIS,
OUTORGA-LHE O PRESENTE CERTIFICADO.

SÃO PAULO, 24 DE MAIO DE 2011.

PRESIDENTE DA COMISSÃO
DE CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

PROFA. DRA. ELISABETE DE
SANTA BRAGA DA GRACA

IO
Instituto
Oceanográfico

DIRETOR
MICHEL MICHAELOVITCH DE
MAHIQUES

À minha ex-professora de Biologia, Adma
Katia Lacerda Chaves, por ter cultivado
minha curiosidade científica

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, por ter me aceito de braços abertos e sem restrições, por todos esses anos de trabalho conjunto, convivência agradável e conselhos sábios e principalmente por toda a motivação que inspira todos seus alunos através de sua constante empolgação.

À Prof^a. Dr^a. Elisa Mitiko Kawamoto (ICB-USP), pela convivência agradável, pelas enriquecedoras discussões científicas e sugestões, e por ter me direcionado a colaborações essenciais para minha formação e construção desse trabalho.

Ao Dr. Mark P. Mattson (NIA – NIH), por ter me aceito sem restrições em seu laboratório e contribuído com minha formação; e a todos do laboratório de Neurociências, pelo ano de convivência agradável.

À Dr^a. Simonetta Camandola (NIA – NIH), cuja importância para a minha formação e carreira é imensurável; por todo o suporte, paciência e atenção altruisticamente despendida a mim.

Aos queridos amigos do laboratório de Neurofarmacologia Molecular que tornaram agradáveis todos esses anos. À Larissa de Sá Lima e Diana Z. Andreotti pelo apoio técnico diário; à Marina Cararo Lopes e à Paloma Segura, pela perseverança em manter a linhagem de animais em nosso biotério; ao João Victor Cabral Costa, pelas discussões, pelas ideias e inspiração e, principalmente, pelo exemplo.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, Camila Trindade e Mônica Nunes, que sempre foram solícitas, dispostas e, principalmente, pacientes ao lidar comigo e com a burocracia da pós-graduação.

Aos meus pais, por apoiarem incondicionalmente as minhas escolhas de carreira, mesmo não as compreendendo.

E finalmente aos meus amigos, já citados aqui ou não, por terem me dado forças quando mais precisei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílios financeiros essenciais para o desenvolvimento deste trabalho tanto no país (2013/10787-8) quanto no exterior (2016/09971-7).

“The woods decay, the woods decay and fall,
The vapours weep their burthen to the ground,
Man comes and tills the field and lies beneath,
And after many a summer dies the swan.
Me only cruel immortality
Consumes: I wither slowly in thine arms,
Here at the quiet limit of the world,
A white-hair'd shadow roaming like a dream
The ever-silent spaces of the East,
Far-folded mists, and gleaming halls of morn”

Lorde Alfred Tennyson
Tithonus

RESUMO

Mazucanti, C.H.Y. **Efeitos da proteína klotho sobre a sinalização de insulina e metabolismo energético no sistema nervoso central**. 2017. 116 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mutação na proteína β -glucuronidase Klotho tem sido associada com envelhecimento prematuro e disfunção cognitiva. Embora altamente expressa em regiões específicas do cérebro, as funções da proteína Klotho no sistema nervoso central ainda são desconhecidas. Aqui, mostramos que animais com gene mutado e hipomórfico para a proteína Klotho possuem regulação glicêmica alterada, sugerindo maior sensibilidade à insulina. No sistema nervoso central, vias relacionadas à sinalização intracelular de insulina apresentam-se mais ativadas no hipocampo, com maior ativação de AKT e mTOR e inativação dos fatores de transcrição FOXO. Neurônios hipocámpais em cultura parecem responder à estimulação por insulina e glutamato aumentando os níveis de Klotho. De forma coerente, antagonismo de receptor AMPA ou NMDA suprime a expressão neuronal de Klotho. Também mostramos aqui que a forma solúvel da Klotho é capaz de induzir a glicólise aeróbica de astrócitos impedindo a metabolização do piruvato pela mitocôndria, e estimulando seu processamento pela lactato desidrogenase. Inibição farmacológica de FGFR1, fosforilação da ERK e de transportadores de ácidos monocarboxílicos previne a liberação de lactato induzida por Klotho em astrócitos. Inibição da AKT pelo tratamento com Klotho induz a atividade transcricional dos fatores de transcrição FOXO e promove proteção antioxidante em astrócitos pelo aumento de expressão de catalase. De forma similar, tratamento com a Klotho apresentou propriedades anti-inflamatórias em astrócitos, impedindo ativação do fator de transcrição NF- κ B após estímulo com LPS. Em neurônios, tratamento com a proteína Klotho induz ubiquitinação e degradação proteossomal de PFKFB3. Por fim, provamos que a quantidade de Klotho diminui em hipocampo de animais envelhecidos. Genes e proteínas relacionados ao metabolismo energético e ao acoplamento metabólico de neurônios e astrócitos tem padrão de expressão alterados no hipocampo com o envelhecimento, mostrando que essa pode ser uma característica importante para explicar o declínio cognitivo comum ao processo de envelhecimento. Em conjunto, esses dados sugerem que a Klotho pode ser um novo participante do acoplamento metabólico entre neurônios e astrócitos.

Palavras-chave: Klotho. Envelhecimento. Astrócitos. Acoplamento metabólico

ABSTRACT

Mazucanti, C.H.Y. **Effects of Klotho protein on insulin signaling and energy metabolism of the brain**. 2017. 116 p. Ph.D. Thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mutations in the β -glucuronidase protein Klotho have been associated with premature aging and cognitive dysfunction. Although highly expressed in specific regions of the brain, Klotho actions in the central nervous system are still largely unknown. Here we show that animals with a mutated hypomorphic Klotho gene have altered glycemia regulation, suggestive of a higher insulin sensitivity. In the central nervous system, pathways related to insulin intracellular signaling were shown to be up-regulated in the hippocampus, with higher AKT and mTOR activation, and inactivation of transcription factor FOXO. Here, we show that cultured hippocampal neurons respond to insulin and glutamate stimulation by elevating Klotho protein levels. Conversely, APA and NMDA antagonism suppress neuronal Klotho expression. We also provide evidence that soluble Klotho enhances astrocytic aerobic glycolysis by hindering pyruvate metabolism through the mitochondria, and stimulating its processing by lactate dehydrogenase. Pharmacological inhibition of FGFR1, ERK phosphorylation, and monocarboxylic acid transporters prevents Klotho-induced lactate release from astrocytes. AKT inhibition by Klotho treatment induces transcriptional activity of FOXO transcription factors and promote antioxidant defense in astrocytes by inducing catalase expression. Similarly, Klotho treatment has anti-inflammatory properties, as shown by its ability to hinder NF- κ B activation in astrocytes after LPS stimulation. In neurons, Klotho treatment induces PFKFB3 ubiquitination and degradation through the proteasome. Lastly, in the hippocampus, we show that Klotho is less present in hippocampi of aged mice. Genes and proteins related to energy metabolism and metabolic coupling between neurons and astrocytes show an altered expression pattern with aging, suggesting that this could be a crucial characteristic that explains cognitive decline commonly seen during the aging process. Taken together these data suggest Klotho as a potential new player in the metabolic coupling between neurons and astrocytes.

Keywords: Klotho. Aging. Astrocytes. Metabolic coupling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>C. elegans</i>	24
Figura 2 - Regulação de DAF-16/FOXO pela via de sinalização associada ao receptor de insulina no <i>C. elegans</i> e seus respectivos componentes correspondentes em mamíferos	26
Figura 3 - Diferentes formas da proteína Klotho.....	29
Figura 4 - Neuroenergética basal na ausência de ativação glutamatérgica.....	33
Figura 5 - Resultado da genotipagem de camundongos Klotho	38
Figura 6 - Teste de tolerância à glicose intraperitoneal em camundongos Klotho de ambos os sexos	54
Figura 7 - Padrão de expressão de proteínas hipocâmpais de animais mutantes para a proteína Klotho difere em vias relacionadas à percepção do estado nutricional celular	55
Figura 8 - Resposta do eixo AKT/mTOR de neurônios em cultura ao tratamento com Klotho recombinante é contrária à resposta provocada por insulina	56
Figura 9 - A expressão da proteína Klotho em culturas primárias de neurônios hipocâmpais é modificada pelo grau de maturação, e por estimulação glutamatérgica e de insulina.....	57
Figura 10 - Análise de PCR em tempo real de um subgrupo dos genes indicados pelo array que foram modificados pelo tratamento por Klotho em astrócitos	60
Figura 11 - Klotho aumenta a glicólise aeróbica em astrócitos	67
Figura 12 - Efeitos da Klotho sobre o destino metabólico da glicose em astrócitos	68
Figura 13 - Tratamento com a proteína Klotho altera níveis de fosforilação de AKT e ERK....	70
Figura 14 - Liberação de lactato induzida por Klotho é mediada pelas vias de sinalização de FGFR1 e ERK.....	71
Figura 15 - Tratamento com Klotho induz fosforilação de enzimas relacionadas com metabolização de piruvato e aumento de atividade de LDH	73
Figura 16 - Klotho promove atividade de fator de transcrição FOXO em astrócitos e confere proteção contra dano oxidativo	75
Figura 17 - Localização subcelular da subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB em cultura primária de astrócitos.....	77
Figura 18 - Quantidades relativas de p65 nas frações citoplasmática e nuclear de astrócitos estimulados com LPS.....	78

Figura 19 - Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) para o fator de transcrição NF-κB em astrócitos tratados com Klotho e estimulados com LPS.....	79
Figura 20 - Klotho promove degradação de PFKFB3 em neurônios por indução da atividade proteasomal e promoção de ubiquitinação	81
Figura 21 - O envelhecimento tem efeitos sobre os níveis de Klotho e proteínas relacionadas ao metabolismo energético no hipocampo de camundongos.....	84
Figura 22 - Klotho produzida por neurônios estimula a glicólise aeróbica em astrócitos e a liberação de lactato	92
Figura 23 - Cooperação metabólica e os diferentes fins da glicose em astrócitos e neurônios	96
Figura Suplementar 1 - Fotomicrografias representativas das culturas primárias de astrócitos e neurônios de camundongos	98
Figura Suplementar 2 - Efeito do tratamento da proteína Klotho por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular de cultura de astrócitos e cultura de neurônios.....	99
Figura Suplementar 3 - Resposta de astrócitos em cultura transfectados com o plasmídeo Laconic quando da adição de lactato extracelular	100
Figura Suplementar 4 - Padronização do ensaio da atividade da lactato desidrogenase em extrato proteico de astrócitos	101
Figura Suplementar 5 - Padronização do insulto oxidativo em cultura primária de astrócitos	102
Figura Suplementar 6 - Padronização do insulto inflamatório em cultura primária de astrócitos	103
Figura Suplementar 7 - Células de astrócitos cultivados marcados contra subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados nos ensaios de Western Blotting.....	44
Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real	45
Tabela 3 - Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de imunoprecipitação	48
Tabela 4 - Lista de genes modificados pelo tratamento com Klotho recombinante em astrócitos	61
Tabela 5 - Lista de genes modificados pelo tratamento pela Klotho recombinante em neurônios.....	63
Tabela 6 - Processos e vias celulares mais modificados pelo tratamento com Klotho recombinante em cultura primária de astrócitos.	64
Tabela 7 - Processos e vias celulares mais modificados pelo tratamento com Klotho recombinante em cultura primária de neurônios corticais.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-NBDG	2-(n-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)2-deoxiglicose
6PG	6-fosfogluconato
aCSF	fluido cérebro-espinhal artificial
Actg1	actina gama 1
ADAM	uma proteína desintegrina e metaloproteinase
AGC	carregador de aspartato/glutamato
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPK	quinase ativada por adenosina monofosfato
ANLS	lançadeira de lactato astrócito-neurônio
ANOVA	análise de variância
APC/C	complexo promotor de anáfase/ciclossomo
APV	ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico
ATP	trifosfato de adenosina
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CAT	ciclo dos ácidos tricarboxílicos
CEUA	comitê de Ética no Uso de Animais
Cdh1	caderina 1
CO ₂	dióxido de carbono
CTE	cadeia de transporte de elétrons
Cxcr4	receptor de quimiocina CXC 4
DA	doença de Alzheimer
daf	formação de dauer
DAPI	4'-6-diamino-2'-fenilindol
DBE	elemento de ligação a DAF
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dnase	desoxirribonuclease

dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	ditiotreitól
ECAR	taxa de acidificação do meio extracelular
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	ensaio imunoadsorvente ligado a enzima
ERK	quinase regulada por sinalização extracelular
F1,6P	frutose-1,6-bisfosfato
F6P	frutose-6-fosfato
Fads1	desnaturase de ácido graxo 1
FasL	Fas ligante
FCCP	carbonil cianeto para-trifluormetoxifenilidrazona
FDG	2-deoxi-2[¹⁸ F]Fluoro-D-glicose
FGF23	fator de crescimento de fibroblastos 23
FGFR	recetor do fator de crescimento de fibroblastos
fMRI	imageamento por ressonância magnética funcional
FOXO	forkhead box da família O
FRET	transferência de energia de ressonância por fluorescência
G3P	gliceraldeído-3-fosfato
G6P	glicose-6-fosfato
G6Pase	glicose-6-fosfatase
G6pd	glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	ácido gama amino butírico
Gapdh	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenasse
GFAP	proteína glial fibrilar acídica
Glu	glutamato
GLUT	transportador de glicose
Gpr12	receptor acoplado à proteína G 12
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
Hacd3	3-hidroxiacil-CoA desidratase 3

HBSS	solução balanceada de sais de Hank
HCAR	receptor de ácido hidroxicarboxílico
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfónico
HHGN	solução balanceada de sais de Hank, HEPES, bicarbonato de sódio e glicose
Hk2	hexoquinase 2
Hprt1	hipoxantina fosforibosiltransferase 1
IGF-1	fator de crescimento insulínico 1
IGF1R	receptor de IGF-1
IIS	sinalização de insulina e IGF
IP	imunoprecipitação
IR	receptor de insulina
IRS	substrato do receptor de insulina
JAK	tirosina quinase Janus
KCl	cloreto de potássio
Kcnj13	membro 13 da subfamília J de canal de potássio dependente de voltagem
Lac	lactato
LDH	lactato desidrogenase
LPS	lipopolissacarídeo
MAP-2	proteína associada a microtúbulos 2
MCT	transportador de ácidos monocarboxílicos
Mg ²⁺	magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MnSD	mangânese superóxido dismutase
mTOR	alco da rapamicina de mamíferos
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	cloreto de sódio
NAD	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADP	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NaF	fluoreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NMDA	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalina -7-sulfonamida
NP-40	nonilfenoxipolietoxiletanol
OCR	taxa de consumo de oxigênio
PAGE	gel de poliacrilamida
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDHK	piruvato desidrogenase quinase
PDK-1	proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos-1
PEP	fosfoenolpiruvato
PET	tomografia por emissão de pósitrons
PFK1	fosfofrutoquinase-1
PFKFB	6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bisfosfatase
PH	domínio de homologia à pleckstrina
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP3	fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKM	piruvato quinase M
Plcg1	fosfolipase C, gama 1
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPP	via das pentoses
PTEN	proteína fosfatase e tensina homóloga
R5P	ribulose-5-fosfato
RNA	ácido ribonucleico
ROMK	canal de potássio de medula renal externa
Rplp0	subunidade P0 da proteína 60S ribossomal
rpm	rotações por minuto
SBCAL	sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média

SGK-1	quinase regulada por soro/glicocorticóide-1
Shisa8	membro 8 da família de proteínas shisa
SIRP α	receptor de proteína regulatória de sinal α
Slc16a1	carregador de solutos membro 1 da família 16
Slc16a4	carregador de solutos membro 4 da família 16
Slc16a7	carregador de solutos membro 7 da família 16
SNP	polimorfismo de um único nucleotídeo
Socs3	supressor de sinalização de citocinas 3
SOD2	superóxido dismutase 2
Srfp5	proteína secretada relacionada com o frizzled 5
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAE	tris acetato EDTA
TBST	tampão tris salina com tween 20
TE	tris-EDTA
TK	timidina quinase
TORC	complexo mTOR
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TRPV	receptor de potencial transiente vanilóide
TTGIP	teste de tolerância à glicose intraperitoneal
WB	western blotting
wt	selvagem
α CG	α -cetogluturato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 <i>O Envelhecimento e a Via de Sinalização da Insulina</i>	23
1.2 <i>A Proteína Klotho</i>	27
1.3 <i>O Metabolismo Energético do Sistema Nervoso Central</i>	31
1.4 <i>Justificativa e Objetivos</i>	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 <i>Animais</i>	36
2.2 <i>Genotipagem</i>	37
2.3 <i>Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose e Aferição de Glicemia</i>	39
2.4 <i>Cultura Primária de Glia e Purificação de Astrócitos</i>	39
2.5 <i>Cultura Primária Embrionária de Neurônios</i>	40
2.6 <i>Viabilidade Celular</i>	41
2.6.1 <u>Ensaio de viabilidade celular: redução do formazan colorido (MTT)</u>	41
2.6.2 <u>Ensaio de citotoxicidade: liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)</u>	41
2.7 <i>Imunofluorescência</i>	42
2.8 <i>Ensaio de Western Blotting</i>	42
2.9 <i>PCR em Tempo Real</i>	44
2.10 <i>Medida da Liberação de Lactato</i>	45
2.11 <i>Transfecção com o Plasmídeo Laconic e Imageamento FRET</i>	46
2.12 <i>Transfecção com Plasmídeo FOXO Reporter</i>	46
2.13 <i>Ensaio de Atividade Proteassomal</i>	47
2.14 <i>Imunoprecipitação para Avaliação de Fosforilação e Ubiquitinação de Proteínas</i>	47
2.15 <i>Estimativa da Atividade da Lactato Desidrogenase</i>	48
2.16 <i>Estimativa de Incorporação do Análogo Fluorescente de Glicose 2-NBDG</i>	49
2.17 <i>Avaliação do Consumo de Oxigênio e Taxa de Acidificação do Meio Extracelular</i>	49
2.18 <i>Quantificação de Klotho por ELISA</i>	50
2.19 <i>Análise de Expressão Gênica por Microarray</i>	50
2.20 <i>Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (Gel-Shift) para o NF-κB</i>	51
2.20.1 <u>Marcação da sonda</u>	51

2.20.2 <u>Reação de ligação e corrida do gel</u>	52
2.21 <i>Análise Estatística</i>	52
3 RESULTADOS	53
3.1 <i>Resposta à Insulina e sua Respectiva Sinalização Intracelular Estão Alteradas em Camundongos Hipomórficos para a Proteína Klotho</i>	53
3.2 <i>A Expressão de Klotho em Neurônios é Modulada pela Sinalização Glutamatérgica e de Insulina</i>	56
3.3 <i>A Klotho Solúvel Provoca Mudanças Metabólicas em Astrócitos</i>	58
3.4 <i>O Tratamento Agudo com Klotho Aumenta a Glicólise Aeróbica de Astrócitos e a Liberação de Lactato</i>	66
3.5 <i>A Ativação de FGFR1 e ERK é Necessária para a Liberação de Lactato Induzida pela Klotho</i>	69
3.6 <i>Klotho Aumenta os Níveis de Fosforilação da LDHA, PKM2 e PDHK1 e Induz Atividade da LDH em Astrócitos</i>	71
3.7 <i>A Ativação do Fator de Transcrição FOXO Promove Aumento de Defesas Antioxidantes em Astrócitos Tratados com Klotho</i>	73
3.8 <i>Tratamento com Klotho Apresenta Propriedades Anti-inflamatórias em Astrócitos</i>	76
3.9 <i>Ubiquitinação e Atividade Proteassomal Induzidas pela Klotho Promovem Degradação de PFKFB3 em Neurônios</i>	79
3.10 <i>Níveis de Klotho e Proteínas Relacionadas ao Metabolismo Energético Estão Alterados em Hipocampos de Animais Envelhecidos</i>	82
4 DISCUSSÃO	85
5 CONCLUSÕES	97
6 MATERIAL SUPLEMENTAR	98
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Envelhecimento e a Via de Sinalização da Insulina

Modelos experimentais com organismos relativamente simples como o *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae* contribuíram de forma significativa para o progresso no entendimento das vias moleculares envolvidas no envelhecimento e senescência (BISHOP; GUARENTE, 2007; GIANNAKOU; PARTRIDGE, 2007; GUARENTE; KENYON, 2000; KENYON, 2005). O nemátoda terrestre *C. elegans* foi o pioneiro na pesquisa sobre regulação genética do envelhecimento, em parte devido ao seu curto ciclo de vida, mas também devido à sua capacidade de autofertilização, o que facilita a geração de populações geneticamente homogêneas.

Uma grande quantidade de alterações em um único gene que alteram a expectativa de vida foi identificada tanto no *C. elegans* quanto em outras espécies, provendo evidências de que o envelhecimento pode ser modulado por vias regulatórias conservadas evolutivamente (KENYON, 2005). Essas vias geralmente controlam crescimento, reprodução, resposta a fatores estressores e metabolismo energético.

O envelhecimento, tanto em *C. elegans* quanto em moscas e mamíferos, é controlado consistentemente pela via de sinalização da insulina/fator de crescimento insulínico I (IGF-1), o que indica que essa via é um regulador universal da longevidade (BLUHER, 2003; KENYON et al., 1993; TATAR, 2001). O envolvimento dessa via de sinalização no envelhecimento foi primeiramente observado em *C. elegans*, quando foram identificados seus efeitos sobre o processo de formação de larvas *dauer*. Diversos genes que regulam a entrada no estágio *dauer* foram descobertos no nemátoda e a cada um deles deu-se o nome *daf* (*dauer formation*). *Dauer* é um estágio alternativo no desenvolvimento da larva do nemátoda, induzido por condição ambiental desfavorável como falta de nutrientes, alta densidade populacional ou altas temperaturas. Sob condições normais, a *C. elegans* se desenvolve para o adulto reprodutivamente competente passando por quatro estágios larvais (L1-L4) em três dias. No entanto, quando as condições são adversas, as larvas param seu desenvolvimento no segundo estágio para entrar no estágio *dauer*. As larvas *dauer* não se alimentam, são resistentes a estresse e podem sobreviver por diversos meses. Considera-se que as larvas *dauer* não envelhecem porque a expectativa de vida pós-*dauer* não é afetada pela duração do estágio alternativo (KLASS; HIRSH, 1976).

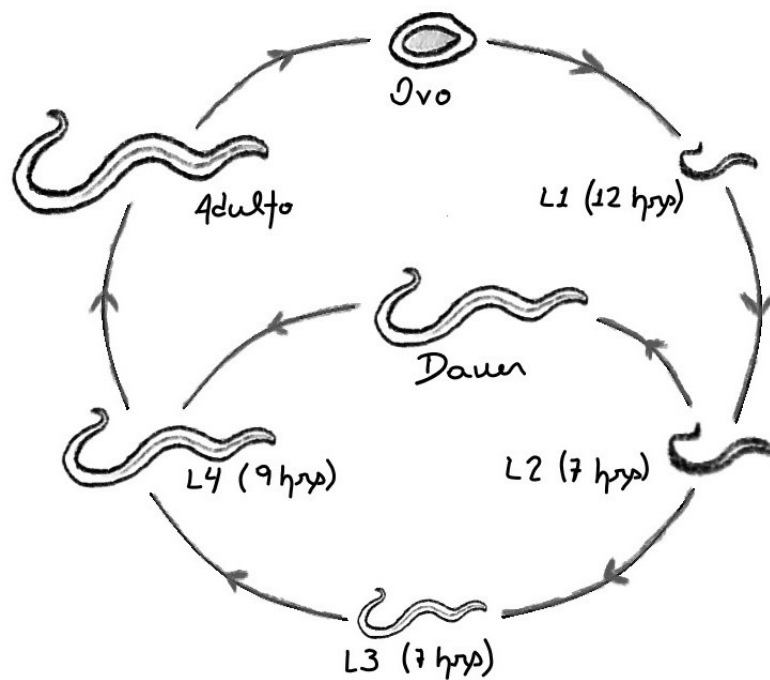


Figura 1 - Ciclo de vida da *C. elegans*. O ciclo de vida normal da *C. elegans* dura por volta de 3 dias, desde o ovo até o adulto sexualmente maduro. O nemátoda segue por 4 estágios larvais que são caracterizados por marcadores fisiológicos diferentes, antes de se tornarem adultos. Esse ciclo normal é seguido quando as condições ambientais são favoráveis. Na presença de condições adversas, como escassez de alimento, as larvas são capazes de entrar em um estado dormente chamado *dauer* a partir de L2, ao invés de prosseguirem a L3.

A via IIS (*Insulin and Insulin-like growth factor Signaling*) foi primeiramente ligada ao envelhecimento em *C. elegans*, quando foi observado que mutações em dois genes, *age-1* e *daf-2*, que codificam componentes da via, aumentam drasticamente a expectativa de vida dos animais (KENYON et al., 1993). Investigações posteriores levaram à descoberta de vários outros genes que afetam a longevidade através de modulação da via IIS.

O *C. elegans* sente pistas ambientais através de neurônios sensoriais ciliados. Seu genoma contém 38 ligantes similares à insulina que podem mediar a sinalização do DAF-2 (receptor de insulina) em resposta a pistas ambientais, como estado nutricional ou condições de crescimento (HUA et al., 2003; LI; KENNEDY; RUVKUN, 2003; PIERCE et al., 2001). Esses peptídeos semelhantes à insulina podem agir tanto como agonistas como antagonistas de DAF-2, regulando o metabolismo, crescimento reprodutivo e expectativa de vida. Esses peptídeos são principalmente expressos em neurônios, embora eles também sejam encontrados no intestino, epiderme, músculo e gônadas. Um mecanismo proposto para o controle neuroendócrino sobre a extensão da expectativa de vida do nemátoda propõe que pistas ambientais possam controlar a produção e liberação desses peptídeos de células sensoriais, influenciando, dessa forma, a fisiologia do organismo. Assim sendo, a ablação por

microcirurgia ou mutações afetando esses neurônios sensoriais estendem o período de vida do *C. elegans* (ALCEDO; KENYON, 2004; APFELD; KENYON, 1999). Assim, é plausível que a percepção sensorial afete a expectativa de vida, pelo menos em parte, por influenciar na atividade da via de sinalização da insulina. No entanto, essas manipulações parecem ter interações complexas dentro da via da insulina/fator de crescimento insulínico I (ALCEDO; KENYON, 2004).

O DAF-2 é o único receptor da família de receptores de insulina no *C. elegans* (KIMURA, 1997). Quando da ligação dos peptídeos semelhantes à insulina ao DAF-2, o domínio quinase do receptor fosforila e ativa AGE-1, uma fosfatidilinositol 3-quinase (homóloga à PI3K em mamíferos) (MORRIS; TISSENBAUM; RUVKUN, 1996). AGE-1 / PI3K ativado gera 3-fosfoinosítídeos, que são segundos mensageiros necessários para a ativação de quinases efetivadoras. Quinases abaixo na via incluem a PDK-1 (proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos-1), SGK-1 (quinase regulada por soro/glicocorticóide-1) e a AKT / PKB (proteína quinase B) (HERTWECK; GÖBEL; BAUMEISTER, 2004; PARADIS et al., 1999; PARADIS; RUVKUN, 1998). Essas proteínas quinase regulam os fatores de transcrição *forkhead box* da família O (FOXO) (em *C. elegans* conhecido como DAF-16), cuja translocação para o núcleo depende de seu nível de fosforilação (HENDERSON; JOHNSON, 2001; LEE; HENCH; RUVKUN, 2001; LIN et al., 2001). DAF-16 fosforilado mantém-se no citoplasma inativado, enquanto que sua forma não fosforilada entra no núcleo e exerce sua função como fator de transcrição. Assim, a via de sinalização da insulina age de forma a bloquear a localização nuclear do DAF-16 / FOXO. Um antagonista da sinalização do DAF-2 (receptor de insulina) e do AGE-1 (PI3K) é o DAF-18 / PTEN (proteína fosfatase e tensina homóloga) (OGG; RUVKUN, 1998). Sinalização reduzida da IIS, atividade aumentada do DAF-18 (PTEN) ou condições estressoras resultam na localização nuclear do DAF-16 / FOXO. No núcleo, DAF-16 regula a expressão de diversos genes, dentre os quais genes envolvidos no metabolismo, defesa imune, autofagia e resistência a estressores (LEE et al., 2003; MELÉNDEZ et al., 2009; MURPHY et al., 2003; OH et al., 2006).

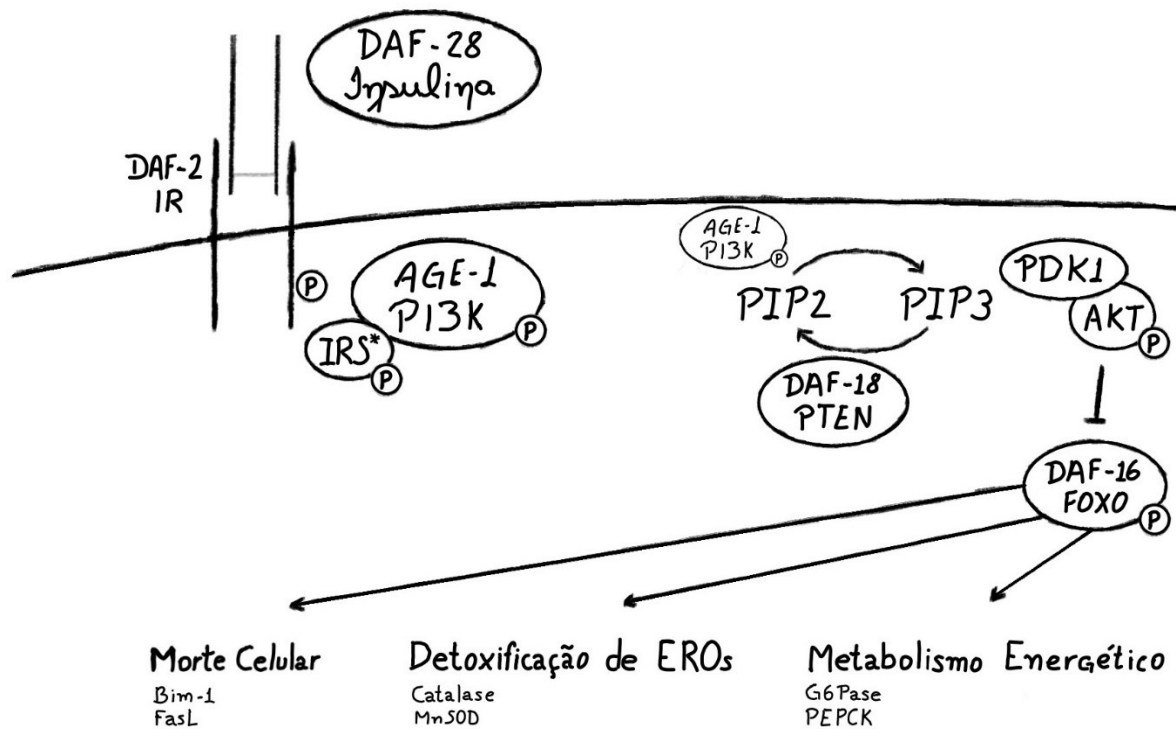


Figura 2 - Regulação de DAF-16/FOXO pela via de sinalização associada ao receptor de insulina no *C. elegans* e seus respectivos componentes correspondentes em mamíferos. O gene que codifica para o único receptor tirosina quinase da família dos receptores de insulina no *C. elegans* (*daf-2*) tem como homólogo em mamíferos o receptor de insulina (IR). O gene *daf-28* codifica no nemátoda uma superfamília de proteínas relacionadas à insulina. Já o gene *age-1* corresponde à PI3K dos mamíferos. Qualquer modulação negativa nesses genes promove uma maior atividade de DAF-16 (que corresponde à FOXO em mamíferos) e consequente aumento na longevidade. Já o gene *daf-18*, que transcreve para o homólogo PTEN em mamíferos, comporta-se de forma inversa. Regulação negativa desse gene diminui a longevidade, associada com aumento da sinalização de insulina e diminuição da atividade transcricional do DAF-16/FOXO. Por fim, o gene *daf-16* transcreve em mamíferos para o fator de transcrição FOXO. O FOXO regula a transcrição de proteínas relacionadas com morte celular Bim-1 e Fas ligante (FasL), das enzimas antioxidantes catalase e manganês superóxido dismutase (MnSOD ou SOD2) além de enzimas necessárias para a gliconeogênese glicose-6-fosfatase (G6Pase) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), por exemplo. *As proteínas adaptadoras IRS (substrato do receptor de insulina) são ausentes no *C. elegans*; suas funções são exercidas pelo próprio receptor DAF-2.

Evidências experimentais também relacionam a IIS com a longevidade de mamíferos. A deleção global da proteína IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) provou ser um mecanismo robusto para a extensão da longevidade em camundongos machos e fêmeas, aumentando o tempo de vida desses animais em torno de 15% (SELMAN et al., 2007; SELMAN; PARTRIDGE; WITHERS, 2011). Esses animais não somente vivem mais, como também todo o fenótipo associado ao envelhecimento é atenuado, com pelagem e pele mais saudáveis, sem o aparecimento de dermatite ulcerativa, coordenação motora preservada, melhora no sistema imune e ossos mais saudáveis (SELMAN et al., 2007). Embora apresentem o mesmo consumo de calorias do que animais *wild type*, camundongos *Irs1*^{-/-} têm tecido adiposo menos

abundante e exibem leve, porém persistente, resistência à insulina com preservação das células β (SELMAN et al., 2007).

De forma interessante, o mesmo mecanismo de alteração da sinalização associada ao receptor de insulina parece estar presente em mamíferos que naturalmente apresentam uma expectativa de vida especialmente elevada. O rato-toupeira-pelado (*Heterocephalus glaber*) é a espécie de roedor com maior expectativa de vida, podendo viver até 32 anos (SHERMAN; JARVIS, 2002). Independentemente da idade, eles apresentam desempenho deficiente em testes de tolerância à glicose, coerente com estado de resistência à insulina ou deficiência na produção do hormônio (KRAMER; BUFFENSTEIN, 2004). De fato, análise do transcriptoma desses animais revelou expressão diminuída de genes envolvidos na IIS no fígado comparado a camundongos (KIM et al., 2011). Um cenário bastante semelhante ocorre em morcegos que apresentam elevada longevidade (BUFFENSTEIN; PINTO, 2009). Em humanos, o mecanismo de regulação da longevidade pela insulina parece também estar preservado. Em um estudo longitudinal ocorrendo desde 1958, o *Baltimore Longitudinal Study of Aging*, foi visto que homens com menores níveis insulinêmicos tendem a viver mais (ROTH et al., 2002).

Seja em invertebrados como a *C. elegans* ou a *D. melanogaster*, em mamíferos como o quiróptero *M. brandtii* ou o roedor *H. glaber*, a modulação negativa da longevidade pela insulina e sua sinalização intracelular parece ser um mecanismo molecular conservado que pode ter sua relevância até mesmo em humanos.

1.2 A Proteína Klotho

O gene *klotho*, um gene relacionado à senescência, foi originalmente identificado por acidente, quando uma mutagênese insercional em uma linhagem de camundongos provocou a inativação da região promotora do gene que codifica uma proteína transmembrana do tipo I, a proteína Klotho, composta por 1014 aminoácidos em camundongos e ratos e 1012 aminoácidos em humanos (KURO-O et al., 1997; OHYAMA et al., 1998). A proteína tem sido considerada um repressor do fenótipo do envelhecimento porque, quando a expressão desse gene é suprimida em camundongos, esses animais, chamados camundongos mutantes para a Klotho, exibem caracteristicamente síndromes/deteriorações relacionadas à idade, como arteriosclerose, osteoporose, atrofia de pele, infertilidade, atrofia acelerada do timo e enfisema pulmonar, mesmo quando eles estão com apenas 4 semanas de vida (KURO-O et al., 1997). A expectativa de vida dos camundongos Klotho mutantes é extremamente curta,

geralmente por volta de 16 semanas. No entanto, como esses camundongos não apresentam alguns fenótipos frequentemente vistos em humanos idosos, como câncer, catarata e atrofia encefálica incluindo deposição de placas amiloides (ANAMIZU et al., 2005; KURO-O et al., 1997; NAGAI et al., 2003), ainda é incerto se esses camundongos representam um modelo animal apropriado para estudar o processo de envelhecimento, especialmente o envelhecimento cerebral.

Embora inicialmente tenha sido relatado que o gene *klotho* retarde o envelhecimento em camundongos, polimorfismos no gene humano da Klotho também têm sido relacionados com longevidade (ARKING et al., 2005). O gene *klotho* codifica ou uma proteína transmembrana tipo I, consistindo de dois domínios extracelulares que apresentam fraca homologia a β -glicosidases (KL1 e KL2), ou uma outra forma, resultante de *splicing* alternativo, que leva à formação de uma proteína secretada com um único domínio KL1 (MATSUMURA et al., 1998). Além disso, tanto as formas completa KL1-KL2 (130 kDa) quanto a forma que consiste apenas do domínio C-terminal KL1 (68 kDa) são encontradas no sangue, uma vez que a forma completa pode ser clivada da membrana celular por corte proteolítico que pode envolver as proteases ADAM10 e ADAM17 (CHEN et al., 2007) (Figura 3). Enquanto a isoforma da Klotho presa à membrana seja principalmente expressa no túbulo contorcido distal do rim, onde ocorre a reabsorção de fosfato, o domínio extracelular KL1-KL2 inteiro tem sido detectado como um polipeptídeo de 130 kDa no líquido cerebroorraquidiano, sangue e urina (ARKING et al., 2005; CHEN et al., 2007; IMURA et al., 2004; KUROSU, 2005; MATSUMURA et al., 1998). Desse modo, esse peptídeo de 130 kDa tem sido chamado como a forma clivada da Klotho. Em células humanas, o transcrito alternativo, codificando para proteína contendo apenas o domínio KL1, predomina sobre o transcrito inteiro que codifica para a isoforma presa à membrana da Klotho tanto em rim quanto em outros órgãos (MATSUMURA et al., 1998).

Depois de uma década de estudos em mamíferos, diferentes isoformas de Klotho parecem exercer diferentes funções. A forma presa à membrana age como um co-receptor obrigatório para o FGF23 (KUROSU et al., 2006; URAKAWA et al., 2006), interagindo com os receptores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFRs) no rim. O FGF23 é um hormônio derivado do osso que inibe tanto a reabsorção de fosfato quanto a biossíntese de vitamina D. Curiosamente, camundongos *knockout* para o FGF23 apresentam fenótipo semelhante aos camundongos hipomórficos para a proteína Klotho (RAZZAQUE, 2006), o que revela uma relação entre o metabolismo de fosfato e envelhecimento (revisado em KURO-O, 2010).

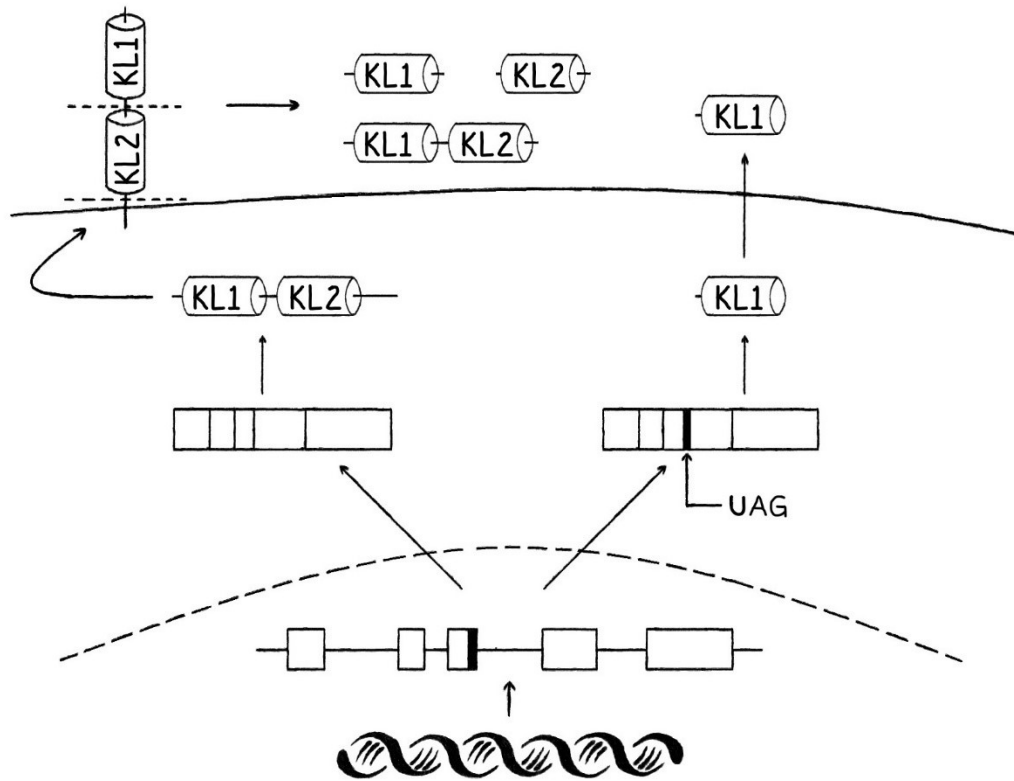


Figura 3 - Diferentes formas da proteína Klotho. O gene *klotho* dá origem a um RNA mensageiro que contém 5 exons. Existe um sítio doador para *splicing* no exon 3. Quando utilizado, o *splicing* resultante desse RNA dá origem a um RNA mensageiro com um *open reading frame* (ORF) de 3036 pb (1012 aminoácidos) em humanos, dando origem a uma proteína transmembrana do tipo 1 com sequência peptídeo sinal na porção N-terminal, uma porção extracelular com duas repetições de domínio (KL1 e KL2), uma porção transmembrana e um curto domínio intracelular. Já o RNA resultante do *splicing* alternativo possui uma inserção de 50 pb no exon 3. Embora ligeiramente maior, o esse RNA possui ORF de apenas 1647 pb (549 aminoácidos) devido à inserção *in frame* de um códon de parada. Da tradução dessa versão do RNA se origina uma proteína truncada com apenas um domínio enzimático (KL1), que é prontamente secretada da célula.

A forma secretada da Klotho age como um regulador endócrino de diversas glicoproteínas de superfície celular, incluindo canais iônicos e receptores de fatores de crescimento, como os receptores para insulina/fator de crescimento insulínico. Enquanto a atividade de sialidase da Klotho secretada pode inibir a internalização dos canais TRPV5 de cálcio (CHA et al., 2008) e ROMK1 de potássio (CHA et al., 2009), o mecanismo pelo qual a isoforma secretada da Klotho inibe a atividade do receptor de Insulina/IGF ainda carece de explicações. Assim, os efeitos de ambas as isoformas da Klotho convergem em direção a uma modulação positiva da longevidade, mas os mecanismos moleculares responsáveis por essa atividade estão longe de serem entendidos.

Embora os camundongos que expressam o gene hipomórfico da Klotho não apresentem nem atrofia do material encefálico nem deposição de placas amiloides (KURO-O et al., 1997), comprometimentos cognitivos já foram descritos, sendo atribuído um papel

importante para o estresse oxidativo como um mecanismo responsável para o déficit. Sabe-se que a expressão da proteína pró-apoptótica Bax no hipocampo desses animais está aumentada, enquanto proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL são menos expressas (NAGAI et al., 2003). A região CA3 do hipocampo dos animais com gene hipomórfico da *Klotho* apresenta menor quantidade de estruturas sinápticas e expressa menor quantidade de sinaptofisina (LI et al., 2004). Além disso, foi descrita a participação da via JAK2/STAT3 na regulação negativa de receptores muscarínicos M1 no hipocampo desses animais, atuando de forma crítica no comprometimento cognitivo (PARK et al., 2013).

Em humanos, a variante polimórfica KL-VS do gene da proteína *Klotho* é a mais estudada. Compreendido por 6 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que sempre aparecem juntos (dos quais apenas duas substituições parecem impactar a denominação de aminoácidos), a variante KL-VS tem sido associada com saúde, cognição e longevidade. De forma geral, a heterozigose KL-VS aparenta ser benéfica, aumentando a chance de sobrevivência em população com mais de 75 anos (ARKING et al., 2002, 2005; INVIDIA et al., 2010), diminuindo a chance de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (ARKING et al., 2003; MAJUMDAR; NAGARAJA; CHRISTOPHER, 2010; MAJUMDAR; CHRISTOPHER, 2011). De forma interessante, em todos esses cenários a homozigose da variante KL-VS aparenta ser desvantajosa. Similarmente, os níveis séricos de *Klotho* em humanos heterozigotos para a variante KL-VS são aumentados, enquanto que, paradoxalmente, homozigotos apresentam níveis diminuídos da proteína (YOKOYAMA et al., 2017). Heterozigose da variante KL-VS, portanto maiores níveis séricos da proteína *Klotho*, tem sido relacionado com maior conectividade cortical intrínseca e melhor cognição independente de sexo, idade ou presença do alelo APOE ϵ 4 (DUBAL et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2017; SHARDELL et al., 2016).

Embora alguns trabalhos já tenham descrito características associadas ao déficit cognitivo encontrado em animais com gene hipomórfico da proteína *Klotho*, existe escassez de informação referente aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do prejuízo cognitivo, ainda que seja reconhecido que o gene *klotho* possa ser essencial para a manutenção da função cognitiva em organismos durante o envelhecimento.

1.3 O Metabolismo Energético do Sistema Nervoso Central

O cérebro consome grandes quantidades de oxigênio e glicose, o que há muito vem sido considerado como característica necessária para a manutenção de atividade neuronal. De fato, neurônios apresentam uma grande quantidade de mitocôndrias, o que sugere a presença de fosforilação oxidativa intensa, e possuem habilidade limitada em metabolizar substratos energéticos diferentes da glicose (COX; BACHELARD, 1982). No entanto, estudos *in vitro* mostram que a fosforilação oxidativa não é necessária para a sobrevivência neuronal, provado pela habilidade de neurônios em cultura sobreviverem mesmo na presença dos inibidores de respiração mitocondrial rotenona e oligomicina (BUDD; NICHOLLS, 1996; CASTILHO et al., 1998; NICHOLLS; BUDD, 1998).

Além disso, a visão tradicional de que a oxidação de glicose é uma característica principal no metabolismo do neurônio deve ser questionada devido a evidências que sugerem um transporte de lactato entre astrócitos e neurônios. Evidências experimentais mostram que, durante atividade neuronal, os requisitos energéticos da glia são supridos por glicólise, sendo o lactato formado no processo liberado e consumido por neurônios como fonte de energia (BITTAR et al., 1996; HYDER et al., 2006; MAGISTRETTI, 1996; MAGISTRETTI, 2006; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; SIBSON et al., 1998; TSACOPOULOS; VÉGA et al., 1998).

Estudos clínicos e experimentais sobre o metabolismo energético do cérebro de diversas espécies, incluindo humanos, concluem que, sob condições normais no cérebro adulto, a glicose é praticamente o único substrato energético. Medidas de consumo de oxigênio e produção de CO₂ mostram que quase todo o oxigênio consumido é transformado em CO₂. Esse quociente respiratório aproximadamente igual a 1 indica que os substratos para o metabolismo oxidativo no cérebro são quase exclusivamente carboidratos, particularmente glicose (MAGISTRETTI, 2008). Com o surgimento de novas técnicas, dados mais precisos sobre o balanço geral de energia do cérebro foram encontrados, mostrando, por exemplo, que a utilização de glicose é, na verdade, maior do que aquela predita pelo consumo de oxigênio em um órgão com um quociente respiratório de 1. Baseando-se em relações estequiométricas, para se oxidar completamente 1 mmol de glicose (que contém 6 carbonos), são necessários 6 mmol de oxigênio. Considerando as medidas de consumo de oxigênio, a utilização de glicose pelo cérebro deveria ser por volta de 26,6 mmol/100 g de cérebro/min. No entanto, a utilização de glicose é significativamente maior, na ordem de 30,5 mmol/100 g de cérebro/min (CLARK; SOKOLOFF, 1999; KETY; SCHMIDT, 1945). A glicose que não é oxidada poderia ter

alguns destinos diferentes, como a via das pentoses, formação de glicogênio, e glicólise com formação de lactato. Outros destinos podem ser mais estruturais, já que a glicose é substrato para a síntese de lipídeos, aminoácidos e também alguns neurotransmissores (GABA, glutamato e acetilcolina).

Diversas características únicas de astrócitos e neurônios que já foram descritas sugerem uma compartimentalização metabólica parcial e a existência de uma transferência de lactato preferencial entre os dois tipos celulares. Assim sendo, por exemplo, expondo astrócitos a glutamato observa-se um aumento no transporte de glicose em paralelo a uma maior utilização de glicose (BERNARDINELLI; MAGISTRETTI; CHATTON, 2004; CHARLES, 2005). A conversão de piruvato a lactato nos astrócitos é facilitada por algumas características importantes. A expressão de carregadores mitocondriais de aspartato/glutamato (AGCs) é baixa em astrócitos (BERKICH et al., 2007), o que diminui sua capacidade de transferir o equivalente reduzido do NADH citosólico pela lançadeira de malato/aspartato na mitocôndria para reconstituir NAD (MCKENNA et al., 2012). Para manter o fluxo glicolítico, o NADH citosólico é convertido a NAD preferencialmente pela reação catalisada pela isoforma 5 da lactato desidrogenase, LDH5 (composta por 4 subunidades LDHA), preferencialmente expressa nos astrócitos (BITTAR et al., 1996; O'BRIEN et al., 2007). O lactato formado é então liberado no espaço extracelular através dos transportadores de alta capacidade de ácidos monocarboxílicos MCT1 e MCT4 (Figura 4).

Ao contrário do que ocorre nos astrócitos, a captura de glicose nos neurônios é diminuída pela exposição a glutamato. Em paralelo, a conversão do lactato a piruvato é facilitada nos neurônios pela expressão preferencial da isoforma 1 da lactato desidrogenase, LDH1 (composta por 4 subunidades LDHB) (BITTAR et al., 1996; O'BRIEN et al., 2007). A expressão nos neurônios do transportador de alta especificidade de ácidos monocarboxílicos MCT2 pode ser aumentada por diversos estímulos, o que pode contribuir para a adaptação ao longo prazo do suprimento de energia em relação à demanda.

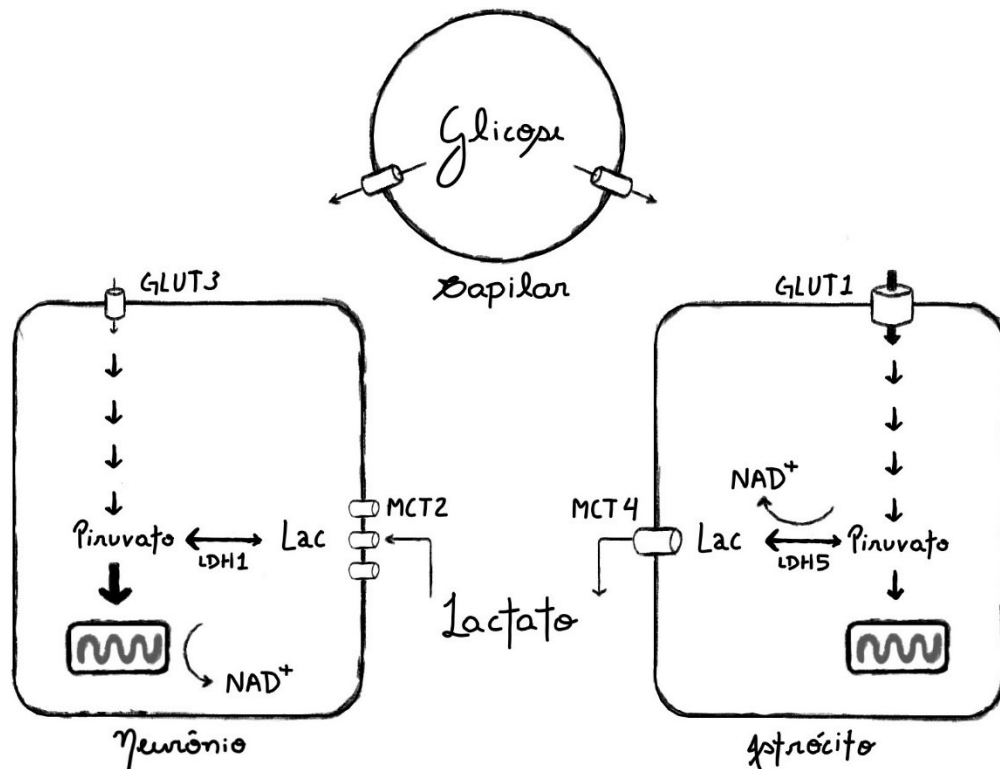


Figura 4 - Neuroenergética basal na ausência de ativação glutamatergica. A glicose, principal substrato energético do cérebro adulto sob condições normais, e O_2 são supridos pela circulação sanguínea para as células parenquimais. Nos astrócitos, a glicose é captada através do transportador de glicose 1 (GLUT1). Parte dela é processada oxidativamente via ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) na mitocôndria, enquanto a fração restante é convertida a lactato, que é liberado pelos transportadores de ácidos monocarboxílicos MCT1 e MCT4 para o espaço extracelular. Nos neurônios, a glicose é transportada através do transportador de glicose GLUT3. Em paralelo, o lactato do espaço extracelular é captado pelo transportador de ácidos monocarboxílicos MCT2. O piruvato resultante tanto da glicose quanto do lactato é utilizado oxidativamente na mitocôndria para satisfazer as necessidades energéticas do neurônio. Adaptado de PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012.

Diversas linhas convergentes de evidências sugerem um papel fundamental para a alteração global e regional no metabolismo energético cerebral na patogênese do declínio cognitivo. Evidências epidemiológicas correlacionam doenças do metabolismo (como obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2) com o declínio cognitivo no envelhecimento (GUNSTAD et al., 2010) e na doença de Alzheimer (LUCHSINGER et al., 2007; TORO; SCHÖNKNECHT; SCHRÖDER, 2009). Neuroimageamento funcional, incluindo estudos de ressonância magnética funcional (fMRI) e tomografia de emissão de pósitrons (PET) utilizando 2-deoxi-2-[^{18}F]Fluoro-D-glicose (FDG), demonstraram alterações metabólicas regionais que correlacionam com o declínio cognitivo (FOUQUET et al., 2009; SPERLING et al., 2010). Estudos animais estabeleceram diversas relações entre essas condições, demonstrando alterações metabólicas e mitocondriais no encéfalo de animais com comprometimento cognitivo (BLALOCK et al., 2010; DUMONT et al., 2009; QUICK et al., 2008) e alterações na cognição e

modificações neuronais nos encéfalos de animais com disfunções metabólicas (MIELKE et al., 2006; STRANAHAN et al., 2008; WINOCUR; GREENWOOD, 1999).

Considerando que a compartimentalização metabólica parcial entre astrócitos e neurônios é necessária para a formação e manutenção apropriada das funções cognitivas como a memória de longo prazo (SUZUKI et al., 2011), torna-se extremamente interessante a investigação acerca dos aspectos relativos a essa cooperação durante o processo do envelhecimento, tão claramente caracterizado por perdas cognitivas significativas e aumento da suscetibilidade a processos neurodegenerativos.

1.4 Justificativa e Objetivos

O processo de envelhecimento tem se tornado cada vez mais relevante para a sociedade. Com uma crescente parcela da população tornando-se idosa, a procura pelo entendimento deste processo se mostra não apenas interessante, como também necessária.

Acompanhado e caracterizado por maior fragilidade e susceptibilidade a doenças, o envelhecimento tem grande impacto sobre a economia de qualquer país cuja pirâmide social vem mudando de forma. A diminuição na proporção de cidadãos jovens : idosos ou, mais especificamente, da classe trabalhadora : classe aposentada é um fenômeno crescente em diversos países e que tem impacto bastante óbvio na economia de qualquer nação.

No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística mostram um aumento na expectativa de vida de 74,9 em 2013 para 75,2 em 2014 e 75,5 em 2017. Estudos da década de 90 mostram estimativas de prevalência de demência em população acima de 65 anos de 7,1%, dos quais mais da metade são casos de Alzheimer (HERRERA et al., 2002). Sendo assim, estratégias que tornam possível a manutenção da saúde em populações mais idosas mostram-se extremamente promissoras, ao passo que permitem não apenas a redução de custos relacionados à saúde, como também o aumento da idade economicamente produtiva da população.

Coerente com essa vertente que busca o prolongamento da faixa etária saudável e ativa, este trabalho tem como objetivo o estudo do processo de envelhecimento, particularmente no tecido encefálico, com a finalidade de se compreender as mudanças na dinâmica fisiológica que ocorrem com o envelhecimento e que podem se traduzir em perda funcional e cognitiva. Será focado aqui o estudo da influência do processo de envelhecimento e da sinalização da proteína Klotho sobre a via de sinalização da insulina no sistema nervoso

central, especificamente em neurônios e astrócitos, e sobre certos parâmetros relacionados ao metabolismo energético dessas células.

Considerando que função neuronal adequada (e, portanto, desempenho cognitivo saudável) requer uma cooperação metabólica apropriada entre astrócitos e neurônios, este trabalho foca na investigação das propriedades da proteína antienvhecimento Klotho sobre a regulação do metabolismo energético e da sinalização de insulina de ambos os tipos celulares, além de seus efeitos em parâmetros característicos do processo de envelhecimento.

Assim, auxiliando na compreensão dos efeitos da proteína Klotho sobre aspectos do metabolismo energético do sistema nervoso central, espera-se que este trabalho contribua para o entendimento das mudanças funcionais que ocorrem com o envelhecimento e que, com isso, novas estratégias para a manutenção da função neuronal e cognitiva possam ser traçadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

A totalidade do trabalho apresentado aqui é, na realidade, a compilação de resultados obtidos em diferentes centros de pesquisa, o que reflete, portanto, na variedade de animais utilizados e suas respectivas origens. Claramente, cada experimento foi iniciado e concluído com a mesma espécie e a mesma origem de animal.

Camundongos mutantes hipomórficos para a proteína Klotho com *background* genético misto de C57BL/6J e C3H/J foram utilizados para a caracterização de alguns aspectos do metabolismo energético do sistema nervoso central desses animais. Casais heterozigotos foram disponibilizados pelo Prof. Dr. Makoto Kuro-o (Department of Pathology, The University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX, EUA) para o Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob os cuidados da Dr^a. Lucia Andrade, que gentilmente cedeu matrizes para a criação de colônia no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Para a realização da maioria dos experimentos, apenas camundongos machos foram utilizados, descendentes do cruzamento entre irmãos heterozigotos para a mutação no gene da proteína Klotho (*kl/+*). Animais homozigotos (*kl/kl*) para a mutação apresentam expectativa de vida extremamente reduzida, em torno de 16 semanas. Por esse motivo, animais de cada grupo genotípico foram eutanasiados com 8 semanas de vida. Animais de ambos os gêneros também foram utilizados para a aferição da resposta glicêmica em um teste de tolerância à glicose.

Para os estudos de comparação de diferentes estágios no processo de envelhecimento, camundongos C57BL/6J foram adquiridos do Biotério de Criação de Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular. Camundongos machos foram eutanasiados com 4, 12 ou 18 meses de idade e estruturas encefálicas dissecadas para posterior utilização.

Durante o período de permanência no Biotério, os animais tiveram acesso livre a água e a comida (ração para roedores – Nuvilab CR1[®]), mantidos sob condições padrões de temperatura (aproximadamente entre 21 ± 2 °C), mantendo o ciclo claro-escuro de doze horas

(luz ligada às 7:00). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno (16 cm de altura, 30 cm de largura e 38 cm de comprimento) forradas com maravalha. Todos os experimentos foram realizados no período claro (8:00 – 12:00).

As culturas primárias de glia e astrócitos foram realizadas utilizando córtices encefálicos de camundongos C57BL/6J neonatos (dia pós-natal entre 0 e 3), de ambos os sexos. Já as culturas neuronais foram obtidas com o uso de material cortical encefálico de embriões (dia de desenvolvimento embrionário entre 16 e 17) de camundongos C57BL/6J; ou de córtices e hipocampus de embriões (dia de desenvolvimento embrionário 18) de ratos Sprague-Dawley.

Os animais utilizados e os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas, protocolo registrado sob nº 63 nas fls. 07 do livro 03, aprovado em 29 de maio de 2013 e prorrogado em 12 de maio de 2017 (Of. CEUA. 014.2017) até 29 de maio de 2021. A utilização dos animais e todos os procedimentos experimentais foram julgados adequados e de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

2.2 Genotipagem

A genotipagem dos camundongos mutantes para a proteína Klotho foi realizada na prole de casais heterozigotos *kl/+*, utilizando um protocolo adaptado do procedimento descrito por Kuro-O e colaboradores (KURO-O et al., 1997). Para este fim, amostras de aproximadamente 0,5 cm de cauda foram retiradas de animais em idade de desmame (21 dias). As amostras foram digeridas em solução de lise (Tris-HCl 100 mM; NaCl 0,2 mM; SDS 0,2%; EDTA 5 mM; Proteinase K 0,1 mg/ml; Pronase E 0,1 mg/ml) em agitação a 50 °C por uma hora. O material não digerido foi precipitado por centrifugação a 1500 g por 15 minutos e descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µl de isopropanol para a insolubilização do DNA e sua precipitação se deu por outra centrifugação a 1500 g por 15 minutos. O álcool isopropílico foi descartado e o material precipitado lavado com etanol 70%. Após descarte do álcool etílico o precipitado de DNA foi ressuscitado em tampão Tris-EDTA (TE, Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

O gene hipomórfico da proteína Klotho foi obtido com a inserção de uma sequência de nucleotídeos em sua região promotora. A amplificação dos segmentos dos alelos do gene

da proteína Klotho compreende a região promotor, de forma que o segmento amplificado correspondente ao alelo mutado é aproximadamente 450 pb maior do que o segmento correspondente ao alelo selvagem (920 pbs contra 458 pbs, respectivamente). Assim sendo, foram utilizados três *primers*: um *primer* senso para a sequência mutada, um para a sequência selvagem, e um anti-senso que anela em ambas as formas.

A reação de PCR foi montada na solução correspondente (1X LA PCR buffer TaKaRa Mg plus, mistura de dNTP a 0,2 mM de cada nucleotídeo, 0,2 μM do primer 1*, 0,2 μM do primer 2**, 0,2 μM do primer 3*** e TaKaRa LA Taq polimerase a 25 mU/mL). 1 μL da solução de DNA dissolvido em TE foi adicionado a 50 μL da solução de reação e após a denaturação a 94 °C por 20 min, a seguinte amplificação foi realizada por 30 ciclos:

- 94 °C por 30 segundos
- 56 °C por 30 segundos
- 72 °C por 1,5 minuto
- 10 minutos adicionais a 72 °C para extensão

A eletroforese foi feita em gel 1,5% agarose-TAE (TAE, Tris-acetato-EDTA, Tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e as bandas correspondentes ao gene selvagem e ao gene mutado observados em altura correspondente a 458 pb e 920 pb, respectivamente, conforme Figura 5.

* 5' TGGAGATTGGAAGTGGACG 3'

** 5' CAAGGACCAGTTCATCATCG 3'

*** 5' TTAAGGACTCCTGCATCTGC 3'

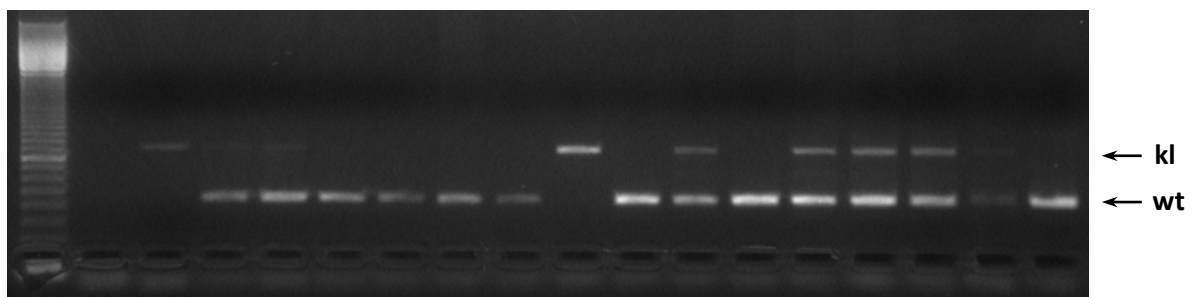


Figura 5 - Resultado da genotipagem de camundongos Klotho. Imagem representativa de gel de PCR após amplificação dos genes da proteína Klotho. Animais *+/+* apresentam amplificação apenas de um segmento, mais leve, enquanto animais *kl/kl* apresentam apenas o segmento mais pesado. Heterozigotos *kl/+* apresentam amplificação de ambos os segmentos. *kl*: produto de PCR do gene *klotho* mutado; *wt*: produto de PCR do gene selvagem da proteína Klotho.

2.3 Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose e Aferição de Glicemia

O teste de tolerância à glicose foi feito através de injeções intraperitoneais de glicose (2 g / kg de animal) em 500 µL de solução tampão fosfato salina (0,1 M, pH 7,4). Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e medições de glicemia feitas imediatamente antes da injeção e 15, 30, 60 e 120 minutos após a mesma.

Para a aferição da concentração de glicose, uma pequena amostra de sangue foi colhida da cauda dos animais e a concentração de glicose aferida através de método eletroquímico iniciado por oxidação enzimática do substrato, disponível como um glicosímetro comercial (Accu-check Active, Roche).

2.4 Cultura Primária de Glia e Purificação de Astrócitos

Camundongos neonatos com até 3 dias de vida pós-natal foram decapitados com o auxílio de uma tesoura e a caixa craniana aberta para exposição do encéfalo. Depois de retirada cuidadosa do tecido encefálico, esse foi depositado em solução HHGN (solução balanceada de sais de Hanks, tamponada com HEPES 2,5 mM, acrescida de glicose 35 mM, bicarbonato de sódio 4 mM e 1% de penicilina e estreptomicina – concentração de atividade final equivalente a 100 U/ml) em uma placa de Petri.

Após cuidadosa dissecação do córtex, as meninges foram retiradas completamente com o auxílio de pinças e ampliação conseguida através da utilização de lupa cirúrgica (modelo Stemi 2000, Zeiss) e transferidas para outra placa de Petri contendo HHGN suficiente para manter as estruturas submersas.

A placa de Petri contendo os córtices livres de meninges foi levada ao fluxo laminar onde foi feita a transferência das estruturas para uma nova placa de Petri, contendo dessa vez solução de tripsina-EDTA (0,5 g de tripsina/l, 0,2 g de EDTA 4Na.2H₂O/l, GIBICO), onde foram cortados em pequenos pedaços e mantidos por 20 minutos em incubadora a 37 °C.

Após os 20 minutos, foi feita a transferência total do material cortical para um tubo de centrifugação cônico contendo 5 mL de meio de cultivo [DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de glutamina, 20 mM glicose, 2 mM HEPES, acrescido de 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina (100 U/ml) e DNase (concentração final de 10 Kunitz/ml, Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, EUA)].

Para a dissociação mecânica do tecido, foi utilizada uma pipeta Pasteur e diversos ciclos de aspiração / dispensação foram realizados até a homogeneização completa das

estruturas. Nesse momento, a solução homogênea foi vertida sobre um *cell strainer* de 70 μm , a contagem de células feita em hemocítmetro, e as células plaqueadas em concentração equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células/ cm^2 em frascos de cultivo, mantidas em incubadora a 37 °C, 5% de CO_2 , em meio de cultivo (previamente descrito) por aproximadamente 14 dias, quando alcançam aproximadamente 90% de confluência. A troca do meio foi feita uma vez por semana.

Nesse momento, a cultura é compreendida de uma mistura de células gliais, composta principalmente por uma camada de astrócitos sobre a qual é possível identificar células microgлияis. Para a purificação de astrócitos, os frascos de cultivo, após alcançarem a confluência desejada, foram atados a um agitador horizontal, onde permaneceram em agitação por 15 horas, a 37 °C a uma velocidade de 180 rpm. Após esse período o sobrenadante (contendo microglia, oligodendrócitos e possíveis neurônios) foi desprezado e as células aderidas ao frasco foram ressuspensas com solução de tripsina-EDTA e plaqueadas para a realização de futuros experimentos.

2.5 Cultura Primária Embrionária de Neurônios

Camundongos C57BL/6J foram utilizados para a realização de cultura embrionária de neurônios corticais. Para o acasalamento, foram feitos casais ou trios que permaneceram juntos por duas noites. Na manhã seguinte, os animais foram separados, sendo verificada a presença do tampão mucoso, resultante do acúmulo de esperma no canal vaginal das fêmeas. Uma vez constatada a cópula, as fêmeas foram separadas e identificadas. Os demais animais continuaram isolados por 7 dias, período após o qual foram colocados novamente para acasalamento. Fêmeas com 16-17 dias de gravidez foram utilizadas e seus embriões retirados. De forma alternativa, ratas Sprague-Dawley com 18 dias de gestação foram utilizadas para a realização de culturas de neurônios corticais e hipocampais.

As fêmeas grávidas foram anestesiadas com isofurano e feita cesariana para retirada dos filhotes. Imediatamente após a retirada dos embriões, foi realizada a decapitação do feto com auxílio de uma tesoura, e aberta a caixa craniana. O encéfalo foi depositado em papel filtro umedecido em solução HHGN. A partir deste ponto, o encéfalo foi colocado em uma placa de Petri com HHGN, os hemisférios cerebrais abertos e, com auxílio de uma lupa, as estruturas dissecadas. O material encefálico dissecado foi colocado rapidamente em tubo cônico de centrifugação com meio Neurobasal estéril acrescido de 100 U/ml de penicilina e

100 µg/ml de estreptomicina. As estruturas foram mantidas em gelo até o término do procedimento cirúrgico.

Os hipocampos ou córtices dissecados foram cortados em pequenos pedaços e incubados em solução de tripsina (2 mg/ml) por 20 minutos em uma incubadora a 37 °C e 5% CO₂. Depois da remoção da solução de tripsina, os tecidos foram lavados duas vezes com HBSS, incubados em uma solução de inibição de tripsina (2 mg/ml) por um minuto e novamente lavados com HBSS. O tecido foi dissociado em HBSS contendo DNase 0,1 mg/ml por trituração mecânica com uma pipeta de vidro. As células foram contadas e plaqueadas (0,1 x 10⁶ céls/cm²) em placas pré-tratadas com polietilenoimina (Sigma-Aldrich). Os neurônios foram mantidos por duas semanas em Neurobasal (GIBCO) suplementado com B27 (GIBCO), 2 mM de glutamina, penicilina a 100 U/ml, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B. 50% do meio de cultura foi trocado duas vezes por semana.

2.6 Viabilidade Celular

Para avaliar uma possível toxicidade dos tratamentos utilizados, e também para verificar um possível papel protetor da proteína Klotho, foram feitos ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade nas culturas de astrócitos e neurônios.

2.6.1 Ensaio de viabilidade celular: redução do formazan colorido (MTT)

O ensaio de MTT foi realizado como descrito anteriormente (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989; MOSMANN, 1983). Este método é baseado na habilidade de células viáveis de converter o sal tetrazólio (MTT) para formazan colorido. A viabilidade das células foi determinada pela adição de MTT (12 mM) na cultura celular. Após 2 horas de incubação a 37 °C, os cristais escuros formados foram dissolvidos adicionando DMSO, e a absorbância no comprimento de onda de 570 nm medida por um leitor de microplaca.

2.6.2 Ensaio de citotoxicidade: liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A morte celular foi avaliada também pela liberação de LDH. A atividade de LDH em sobrenadantes de cultura celular foi observada através de um teste enzimático descrito anteriormente (DECKER; LOHMANN-MATTHES, 1988). Foi utilizado um kit de detecção citotóxica (Promega, Madison, EUA) e a quantidade de LDH liberada pelas células foi detectada por um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490 nm.

2.7 Imunofluorescência

Após cultivo em lamínulas ($1,0 \times 10^4$ células por lamínula redonda de 13 mm), o meio foi retirado e as células lavadas 3X em PBS gelado e fixadas com metanol 100% por 15 minutos a 4 °C. Após esse período, as células foram novamente lavadas em PBS e incubadas com soro de bloqueio (PBS + 0,05% Triton X-100 + 5% de soro normal de burro) por duas horas. O excesso de soro de bloqueio foi retirado e as células incubadas em solução do anticorpo primário (solução de bloqueio + anticorpo primário) *overnight*. Para as marcações realizadas neste trabalho e avaliação de pureza das culturas astrocíticas e das culturas embrionárias de neurônios corticais, foram utilizados anticorpos contra GFAP (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA) e MAP-2 (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA), a concentrações de 1:500 e 1:100, respectivamente. Para os estudos de translocação de p65 o anticorpo contra p65 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) foi utilizado a uma concentração de 1:100. As células foram então lavadas com solução de bloqueio, incubadas com solução de anticorpo secundário (PBS + Triton X-100 + anticorpo secundário correspondente) conjugado a Alexa Fluor® 488 ou 594 (Thermo Fischer Scientific) a uma concentração de 1:1000 durante 2 horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz e submetidas a leve agitação. Após lavagem com PBS, as células foram finalmente incubadas com solução de DAPI feita em PBS + Triton X-100 por 15 minutos, lavadas e as lâminas montadas utilizando Immu-Mount (Thermo Fischer Scientific) como meio de montagem.

Para a captura das imagens foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse 80ti (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA), máquina Nikon Digital Camera DXM 1200C (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA) e o software de imagem utilizado foi o NIS-Elements Advanced Research 2,30 2006 (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA). Foram capturados 6 campos representativos de cada lamínula.

2.8 Ensaio de Western Blotting

Extratos de proteína total foram obtidos através de homogeneização da amostra em tampão de lise RIPA contendo inibidores de proteases e fosfatases (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sódio 1%, pirofosfato de sódio 2,5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e coquetel inibidor de protease).

Frações citoplasmática e nuclear do extrato proteico foram alcançadas utilizando-se o método descrito por Rong e Baudry (RONG; BAUDRY, 1996), no qual um tampão de lise (HEPES

10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, PMSF 0,5 mM, leupeptina 2 $\mu g/ml$, antipaína 2 $\mu g/ml$, NaF 30 mM, pirofosfato de sódio 20 mM, β -glicerofosfato 5 mM) acrescido de NP-40 (concentração final de 0,25%) é utilizado para a extração das proteínas da fração citoplasmática e o precipitado, formado pela centrifugação do lisado, é isolado e dele são extraídas as proteínas da fração nuclear com um tampão de extração (HEPES 20 mM, glicerol 25%, $MgCl_2$ 1,5 mM, NaCl 300 mM, EDTA 0,25 mM, PMSF 0,5 mM, leupeptina 2 $\mu g/ml$, antipaína 2 $\mu g/ml$, NaF 30 mM, pirofosfato de sódio 20 mM, β -glicerofosfato 5 mM).

A dosagem de concentração de proteína foi avaliada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando reagente da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina (Bio-Rad Laboratories) forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

Quantidades iguais de proteína para cada amostra foram utilizadas para preparação com tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, glicerol 20% v/v, DTT 0,2 M, azul de bromofenol 0,02%, pH 6,8) e fervidas a 95 °C por 5 minutos. Quantidades iguais de proteína foram fracionadas usando géis bis-tris NuPAGE 4-12% (Invitrogen) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi então incubada em uma solução de 5% de albumina em tampão tris salina com tween 20 (TBST) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, 0,5% Tween 20, pH 8,0) por 2 horas. As membranas foram incubadas em solução de anticorpo primário (TBST, 1% de albumina) com anticorpos contra diversas proteínas (Tabela 1) a 4 °C *overnight*. As membranas foram então lavadas três vezes com TBST e incubadas com solução de anticorpo secundário (TBST, 1% de albumina) contendo anticorpos anti-IgG-Fc de coelho, camundongo ou cabra conjugados com peroxidase, a uma concentração de 1:4000, por duas horas. Após três lavagens com TBST, as membranas foram reveladas usando um sistema de ECL (enhanced chemiluminescence) à base de luminol (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific).

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados nos ensaios de Western Blotting

Akt	1:1000	Cell Signaling	#9272
p-Akt SER473	1:1000	Cell Signaling	#9271
ERK 1/2	1:1000	Cell Signaling	#4695
p-ERK 1/2 THR202/TYR204	1:1000	Cell Signaling	#9106
mTOR	1:1000	Cell Signaling	#2983
P-MTOR SER2448	1:1000	Cell Signaling	#5536
p65	1:500	Santa Cruz	Sc372
PFKFB3	1:1000	Cell Signaling	#13123
FOXO1	1:1000	Cell Signaling	#2880
p-FOXO1 SER256	1:1000	Cell Signaling	#9461
FOXO3	1:1000	Cell Signaling	#2497
p-FOXO3 SER253	1:1000	Cell Signaling	#9466
catalase	1:1000	Santa Cruz	Sc50508
MCT2	1:500	Santa Cruz	Sc14926
MCT4	1:500	Santa Cruz	Sc50329
LDHA	1:1000	Sigma-Aldrich	AV54777
LDHB	1:1000	Sigma-Aldrich	AV48210
GFAP	1:1000	Cell Signaling	#12389
Actina	1:5000	Sigma-Aldrich	A2066

2.9 PCR em Tempo Real

O RNA foi isolado e purificado com RNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA). Após tratamento com DNase I, o RNA foi quantificado e quantidades iguais foram submetidas à transcrição reversa usando o SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies). A análise do PCR em tempo real foi feita com o CFX96 RealTime System (BioRad, Hercules, CA), e Sybr® Green PCR Master Mix de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). O método comparativo de $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado para a determinação de mudanças de genes-alvo normalizadas relativas a um calibrador de referência (controle endógeno) (*rplp0*, *actina* e *hprt1*). A expressão gênica relativa foi determinada utilizando o teste de randomização e recolocação *Pair Wise P (H1)* (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) realizado no programa REST 2009. Os pares de *primers* utilizados para a amplificação de cada gene encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequências dos *primers* utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→ 3')
<i>Cxcr4</i>	CAGGTAGCAGTGAAACCTCTG	CTTGTCCTCATGCTCCTTAG
<i>Fads1</i>	CTGGTCTACCTGCTTCACATC	TCAGGTGGCCAATCACAAA
<i>Gpr12</i>	TATTCGGCAGCACTGAAGG	CTGCCTATAGTAGGAACATGG
<i>Hacd3</i>	AAGACTCACCAAGCAAGAGAAG	GGTTGACAAAGATCCAGGAGGA
<i>Hk2</i>	TCTCTACCACATGCGTCTCT	CCATTGTCTGTCCACCCTTACTC
<i>Kcnj13</i>	CTTCTCTCTGGAGACACAATTAC	TGTTGGCCACTTGGAAGATAA
<i>Plcg1</i>	GGGTCCATTGATATCCGAGAAA	CCTGCAGTGTATCCTCCATTAG
<i>Srfp5</i>	ATGCTGCACTGCCACAA	TTGTCTAACTGTGGGCAAGG
<i>Shisa8</i>	GGACACTGACAGAACTTCTCAA	GGTGCAACCTCTGTAGCC
<i>Socs3</i>	GAGATTTGCTTCGGGACTA	CCAGCTGGTACTCGCTTT
<i>Slc16a1</i>	ATGATCGCTGGTGGTGTGCTGTCT	GAAAGCAAGCCCAAGACCTCCAAT
<i>Slc16a7</i>	CACGTCAACACAAAGTGGCT	GACTGATGTTTTCTTTGGCTGT
<i>Slc16a4</i>	GATGGGAATGACCAAGACATTTG	GACATAGCCACCAGAGACAAG
<i>Pfkfb3</i>	AGAGGTCAGAGAACATGAAGAGC	ACATGCCGACCTCCATTCTC
<i>G6pd</i>	ATAGACTAGCCCGAAGCTCCT	TGCTCTGCCATGATGTTTTCTGA
<i>Gapdh</i>	CCCTTAAGAGGGATGCTGCC	TACGGCCAAATCCGTTTACA
<i>Actg1</i>	GGTGTCCGGAGGCACTCTT	TGAAAGTGGTCTCATGGATACCA
<i>Hprt1</i>	TATGCCGAGGATTTGGAAAA	ACAGAGGGCCACAATGTGA
<i>Rplp0</i>	AACCCTGAAAGTGTCTGACATCACA	ACTCAGTCTCCACAGACAATGCCA

2.10 Medida da Liberação de Lactato

A dosagem de lactato em meio de cultura foi feita com base no método descrito por Paradis e Nadeau, 1982 (PARADIS; NADEAU, 1982) utilizando, para isso, um kit encontrado comercialmente (Lactate Assay Kit, Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, EUA).

Basicamente, o método enzimático utiliza-se da reação catalisada pela lactato desidrogenase em converter lactato a piruvato reduzindo, no processo, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). A reação é forçada na direção da formação de piruvato e NADH (forma reduzida do NAD) devido ao excesso de NAD adicionado ao meio reacional. O produto formado por esse kit comercial pode ser quantificado colorimetricamente (absorção em 570 nm) ou por fluorometria ($\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$ nm). Para este trabalho, foram feitas medidas colorimétricas.

Para a avaliação da liberação de lactato, astrócitos foram plaqueados em placas de 12 poços (1×10^5 astrócitos/poço) e cultivados até confluentes. As células foram então lavadas com HBSS e tratadas em DMEM sem soro. Experimentos avaliando a liberação de lactato evocada por Klotho sob diferentes concentrações de glicose foram feitos usando DMEM com alta (4,5 g/l) ou baixa (1 g/l) concentração de glicose com ou sem Klotho recombinante 1,0 nM

(R&D Systems). A participação de MCTs, da ERK e do FGFR1 foi avaliada incubando-se as células com AR-C155858 1 μM (Tocris Biosciences), PD 98059 10 μM (Cayman Chemical Company) ou PD 166866 500 nM (Sigma-Aldrich), respectivamente, por 5 a 30 minutos antes e durante o tratamento com Klotho. Após 1 hora alíquotas do sobrenadante foram coletadas e 50 μl usados para a quantificação de lactato.

2.11 Transfecção com o Plasmídeo *Laconic* e Imageamento FRET

A concentração intracelular de lactato foi avaliada com a sonda genômica sensível a lactato *Laconic*, que utiliza como fluoróforos o mTFP e o Venus como um par de FRET. Astrócitos foram plaqueados em placas de cultivo de 35 mm com fundo de vidro (MatTek Corporation) e transfectados com a sonda *Laconic* (gentilmente cedido pelo Dr. Barros, plasmídeo número 44238 da Adgene) (SAN MARTÍN et al., 2013) usando o Fugene 6 como reagente de transfecção (Promega). 0,5 μg de DNA foi aplicado a cada placa, em uma proporção de 1:6 de DNA:Fugene. Após 24 horas as células foram incubadas em fluido cerebrospinal artificial (aCSF: NaCl 112 mM, KCl 3 mM, CaCl_2 1,25 mM, MgCl_2 1,25 mM, glicose 2 mM, HEPES 10 mM e NaHCO_3 24 mM, pH 7,4) e imagens do mTFP (emissão ~ 480 nm) e Venus (emissão ~ 530 nm) foram adquiridas usando um laser de excitação em 430 nm, em um microscópio confocal LSM 510. A razão mTFP/Venus na presença de 1,0 μM de inibidor de transportador de ácidos monocarboxílicos AR-C155858 (Tocris Biosciences) e aCSF ou Klotho recombinante a 1,0 nM (R&D Systems) foi monitorada por 10 minutos para determinar a taxa de acúmulo de lactato intracelular. Todas as razões do FRET (mTFP/Venus) são expressadas relativas à linha basal igual a 1. A inclinação inicial da acumulação de lactato foi determinada por regressão linear dentro da mesma faixa de valores das razões mTFP/Venus.

2.12 Transfecção com Plasmídeo *FOXO Reporter*

A atividade do fator de transcrição FOXO foi avaliada utilizando-se plasmídeo pGL-3 x DBE (ZANELLA et al., 2009) que contém 3 cópias de promotores responsivos à FOXO e que codifica luciferase *firefly*. Juntamente com esse plasmídeo, foi transfectado outro plasmídeo para controle interno, pRL-TK (Promega), com expressão constitutiva de luciferase *renilla*.

Astrócitos foram plaqueados em placas de 60 mm de diâmetro (1×10^6 céls/placa) e transfectados após 48 horas (aproximadamente 60% de confluência) utilizando Fugene 6 (Promega) com 1 μg de DNA DBE, 0,2 μg de DNA pRL-TK e proporção DNA:Fugene de 1:6. Após 48 horas, os tratamentos foram realizados lavando-se as células 2 vezes com PBS e fazendo a

incubação por 24 horas com DMEM contendo alta (4,5 g/l) ou baixa (1 g/l) concentração de glicose, com ou sem 1 nM de Klotho.

Após o período de tratamento as células foram coletadas e o precipitado celular lisado de acordo com as indicações do sistema Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega). Volumes iguais de amostra foram utilizados e a luminescência desenvolvida e lida de acordo com as indicações do fabricante (Promega) em placas brancas opacas com leitura em leitor de placas Synergy H1 Hybrid Multi-Mode (BioTek).

Os resultados são apresentados como a razão da fluorescência da luciferase *firefly* pela luciferase *Renilla*, normalizados pela média do grupo controle (DMEM alta glicose).

2.13 Ensaio de Atividade Proteassomal

A atividade do proteassoma foi aferida em cultura de neurônios hipocampais de ratos utilizando o kit Proteasome 20S Activity Assay (Sigma-Aldrich). Neurônios foram plaqueados em microplacas pretas de 96 poços com fundo plano e translúcido, cultivados em condições normais por 14 dias e então submetidos a condições diferentes: 24 horas com meio completo (grupo controle), 24 horas com meio sem insulina, e tratamento com 1 nM de Klotho por 24 horas. Um quarto grupo experimental foi feito tratando as células com o inibidor de proteassoma MG132 a 50 μ M por duas horas antes da realização do ensaio.

O ensaio baseia-se na quebra proteolítica (realizada pelo complexo proteassomal) do substrato fluorogênico LLVY-R110. A clivagem do LLVY-R110 pelo proteassoma gera o produto R110 que apresenta intensa fluorescência verde (λ_{ex} = 480-500 nm e λ_{em} = 520-530 nm). Logo após os tratamentos, o meio de cultivo foi substituído com solução contendo o LLVY-R110, incubação feita por 1 hora, e a leitura de fluorescência realizada em leitor de placa Synergy H1 Hybrid Multi-Mode (BioTek). Valores de fluorescência foram corrigidos pelo branco (poço sem células) e são apresentados em função da média dos valores do grupo controle.

2.14 Imunoprecipitação para Avaliação de Fosforilação e Ubiquitinação de Proteínas

Amostras de astrócitos ou neurônios submetidos a diferentes tratamentos (como notado) foram coletadas e homogeneizadas em tampão de lise não-denaturante (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, glicerol 10%, 1% NP-40 e 2 mM EDTA, com inibidores de fosfatase NaF 30 mM, pirofosfato de sódio 20 mM, β -glicerofosfato 5 mM, e inibidores de protease leupeptina

2 µg/ml, antipaína 2 µg/ml) com ultrasonicação em gelo. 100 µg de proteína (diluídos em 400 µL de tampão) foram incubados com 2 µg de anticorpo contra fosfo-tirosina (clone 4g10, Millipore) ou contra mono- e poli-ubiquitina K²⁹, K⁴⁸, K⁶³ (clone FK2, Enzo Life Sciences) e, para seus respectivos controles negativos, 2 µg de IgG de coelho ou IgG de camundongo. A incubação foi feita *overnight* sob leve agitação orbital. À solução foram adicionados 20 µl de suspensão de 50% de microesferas de agarose com proteína A/G covalentemente imobilizadas a elas, e nova incubação sob leve agitação foi feita por 3 horas. As amostras foram centrifugadas e lavadas 5 vezes com PBS gelado. O precipitado final foi ressuspensionado em 20 µl de tampão de amostra SDS concentrado 3 vezes, homogeneizado e centrifugado novamente e então aquecido a 70 °C por 10 minutos. Após nova centrifugação as amostras foram carregadas em gel SDS PAGE e analisadas por *western blotting* contra diferentes proteínas (ver Tabela 3)

Tabela 3 - Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de imunoprecipitação

Imunoprecipitação	Western Blotting
	LDHA
4g10	PDHK1
	PKM2
FK2	PFKFB3

2.15 Estimativa da Atividade da Lactato Desidrogenase

Uma possível modulação de atividade da lactato desidrogenase foi investigada em astrócitos tratados com Klotho 1 nM por 24 horas. Após tratamento, as células foram coletadas em PBS com inibidores de fosfatase e protease (NaF 30 mM, pirofosfato de sódio 20 mM, β-glicerofosfato 5 mM, leupeptina 2 µg/ml e antipaína 2 µg/ml) e homogeneizados por ultrasonicação.

2 µg de proteína total do extrato foram utilizados para o desenvolvimento da reação da lactato desidrogenase, possibilitada pelo uso do kit de detecção citotóxica (Promega, Madison, EUA), e a absorbância em comprimento de onda de 490 nm foi acompanhada por uma hora. A taxa de desenvolvimento da reação foi aferida pela inclinação das curvas obtidas e os valores de inclinação comparados como indicativos de velocidade máxima de reação catalisada pela enzima.

2.16 Estimativa de Incorporação do Análogo Fluorescente de Glicose 2-NBDG

O monitoramento indireto da incorporação de glicose foi feito através da utilização do análogo fluorescente de glicose 2-NBDG (2-(n-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)2-deoxiglicose). A 2-NBDG é um composto fluorescente e, após entrar nas células, sofre fosforilação no carbono 6. Subsequente metabolização por fosforilação no carbono 2 é impossibilitada devido à ausência de hidroxila nessa posição.

Astrócitos foram plaqueados em microplaca de 96 poços preta com fundo plano e translúcido e mantidos em cultura até atingida confluência. A ação da Klotho sobre a incorporação de glicose foi avaliada trocando-se o meio de cultivo por meio DMEM sem glicose com 50 μ M de 2-NBDG, com ou sem 1 nM de Klotho, e mantida incubação por 3 horas em incubadora com 5% CO₂ a 37 °C. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e a leitura feita em fluorímetro Synergy H1 Hybrid Multi-Mode (BioTek) com excitação a 460 nm e leitura em emissão a 540 nm.

2.17 Avaliação do Consumo de Oxigênio e Taxa de Acidificação do Meio Extracelular

A taxa de consumo de oxigênio (OCR) e a taxa de acidificação do meio extracelular (ECAR) astrocítica foram medidas em um analisador de fluxo extracelular Seahorse XF-96 (Seahorse Biosciences – Agilent). Foram plaqueados 5 x 10⁴ astrócitos / poço em uma microplaca Seahorse XF96 de 96 poços e o ensaio foi realizado após 48 horas. Cartuchos (Seahorse Biosciences – Agilent) foram hidratados em 200 μ L / poço de XF Calibrant (Seahorse Biosciences – Agilent) *overnight* em uma incubadora sem CO₂ a 37 °C. No dia do experimento, as células foram lavadas duas vezes com DMEM não tamponado, pH 7,4, contendo 25 mM de glicose, 2 mM de glutamina, com ou sem 1 μ M de piruvato, conforme discriminado. As células foram mantidas nesse meio com ou sem Klotho a 1 nM durante uma hora em incubadora sem CO₂ a 37 °C imediatamente antes da avaliação no equipamento. As medidas foram tomadas em 3 ciclos consecutivos com 3 minutos de homogeneização seguidos de 3 minutos de leitura. Após a determinação da taxa de respiração basal, a eficiência de acoplamento mitocondrial foi avaliada pela injeção de 1 μ M de oligomicina, a respiração máxima através da adição de 2 μ M de carbonil cianeto para-trifluormetoxifenilidrazona (FCCP), e a respiração não-mitocondrial pela injeção de 0,5 μ M de rotenona e antimicina A. Os resultados foram representados normalizados para a média das medidas basais do grupo controle.

2.18 Quantificação de Klotho por ELISA

Culturas de neurônios hipocâmpais de ratos foram utilizadas para os experimentos avaliando as concentrações intracelulares da proteína Klotho usando o kit de ELISA Rat KL/Klotho ELISA Kit (LSBio). As células foram coletadas nos dias de cultivo DIV 5, 10 e 15. Adicionalmente, no DIV 14, tratamentos de 24 horas foram feitos substituindo o meio de cultivo com novo meio composto por Neurobasal acrescido de B27 comum (contendo 4 µg de insulina / ml) ou B27 sem insulina, com ou sem glutamato (20 µM), e com ou sem uma mistura do antagonista de receptor AMPA, NBQX, e antagonista do receptor NMDA, APV, ambos a 20 µM. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e coletadas. Cada precipitado de células foi ressuspenso em 125 µl de PBS e as células lisadas por ultrasonificação.

Para a avaliação da quantidade de proteína Klotho em hipocampo de camundongos de diferentes idades, foram utilizados animais com 4, 12 e 18 meses de idade. Após homogeneização do tecido em PBS com a utilização de homogeneizadores vidro-vidro, a avaliação da concentração da proteína Klotho foi feita utilizando o kit de ELISA Mouse KL/Klotho ELISA Kit (LSBio).

Para ambos os casos, quantidades iguais de proteína foram utilizadas nos kits de ELISA, segundo instruções do fabricante. Os resultados são apresentados como pg de Klotho / µg de proteína total.

2.19 Análise de Expressão Gênica por Microarray

A extração de RNA de culturas de células controle e tratadas foi feita usando o kit Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA, USA). A concentração e qualidade do RNA foram avaliadas em um Nanodrop (Thermo Fischer, Waltham, MA) e no Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Chip (Agilent, Santa Clara, C). Quantidades iguais de RNA foram marcadas usando o kit de amplificação Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit e hibridizadas *overnight* ao *microarray* de oligos de camundongo Agilent SurePrint G3 8x60K (G4852A). Os dados crus do *microarray* foram primeiramente analisados por *scatter plot*, *principal component* e *gene sample z-scores based hierarchy clustering* para excluir possíveis *outliers*. Os resultados do *microarray* foram analisados usando DIANE 6.09, um programa de análise de *microarray* baseado em planilhas construído sobre o sistema SAM JMP 7.0. Os genes foram considerados diferentemente expressos após cálculo de valores p, *z-ratios* (que indicam a amplitude da

diferença entre os grupos experimentais) e a *false discovery rate* (FDR), um controle para a proporção esperada de hipóteses falsamente rejeitadas. Genes isolados com valores $p \leq 0,05$, $z\text{-ratios} \leq 1,5$ em ambas as direções, e $FDR \leq 0,05$ foram considerados significativamente alterados. Todos os resultados foram submetidos a Análise Paramétrica de Enriquecimento de Sets de Genes (PAGE) (KIM; VOLSKY, 2005) para ontologia de genes. A regulação de vias canônicas e não-canônicas foi aferida usando-se a Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Inc. Redwood City, CA), que permitiu a identificação dos efeitos do tratamento no banco de dados de genes Broad Institute Pathway. Requisitos mais rigorosos foram aplicados para a análise das vias canônicas e não-canônicas, com $p \leq 0,01$ e $FDR \leq 0,01$. A totalidade dos dados do microarray podem ser acessados no Gene Expression Omnibus, número de acesso GSE 100046.

2.20 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (Gel-Shift) para o NF- κ B

Este ensaio consiste na reação de ligação de proteínas de extrato nuclear com uma sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição, sendo esta previamente marcada com ^{32}P pela T4 polinucleotídeo quinase. Quando o meio reacional é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda de retardo).

2.20.1 Marcação da sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência foi marcado com a adição de ^{32}P ATP numa solução contendo Tampão T4 quinase, T4 quinase e água; nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μL de T4 quinase, 1 μL de ^{32}P ATP (3 Ci/mmol), 1 μL de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 μL de volume de reação. Após incubação a 37 °C por 10 minutos, o excesso de ^{32}P ATP foi retirado com resina Sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25) em um tubo de microcentrifuga, centrifugando-se por 1 minuto a 3000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio a atividade da sonda determinada, usando no ensaio aproximadamente 25000 cpm/ μL .

2.20.2 Reação de ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga 4 μL de tampão de ligação 5X (MgCl_2 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poli dIdc 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; glicerol 20%); extrato nuclear em quantidade suficiente para 5 μg de proteína; oligo frio em excesso, ou anticorpo específico para subunidades (para caracterizar especificidade); e H_2O q.s.p. para 20 μL de volume final (contando com a adição da sonda marcada).

O tubo foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μL), e novamente incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μL de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). O gel correu por volta de 2 horas a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi secado procedendo-se em seguida a exposição do filme ao gel em cassete a -20°C .

A revelação foi feita em sala escura, onde o filme foi mergulhado em solução reveladora diluída 5 vezes até as bandas aparecerem, lavando-se em água, e depois mergulhando-se o filme no fixador diluído 5 vezes.

2.21 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o teste T de Student ou análise de variância (ANOVA de uma ou duas vias) seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, de acordo com o mais apropriado para cada desenho experimental, usando o programa GraphPad Prism 7.0. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Resposta à Insulina e sua Respectiva Sinalização Intracelular Estão Alteradas em Camundongos Hipomórficos para a Proteína Klotho

Em seu trabalho original descrevendo os animais hipomórficos para a proteína Klotho, Kuro-o e colaboradores já haviam mostrado uma potencial correlação entre a insulina e as ações da Klotho (KURO-O et al., 1997). Analisando alguns parâmetros sorológicos, foi observado um estado de hipoglicemia nos animais Klotho hipomórficos, associado a níveis diminuídos de insulina no pâncreas. Nossa avaliação de glicemia e resposta à administração intraperitoneal de glicose confirmou o estado hipoglicêmico e a mais acentuada resposta à insulina em animais *kl/kl* (Figura 6). De forma interessante, machos e fêmeas se comportaram de forma diferente, sendo a relação entre a ação da insulina e a Klotho muito mais evidente em machos (área sob a curva: $+/+ = 808,5 \pm 121,6$; $kl/kl = 423,7,4 \pm 98,84$; glicemia basal: $+/+ = 5,7 \pm 0,6228$; $kl/kl = 3,03 \pm 0,7585$; $n = 4$). Em 2005, a fim de estudar mais a fundo os efeitos da proteína Klotho sobre a sinalização de insulina, Kurosu e colaboradores mostraram os efeitos da superexpressão da proteína Klotho sobre os níveis de glicose e resposta à insulina em animais de ambos os sexos (KUROSU, 2005). Corroborando com o mostrado aqui, Kurosu mostrou que fêmeas que superexpressam Klotho não mostraram nenhuma diferença em seus níveis insulinêmicos de jejum ou testes de tolerância à insulina, enquanto machos superexpressando Klotho apresentaram hiperinsulinemia normoglicêmica e resposta diminuída em testes de tolerância à insulina.

Considerando que a sinalização de insulina e, particularmente, sua atividade sobre os fatores de transcrição da família FOXO tem um importante, e evolutivamente conservado, papel na regulação do processo de envelhecimento e longevidade, avaliamos o eixo mTOR/AKT/FOXO no hipocampo de animais mutantes para a proteína Klotho (Figura 7). Como o esperado, o eixo mTOR/AKT dos animais *kl/kl* apresenta maior nível de fosforilação, indicando maior atividade dessas quinases. Consistente com uma maior sensibilidade à insulina, o extrato proteico do hipocampo de animais *kl/kl* contém maiores níveis de fosforilação de mTOR no resíduo de serina 2448 ($+/+ = 1,00 \pm 0,1458$; $kl/+ = 1,13 \pm 0,157$; $kl/kl = 1,71 \pm 0,1202$; $n = 4$) (Figura 7A), um possível sítio de fosforilação específico para a AKT (NAVÉ et al., 1999). A proteína mTOR com esse estado de fosforilação é a principal forma encontrada no complexo mTORC1 (COPP; MANNING; HUNTER, 2009), essencial para regulação de funções

anabólicas importantes na célula como síntese de proteínas e lipídeos e inibição de autofagia (LAPLANTE; SABATINI, 2013). O complexo mTORC2, por outro lado, é responsável pela fosforilação da AKT no resíduo de serina 473 (SARBASSOV, 2005) aumentando, dessa forma, seu espectro de atividade que passa a incluir, por exemplo, os fatores de transcrição FOXO.

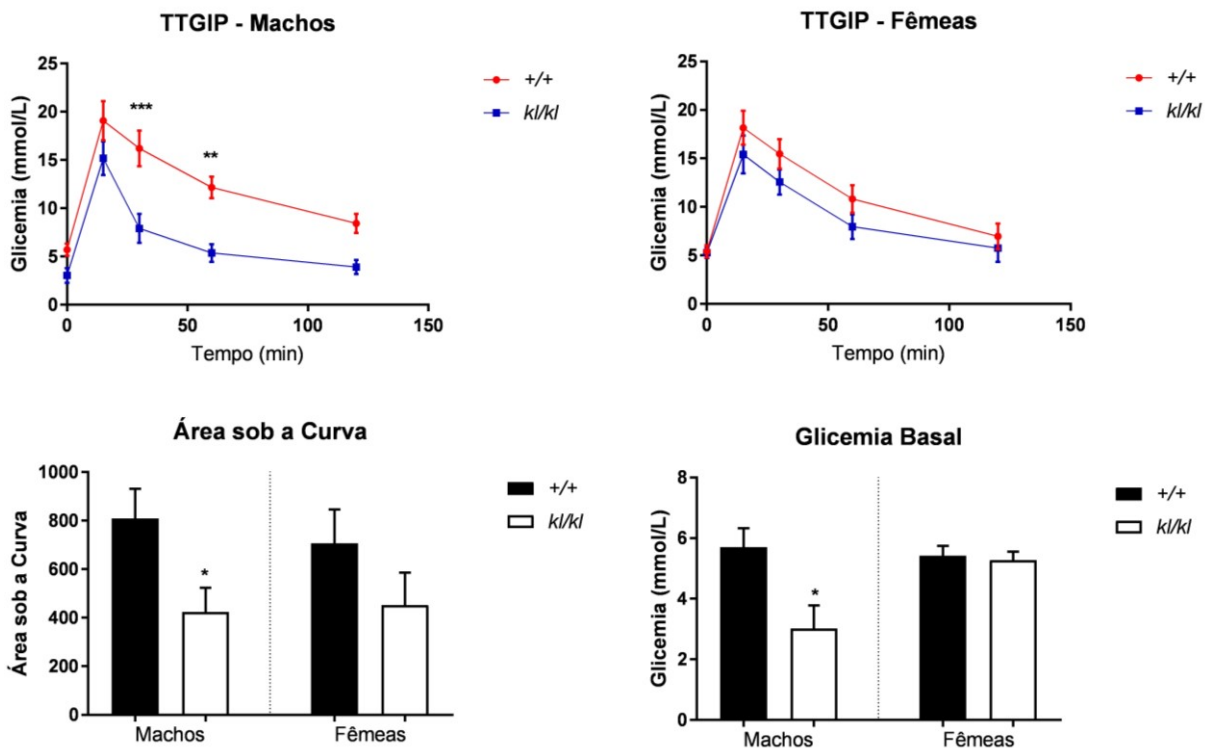


Figura 6 - Teste de tolerância à glicose intraperitoneal em camundongos *Klotho* de ambos os sexos. Camundongos de ambos os sexos da linhagem hipomórfica para a proteína *Klotho* em 6 horas de jejum foram testados quanto à variação glicêmica após administração intraperitoneal de glicose (2 g/kg). A aferição da glicemia em jejum revelou estado hipoglicêmico em camundongos machos hipomórficos para a proteína *Klotho* e uma diminuição mais acentuada da glicemia após administração i.p. de glicose, revelando maior sensibilidade à insulina. A aferição dos mesmos parâmetros em fêmeas não revelou qualquer efeito da proteína *Klotho* sobre a sensibilidade à insulina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo +/+. Análise temporal do TTGIP feita por ANOVA de duas vias. Comparações da área sob a curva e glicemia basal feitas por teste T de Student. Dados representados como média \pm SEM de 4 animais.

De forma consistente com o observado até aqui, avaliação dos níveis de fosforilação da AKT em resíduo Ser473 no hipocampo dos animais hipomórficos para a proteína *Klotho* também mostrou níveis mais elevados em comparação aos animais selvagens (+/+ = $1,00 \pm 0,09912$; kl/+ = $1,57 \pm 0,05869$; kl/kl = $2,00 \pm 0,1244$; n = 4) (Figura 7B). Essa maior atividade da AKT explica os elevados níveis de fosforilação dos fatores de transcrição FOXO1 (+/+ = $1,00 \pm 0,07076$; kl/+ = $1,40 \pm 0,1166$; kl/kl = $1,90 \pm 0,1132$; n = 5-6) e FOXO3a (+/+ = $1,00 \pm 0,02778$;

$kl/+ = 1,14 \pm 0,08562$; $kl/kl = 1,43 \pm 0,1325$; $n = 5-6$) (Figura 7C e D) encontrados nos extratos proteicos desses animais.

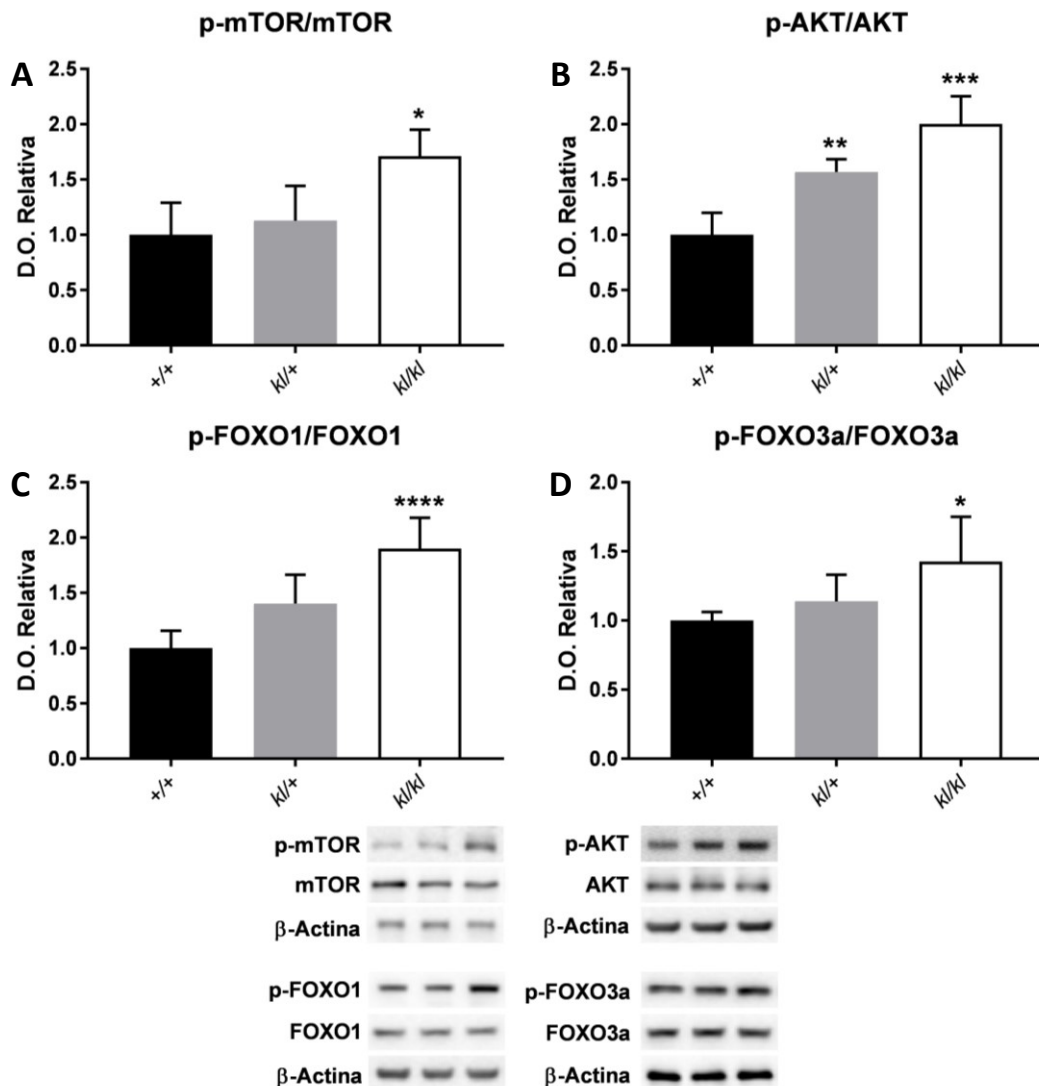


Figura 7 - Padrão de expressão de proteínas hipocampais de animais mutantes para a proteína Klotho difere em vias relacionadas à percepção do estado nutricional celular. Proteínas de hipocampo de animais mutantes para a proteína Klotho foram avaliadas quanto aos seus níveis de fosforilação das proteínas mTOR (A), AKT (B), FOXO1 (C) e FOXO3a (D), além dos níveis de expressão da PFKFB3, por *western blotting*. Animais hipomórficos para a proteína Klotho apresentam maior ativação do eixo AKT/mTOR, inativação dos fatores de transcrição da família FOXO e níveis mais elevados da proteína PFKFB3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo +/+. Dados representados como média \pm SEM de 4-6 animais.

Em cultura primária de neurônios corticais, a insulina comportou-se de forma estereotipada frente à fosforilação das proteínas AKT e mTOR, que apresentaram níveis elevados de fosforilação após 24 horas de tratamento (Figura 8). Já o tratamento com a proteína Klotho provocou efeito inverso, mostrando que esses hormônios evocam respostas antagônicas também em neurônios (p-AKT/AKT: controle = $1,00 \pm 0,05487$; insulina = $1,346 \pm$

0,046; Klotho = $0,6568 \pm 0,08439$; p-mTOR/mTOR: controle = $1,00 \pm 0,03109$; insulina = $1,308 \pm 0,7588$; Klotho = $0,7588 \pm 0,0756$; n = 4).

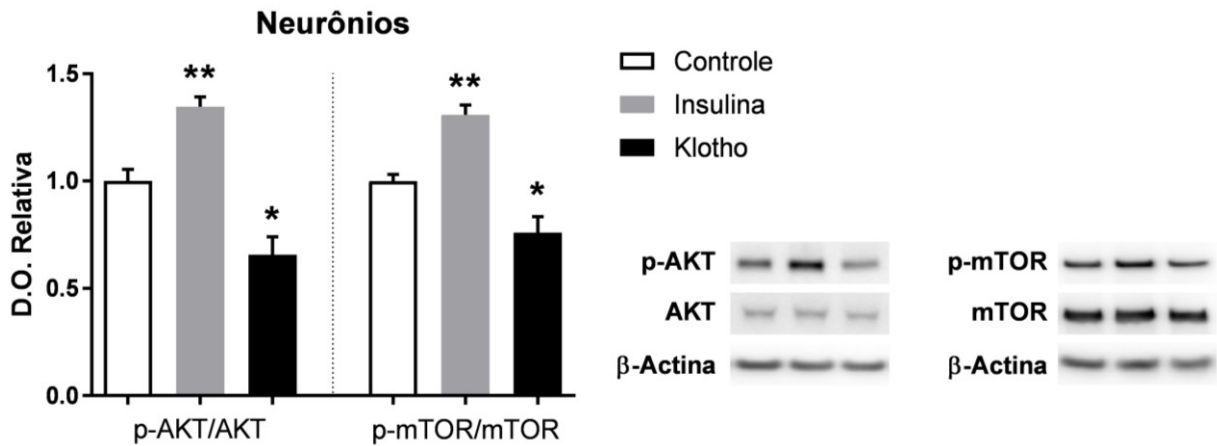


Figura 8 - Resposta do eixo AKT/mTOR de neurônios em cultura ao tratamento com Klotho recombinante é contrária à resposta provocada por insulina. Neurônios corticais em cultura foram estimulados com insulina 100 nM ou Klotho 1nM e o estado de fosforilação das proteínas AKT e mTOR avaliado 24 horas depois por *western blotting*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. Dados representados como média \pm SEM de 4 culturas independentes.

3.2 A Expressão de Klotho em Neurônios é Modulada pela Sinalização Glutamatérgica e de Insulina

A caracterização da expressão da Klotho no cérebro mostrou expressão exclusiva da proteína em neurônios, células endoteliais e oligodendrócitos (KURO-O et al., 1997; CLINTON et al., 2013). Para um melhor entendimento dos mecanismos celulares provocados pela Klotho foi feita avaliação de sua expressão em cultura primária de neurônios hipocámpais em diferentes tempos de cultivo *in vitro* (DIV), por ELISA (Figura 9A). Os resultados mostram que o conteúdo celular de Klotho estava significativamente aumentado com a maturação dos neurônios, mantendo-se estável após DIV 10 (Figura 9A) (DIV5 = $3,10 \pm 0,18$; DIV10 = $4,83 \pm 0,41$; DIV15 = $5,82 \pm 0,30$ pg/ μ g proteína).

A maturação de neurônios *in vitro* está relacionada com o aumento de conectividade das células e atividade elétrica (CHIAPPALONE et al., 2006; ICHIKAWA et al., 1993), portanto foi testado o impacto da atividade dos receptores de glutamato sobre a expressão da Klotho (Figura 9A). Neurônios no DIV 14 foram tratados por 24 horas em meio completo com veículo, concentrações sub-tóxicas de glutamato (10 ou 20 μ M), ou uma mistura de antagonistas dos receptores de NMDA (APV) e AMPA (NBQX) (20 μ M). Quando comparadas às células tratadas

com veículo, a concentração de Klotho estava significativamente aumentada em neurônios cuja atividade dos receptores de glutamato foi estimulada, e diminuída em neurônios cuja atividade dos mesmos receptores foi inibida (Figura 9B) (Veículo = $5,58 \pm 0,15$; Glutamato 20 μM = $8,48 \pm 0,24$; NBQX+APV = $3,83 \pm 0,16$ pg/ μg proteína).

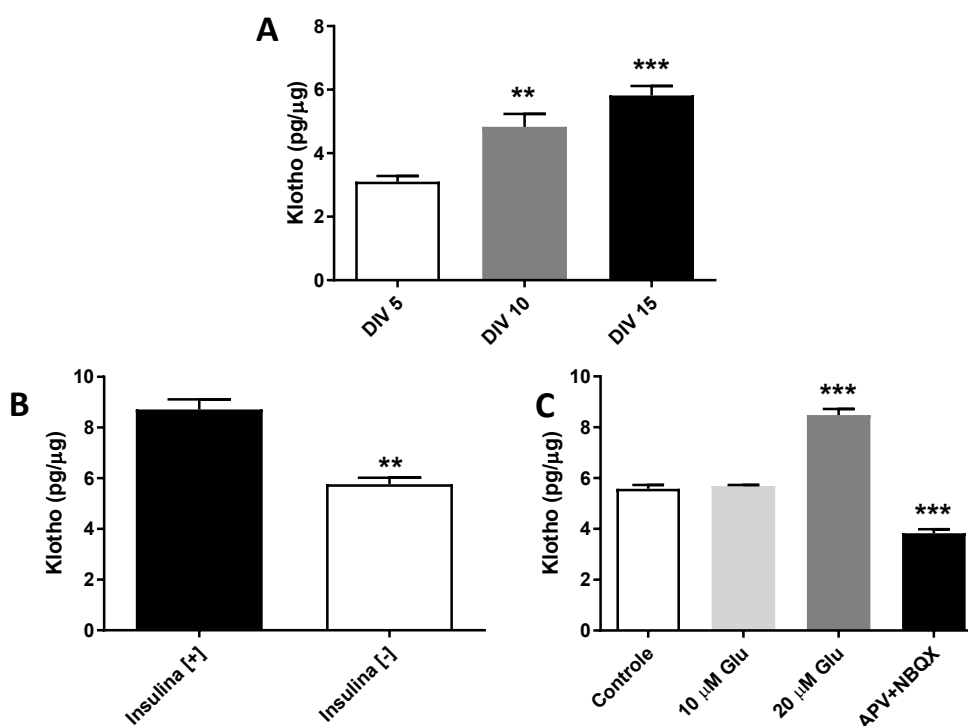


Figura 9 - A expressão da proteína Klotho em culturas primárias de neurônios hipocâmpais é modificada pelo grau de maturação, e por estimulação glutamatérgica e de insulina. (A) Níveis de proteína Klotho foram avaliados por ELISA em culturas primárias de neurônios hipocâmpais nos diferentes dias de cultivo (DIV) indicados. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ comparado ao grupo DIV 5 (ANOVA de uma via). (B) O envolvimento da sinalização glutamatérgica na expressão da proteína Klotho foi determinado tratando as culturas neuronais por 24 horas com veículo (Controle) (PBS), 10 ou 20 μM de glutamato (Glu), ou antagonistas de receptores AMPA (NBQX 20 μM) e NMDA (APV 20 μM). $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ comparado ao grupo Controle (ANOVA de uma via). (C) A influência da insulina sobre a Klotho foi avaliada incubando neurônios hipocâmpais em meio de cultura suplementado com B27 normal contendo insulina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Insulina [+]) ou com B27 sem insulina (Insulina [-]). $**p < 0,01$ comparado ao grupo Insulina [+]. (Teste T de Student pareado). Dados representados como média \pm SEM de 4-5 culturas independentes

Em rim, já foi previamente mostrado que a insulina consegue aumentar a secreção de Klotho (CHEN et al., 2007). Para avaliar se a insulina apresenta o mesmo efeito em neurônios incubamos neurônios hipocâmpais no DIV 14 por 24 horas em meio suplementado com B27 normal ou livre de insulina. Os resultados mostram que os neurônios mantidos em meio com insulina apresentaram níveis de Klotho maiores do que aqueles cujo meio foi trocado por meio sem insulina (Figura 9C) (Insulina [+] = $8,72 \pm 0,39$; insulina [-] = $5,77 \pm 0,26$ pg/ μg proteína), o

que sugere um importante papel da insulina em manter ou estimular a expressão proteica da Klotho.

3.3 A Klotho Solúvel Provoca Mudanças Metabólicas em Astrócitos

Embora o impacto da Klotho solúvel na fisiologia de oligodendrócitos tenha sido recentemente descrito (CHEN et al., 2013), ainda não é claro se a Klotho secretada desempenha qualquer papel sobre a função astrocitária ou neuronal. Analisamos, portanto, o perfil de expressão de neurônios corticais de camundongo cultivados por 2 semanas e astrócitos de camundongo em cultura, ambos tratados com 1 nM de Klotho recombinante por 24 horas. Foi observada uma resposta maior ao tratamento com Klotho em astrócitos do que em neurônios. Comparados com as células tratadas com veículo, 96 genes foram significativamente modificados pelo tratamento com a Klotho solúvel em astrócitos (Tabela 4) enquanto apenas 17 genes foram modificados em neurônios (Tabela 5). Para uma determinação mais sistemática das vias de sinalização e metabólicas evocadas pela Klotho solúvel em astrócitos e neurônios, foi usada a análise *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), focando na classificação pelo banco de dados KEGG. Foram observadas 43 vias aumentadas em astrócitos (Tabela 6), mas somente 19 em neurônios (Tabela 7). Consistente com o papel predominante de astrócitos no metabolismo energético e síntese de aminoácidos, as vias mais reguladas positivamente foram as relacionadas com o metabolismo de carboidratos, glicanos, lipídeos e aminoácidos (Tabela 6). Por outro lado, o maior efeito inibitório do tratamento com Klotho foi relacionado com vias relacionadas à resposta imune (Tabela 6), dando suporte a trabalhos prévios que mostram um papel anti-inflamatório da Klotho (LIU et al., 2011; MAEKAWA et al., 2009). Em neurônios, o tratamento com a Klotho diminuiu vias relacionadas com o metabolismo de lipídeos e aumentou vias relacionadas à degradação proteossomal (Tabela 7).

Para a validação dos resultados obtidos na análise do gene array, escolhemos diversos genes entre os que foram regulados tanto positiva quanto negativamente, e incluímos um gene não modificado como controle interno. A análise foi feita no RNA usado para a hibridização no array, além de RNAs de experimentos adicionais independentes. Todos os genes selecionados para o PCR em tempo real mostraram o mesmo padrão de expressão obtido com a análise do gene array (Figura 10). Entre os genes mais regulados positivamente estava o receptor para quimiocina CXC tipo 4 (*cxcr4*), que, além de mediar migração celular

durante o desenvolvimento encefálico (ZOU et al., 1998), mostrou estar envolvido na modulação sináptica aumentando a liberação de neurotransmissores por astrócitos (CALÌ et al., 2008), e também na conversão para glicólise aeróbica durante a transformação maligna (BRAUN et al., 2016). Dado ao envolvimento da Klotho sobre a regulação da homeostase periférica de potássio (CHA et al., 2009), foi notável que diversos membros da subfamília J de canais de potássio retificadores de influxo (*kcnj13*, *kcnj10*, *kcnj16*) bem como o canal de potássio membro 1 da subfamília K (*kcnk1*), foram regulados positivamente em astrócitos em resposta ao tratamento com Klotho (Tabela 4 e Figura 10). A remoção do potássio extracelular através dos canais de potássio retificadores de influxo é fundamental para a rápida repolarização dos neurônios após o potencial de ação (WALZ, 2000). De forma notável, semelhante ao que foi observado em camundongos Klotho hipomórficos (CHEN et al., 2013), camundongos *knockout* *kcnj10/Kir4.1* apresentam maturação de oligodendrócitos diminuída com hipomielinização severa (NEUSCH et al., 2001), sugerindo um possível elo de mecanismo.

O tratamento com a Klotho também regulou positivamente de forma significativa o transportador de ácidos monocarboxílicos 4 (MCT4), *slc16a4*, e, de forma menos significativa, o MCT1 (*slc16a1*) (Figura 10). Tanto o MCT1 quanto o MCT4 estão envolvidos no efluxo de lactato de astrócitos e são indispensáveis para a formação de potenciação de longa duração *in vivo* (SUZUKI et al., 2011). Também relacionado a mudanças metabólicas é o aumento da 3-hidroxiacil-CoA-desidratase (*hacd3*), que parece formar um complexo com a subunidade catalítica alfa 2 da proteína quinase ativada por AMP (AMPK2) para regular a auto fosforilação do receptor de insulina e sua internalização (BOUTCHUENG-DJIDJOU et al., 2015).

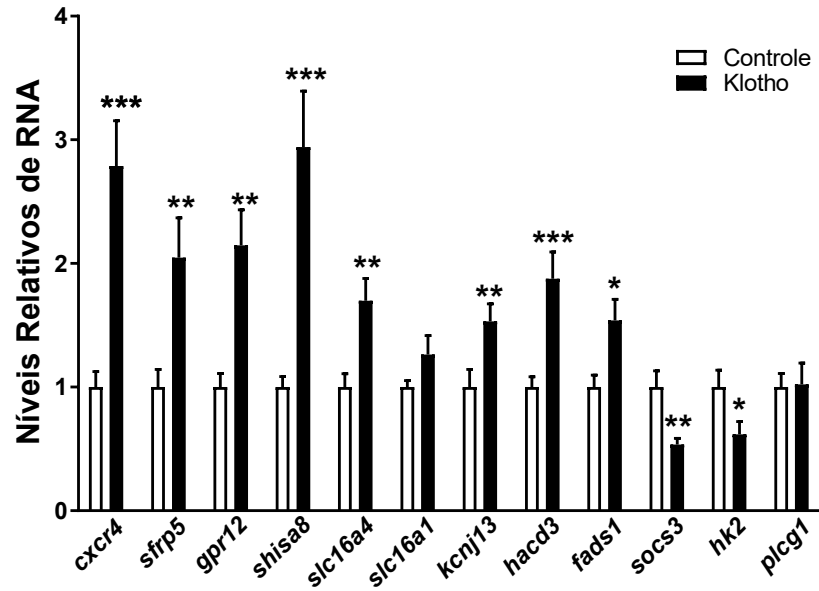


Figura 10 - Análise de PCR em tempo real de um subgrupo dos genes indicados pelo array que foram modificados pelo tratamento por Klotho em astrócitos. Nós verificamos as diferenças indicadas no *gene array* realizando PCR em tempo real nos genes selecionados indicados entre aqueles que foram modificados pelo tratamento de Klotho solúvel em astrócitos. As mudanças relativas nos transcritos de RNA foram idênticas às aquelas achadas pela análise por *array*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle (teste T de Student pareado). Dados representados como média \pm SEM de 7 culturas independentes.

Tabela 4 - Lista de genes modificados pelo tratamento com Klotho recombinante em astrócitos

Nome do Gene	Símbolo	z-ratio
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	2.79
secreted frizzled-related sequence protein 5	Sfrp5	2.57
G-protein coupled receptor 12	Gpr12	2.56
shisa family member 8	Shisa8	2.56
neuraminidase 2	Neu2	2.35
progesterone and adipoQ receptor family member VII	Paqr7	2.29
cyclin O	Ccno	2.21
endothelin receptor type A	Ednra	2.19
CD151 antigen	Cd151	2.18
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	Kcnj13	2.14
membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	Mboat2	2.12
adiponectin receptor 2	Adipor2	2.08
progesterone and adipoQ receptor family member IV	Paqr4	2.05
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10	Kcnj10	2.04
endothelin receptor type B	Ednrb	2.01
Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 4	Nkain4	2.01
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1	P2ry1	2
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4	Slc16a4	1.94
solute carrier family 46, member 1	Slc46a1	1.91
stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	Scd2	1.9
solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5	Slc13a5	1.79
growth differentiation factor 1	Gdf1	1.78
ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 2	St8sia2	1.74
tetraspanin 3	Tspan3	1.74
mitochondrial amidoxime reducing component 2	marc2	1.72
D site albumin promoter binding protein	Dbp	1.72
immunoglobulin superfamily, member 11	Igsf11	1.7
squalene epoxidase	Sqle	1.69
3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	Hacd3	1.69
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	Kcnj16	1.67
family with sequence similarity 92, member B	Fam92b	1.65
monocyte to macrophage differentiation-associated 2	Mmd2	1.65
leucine zipper protein 2	Luzp2	1.63
fatty acid desaturase 1	Fads1	1.63
collagen and calcium binding EGF domains 1	Ccbe1	1.61
transmembrane protein 109	Tmem109	1.6
tetraspanin 14	Tspan14	1.6
multiple EGF-like-domains 9	Megf9	1.58
frizzled homolog 2 (Drosophila)	Fzd2	1.56
thioredoxin-related transmembrane protein 2	Tmx2	1.56
tweety homolog 1 (Drosophila)	Ttyh1	1.56
ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	Elovl5	1.55
solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11	Slc39a11	1.55
potassium channel, subfamily K, member 1	Kcnk1	1.52
integral membrane protein 2C	Itm2c	1.52
anterior pharynx defective 1b homolog (C. elegans)	Aph1b	1.52
camello-like 1	Cml1	1.52
plasmalemma vesicle associated protein	Pivap	1.51
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q	Pigq	1.5
coiled-coil domain containing 88B	Ccdc88b	-1.51
polo-like kinase 3	Plk3	-1.53
BCL2-like 15	Bcl2l15	-1.54
LIM domain only 2	Lmo2	-1.56
methyl-CpG binding domain protein 1	Mbd1	-1.57

Tabela 4 - Cont.

Nome do Gene	Símbolo	z-ratio
interferon induced transmembrane protein 1	Ifitm1	-1.58
GRB2-related adaptor protein	Grap	-1.63
mucin 13, epithelial transmembrane	Muc13	-1.65
exocyst complex component 3-like 4	Exoc3l4	-1.66
bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	Baz1a	-1.67
interferon regulatory factor 5	Irf5	-1.74
spleen tyrosine kinase	Syk	-1.76
B9 protein domain 1, opposite strand	B9d1os	-1.78
RNA binding motif protein 47	Rbm47	-1.79
SAM pointed domain containing ets transcription factor	Spdef	-1.84
polo-like kinase 2	Plk2	-1.85
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	Slco4a1	-1.86
diacylglycerol kinase, eta	Dgkh	-1.87
gasdermin D	Gsdmd	-1.87
hepsin	Hpn	-1.87
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	-1.88
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	Abcb1b	-1.94
protein kinase C, delta	Prkcd	-2
calcium-binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (fibrousheathin 2)	Cabyr	-2.02
Eph receptor A2	Epha2	-2.03
Kruppel-like factor 4 (gut)	Klf4	-2.03
t-complex protein 10b	Tcp10b	-2.03
basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	Batf3	-2.04
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	Rapgef5	-2.12
laminin, alpha 4	Lama4	-2.18
plexin D1	Plxnd1	-2.31
tribbles homolog 1 (Drosophila)	Trib1	-2.33
strawberry notch homolog 2 (Drosophila)	Sbno2	-2.36
pregnancy-associated plasma protein A	Pappa	-2.38
transglutaminase 1, K polypeptide	Tgm1	-2.41
zinc finger, MYND-type containing 15	Zmynd15	-2.56
psoriasis susceptibility 1 candidate 2 (human)	Psors1c2	-2.62
ADP-ribosylation factor-like 5C	Arl5c	-2.7
sphingosine kinase 1	Sphk1	-2.95
runt related transcription factor 1	Runx1	-2.98
phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	Pde2a	-3.03
family with sequence similarity 65, member C	Fam65c	-3.04
tripartite motif-containing 69	Trim69	-3.17
activity regulated cytoskeletal-associated protein	Arc	-3.4
phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101	Pik3r5	-3.59
B cell translocation gene 1, anti-proliferative	Btg1	-4.09
cell migration inducing protein, hyaluronan binding	Cemip	-4.35

Tabela 5 - Lista de genes modificados pelo tratamento pela Klotho recombinante em neurônios

Nome do Gene	Símbolo	z-ratio
interleukin-1 receptor-associated kinase 2	Irak2	1.61
latent transforming growth factor beta binding protein 1	Ltbp1	-1.51
aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	Aldh3b1	-1.53
ceruloplasmin	Cp	-1.58
establishment of cohesion 1 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Esco2	-1.59
collagen, type V, alpha 2	Col5a2	-1.61
apolipoprotein A-II	Apoa2	-1.64
butyrylcholinesterase	Bche	-1.71
apolipoprotein C-I	Apoc1	-2.29
complement component 3	C3	-2.65
transferrin	Trf	-2.67
hemopexin	Hpx	-3.7
major urinary protein 19	Mup19	-9.66
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1E	Serpina1e	-11.11
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1C	Serpina1c	-11.81
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A	Serpina1a	-12.38
albumin	Alb	-14.43

Tabela 6 - Processos e vias celulares mais modificados pelo tratamento com Klotho recombinante em cultura primária de astrócitos.

Seção KEGG		Via KEGG	z-score
Metabolismo	Biosíntese e metabolismo de glicanos	N glycan biosynthesis	3.88
	Biosíntese e metabolismo de glicanos	Glycosylphosphatidylinositol GPI anchor biosynthesis	3.33
	Biosíntese e metabolismo de glicanos	Glycosphingolipid biosynthesis ganglio series	2.07
	Biosíntese e metabolismo de glicanos	Glycosaminoglycan degradation	2.06
	Biosíntese e metabolismo de glicanos	Other glycan degradation	1.86
	Metabolismo energético	Oxidative phosphorylation	3.61
	Metabolismo de carboidratos	Pyruvate metabolism	2.33
	Metabolismo de carboidratos	Propanoate metabolism	2.16
	Metabolismo de carboidratos	Butanoate metabolism	2.16
	Metabolismo de carboidratos	Citrate cycle TCA cycle	2.07
Processos celulares	Lisossomo	Lysosome	3.44
	Peroxisomo	Peroxisome	2.3
Processamento de informação genética	Tradução	Ribosome	2.84
	Dobramento, seleção e degradação	Protein export	1.93
Processamento de informação ambiental	Moléculas sinalizadoras e interação	Cytokine cytokine receptor interaction	-14.74
	Moléculas sinalizadoras e interação	ECM receptor interaction	-4.17
	Transdução de sinal	JAK STAT signaling pathway	-10.89
	Transdução de sinal	MAPK signaling pathway	-4.6
	Transdução de sinal	ERBB signaling pathway	-3.49
	Transdução de sinal	VEGF signaling pathway	-3.11
	Transdução de sinal	Phosphatidylinositol signaling system	-1.71
Processos celulares	Crescimento e morte celular	Apoptosis	-5.6
	Comunidade celular - eucariotos	Focal adhesion	-4.55
	Mobilidade celular	Regulation of actin cytoskeleton	-2.77
Sistemas de organismos	Sistema nervoso	Neurotrophin signaling pathway	-3.39
	Sistema imune	Toll like receptor signaling pathway	-10.19
	Sistema imune	Cytosolic DNA sensing pathway	-8.63
	Sistema imune	Chemokine signaling pathway	-7.77
	Sistema imune	Hematopoietic cell lineage	-7.28
	Sistema imune	Rig I like receptor signaling pathway	-7.07
	Sistema imune	Intestinal immune network for IGA production	-6.21
	Sistema imune	B cell receptor signaling pathway	-5.35
	Sistema imune	Natural killer cell mediated cytotoxicity	-5.21
	Sistema imune	T cell receptor signaling pathway	-5.15
	Sistema imune	Complement and coagulation cascades	-4.68
	Sistema imune	Fc epsilon r1 signaling pathway	-3.75
	Sistema imune	Fc gamma r mediated phagocytosis	-3.35
	Sistema imune	Leukocyte transendothelial migration	-2.44

Tabela 7 - Processos e vias celulares mais modificados pelo tratamento com Klotho recombinante em cultura primária de neurônios corticais.

Seção KEGG		Via KEGG	<i>z-score</i>
Processamento de informação genética	Tradução	Ribosome	6,34
	Transcrição	Spliceosome	2,60
	Dobramento, seleção e degradação	Proteasome	2,42
	Dobramento, seleção e degradação	Ubiquitin mediated proteolysis	1,60
Metabolismo	Metabolismo energético	Oxidative phosphorylation	3,78
Processos celulares	Transporte e catabolismo	Endocytosis	2,39
Sistemas de organismos	Sistema nervoso	Neurotrophin signaling pathway	2,33
	Sistema nervoso	Long term potentiation	1,55
Processamento de informação ambiental	Moléculas sinalizadoras e interação	ECM receptor interaction	-3,84
	Moléculas sinalizadoras e interação	Neuroactive ligand receptor interaction	-3,83
	Transdução de sinal	Hedgehog signaling pathway	-2,48
	Transdução de sinal	Calcium signaling pathway	-1,79
	Transdução de sinal	TGF beta signaling pathway	-1,54
	Transporte de membrana	ABC transporters	-1,56
Metabolismo	Metabolismo de lipídeos	Linoleic acid metabolism	-2,84
	Metabolismo de lipídeos	Arachidonic acid metabolism	-2,53
	Metabolismo de lipídeos	Alphalinoleic acid metabolism	-2,48
	Metabolismo de lipídeos	Ether lipid metabolism	-2,34
	Metabolismo de cofatores e vitaminas	Pantothenate and CoA biosynthesis	-2,07

3.4 O Tratamento Agudo com Klotho Aumenta a Glicólise Aeróbica de Astrócitos e a Liberação de Lactato

A importância dos astrócitos no metabolismo do encéfalo e os impressionantes efeitos da Klotho sobre seus transcriptomas nos levou a investigar como a Klotho poderia impactar a respiração celular de astrócitos. As taxas de consumo de oxigênio e de acidificação extracelular foram medidas usando um analisador de fluxo Seahorse XF-96. Tratamento agudo (1 hora) com a Klotho solúvel foi o suficiente para causar um aumento significativo na taxa de acidificação extracelular em condições basais (Figura 11A) (Controle = $0,97 \pm 0,05$; Klotho = $1,97 \pm 0,04$), e uma diminuição na capacidade respiratória máxima (Figura 11B) (Controle = $1,84 \pm 0,08$; Klotho = $0,77 \pm 0,02$). Quando os mesmos experimentos foram realizados na ausência de piruvato, uma diminuição significativa na capacidade respiratória máxima foi observada nas células do grupo controle, mas não nas células tratados com Klotho (Figura 11B) (Controle sem piruvato = $1,38 \pm 0,04$; Klotho sem piruvato = $0,67 \pm 0,03$). A taxa de acidificação extracelular induzida pela Klotho persistiu na ausência de piruvato (Figura 11C e D). Em neurônios, de forma consistente com o observado no transcriptoma, nós não conseguimos observar qualquer efeito da Klotho sobre a respiração celular (Figura 11E).

A hipótese da lançadeira de lactato astrócitos-neurônio sugere que os neurônios captam o lactato liberado por astrócitos para ser utilizado como substrato energético (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Esse mecanismo seria particularmente importante durante eventos de alta demanda energética, como no disparo de potenciais de ação (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Para aprofundar nossas observações, avaliamos a capacidade da Klotho de modificar a produção de lactato. Astrócitos foram então transfectados com um plasmídeo codificante para o sensor *Laconic* (SAN MARTÍN et al., 2013), um sensor genômico sensível a lactato baseado em FRET, e tratados com o inibidor de transportadores de ácidos monocarboxílicos AR-C155858 para impedir o efluxo de lactato. O aumento do lactato intracelular foi monitorado sob adição aguda de veículo ou Klotho. Como o sugerido pelo aumento da taxa de acidificação extracelular, as taxas de produção de lactato estavam significativamente aumentadas quando da adição de Klotho recombinante (Figura 12A).

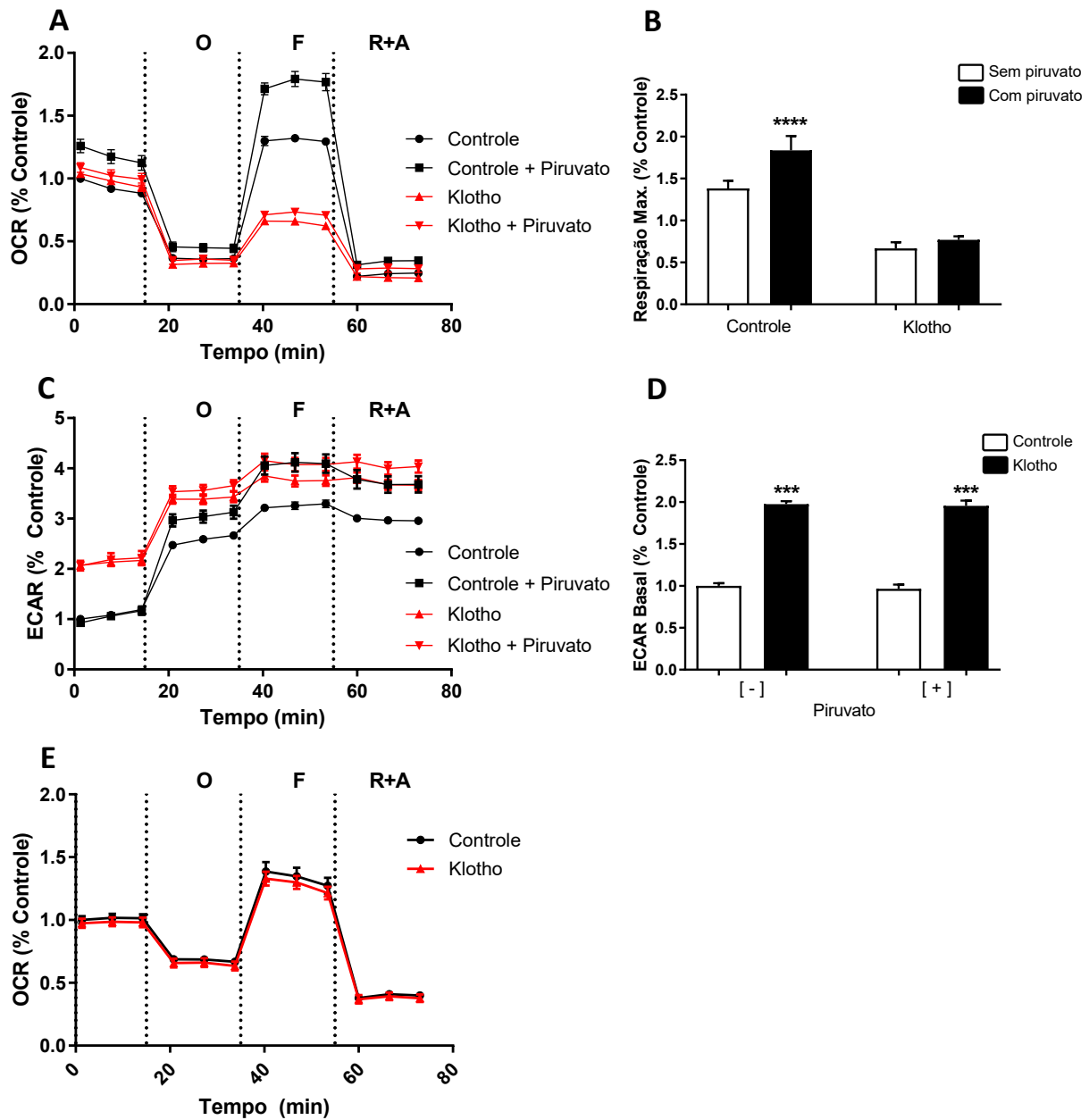


Figura 11 - Klotho aumenta a glicólise aeróbica em astrócitos. (A) A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi medida em astrócitos tratados com veículo (Controle) ou 1 nM de Klotho por 1 hora na presença ou ausência de piruvato. O tratamento com Klotho causou um decréscimo significativo na taxa de respiração máxima independente da presença de piruvato (B). A taxa de acidificação extracelular (ECAR), uma medida de taxa de glicólise e liberação de lactato, foi significativamente aumentada pelo tratamento com Klotho independente da presença de piruvato no meio (C, D), indicando uma mudança para a glicólise aeróbica. (E) O tratamento com Klotho não teve efeito algum sobre a respiração celular de neurônios hipocâmpais em cultura. O: oligomicina; F: FCCP (carbonil-cianeto 4-(trifluorometóxi) fenilhidrazona; R+A: rotenona mais antimicina A. Dados representados como média \pm de 6 experimentos independentes. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle (sem piruvato) (ANOVA de duas vias).

Nós então investigamos se mudanças na captação de glicose eram necessárias para o aumento observado na produção de lactato usando o análogo fluorescente de glicose 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)Amino)-2-Deoxiglicose (2-NBDG). O tratamento com Klotho

não modificou a captação de 2-NBDG (Figura 12B), o que sugere que os efeitos da Klotho são independentes da disponibilidade de glicose. Medimos, então o lactato liberado em meio de cultura incubando os astrócitos na presença ou ausência de Klotho em meio com concentração normal ou baixa de glicose (alta glicose, 4,5 g/L; baixa 1 g/L).

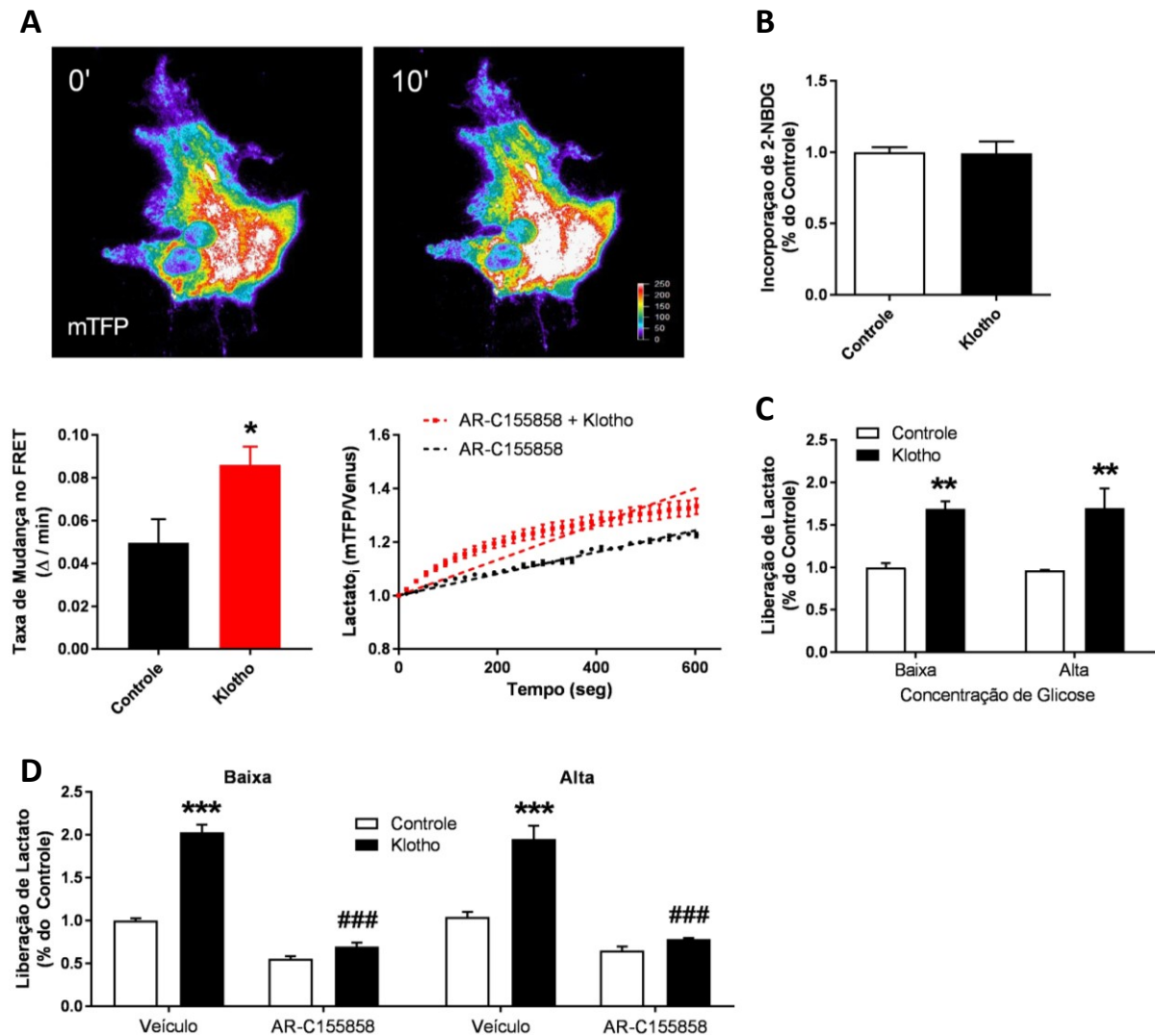


Figura 12 - Efeitos da Klotho sobre o destino metabólico da glicose em astrócitos. Astrócitos transfectados com o sensor de lactato *Laconic* foram incubados em fluido cefalorraquidiano artificial e o aumento do lactato intracelular foi monitorado após adição do inibidor de MCTs AR-C155858 mais veículo (Controle) (PBS) ou Klotho recombinante. (A) Imagens representativas da intensidade de fluorescência de mTFP na linha basal (0') e após 10 minutos (10') de gravação, bem como as mudanças relativas no FRET (Δ mTFP/Venus por minuto) e o acúmulo de lactato durante o período são mostrados. As linhas retas mostram as inclinações de acúmulo de lactato ajustadas por regressão linear durante a exposição. Dados são representados como média \pm SEM de 14-19 células transfectadas de 3 culturas separadas. (B) Astrócitos foram tratados com veículo (Controle) ou 1 nM de Klotho recombinante em meio de cultura deficiente de glicose contendo 50 μ M de 2-NBDG. A incorporação celular de 2-NBDG medida após 3 horas não mostrou qualquer diferença entre os dois tratamentos. (C) Tratamento de astrócitos com Klotho induziu liberação de lactato no meio de cultura, independente das concentrações extracelulares de glicose (baixa: 1 g/L; alta: 4,5 g/L). (D) Inibição dos MCTs com 1 μ M de AR-C155858 foi capaz de impedir completamente a liberação de lactato provocada pelo tratamento com Klotho em meio de cultura com alta ou baixa concentração de glicose. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle; ### $p < 0,001$ comparado ao grupo Klotho. Dados são representados como média \pm SEM de 3 culturas independentes.

O tratamento com a Klotho causou um aumento significativo da liberação de lactato independente da concentração de glicose no meio de cultura (Figura 12C) (Controle em alta glicose = $1,04 \pm 0,06$; Klotho = $1,95 \pm 0,15$; Controle em baixa glicose = $1,00 \pm 0,03$; Klotho = $2,03 \pm 0,09$). A inibição dos transportadores de ácidos monocarboxílicos pelo AR-C155858 aboliu completamente a liberação de lactato evocada pela Klotho (Figura 12D). De forma geral, os resultados indicam que a Klotho modula o metabolismo especificamente de astrócitos, aumentando a glicólise aeróbica e a liberação de lactato.

3.5 A Ativação de FGFR1 e ERK é Necessária para a Liberação de Lactato Induzida pela Klotho

Foi mostrado que a Klotho interage com diversos receptores de fator de crescimento de fibroblastos (FGFRs) em diferentes tipos celulares (KUROSU et al., 2006). A sinalização pelo FGFR1 tem sido envolvida com o aumento de glicólise aeróbica em células cancerígenas (HITOSUGI et al., 2011). Interessante notar que o efeito trófico que astrócitos exercem sobre os neurônios é diminuído em astrócitos com FGFR1 mutante tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SMITH et al., 2014). Nós analisamos o impacto da Klotho solúvel em duas vias de sinalização associadas ao FGFR1 conhecidas por modular a glicólise, a via da PI3K/AKT (DEBERARDINIS et al., 2008) e a via MEKK/MAPK/ERK 1/2 (LI et al., 2016). O tratamento dos astrócitos com Klotho solúvel resultou em uma diminuição dos níveis de fosforilação da AKT de forma tempo-dependente (Figura 13A), e em um aumento da fosforilação da ERK 1/2 (Figura 13B). Tratamento simultâneo com o inibidor de MEK 1 PD98059 preveniu de forma eficiente tanto a fosforilação da ERK induzida pela Klotho (Figura 14A), como a liberação de lactato no meio de cultura (Figura 14C) (Controle = $1,00 \pm 0,01$; Klotho = $2,01 \pm 0,08$; Klotho+PD98059 = $0,89 \pm 0,02$)

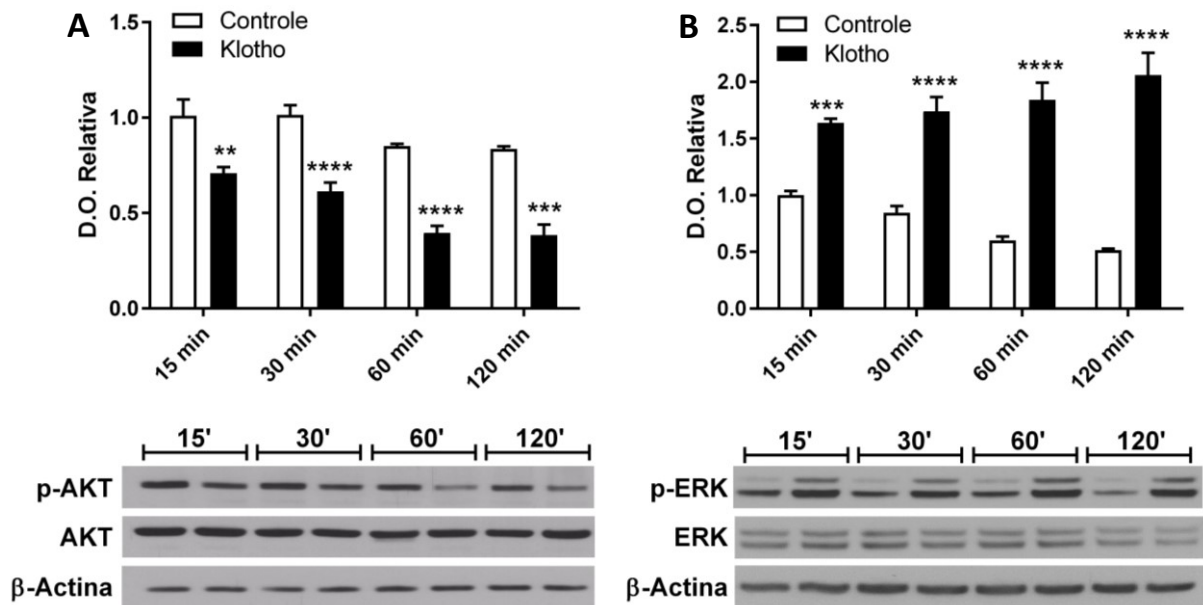


Figura 13 - Tratamento com a proteína Klotho altera níveis de fosforilação de AKT e ERK. Astrócitos foram tratados com veículo (Controle) ou Klotho recombinante 1 nM e avaliados em diferentes tempos de incubação quanto aos níveis de fosforilação de AKT (Ser473) (A) e ERK1 (Thr202/204) e ERK 2 (Thr185/Thr187) (B), medidos por *western blotting*. O tratamento é capaz de diminuir a fosforilação da proteína AKT em curtos períodos de incubação (A), apresentando o efeito oposto sobre a ERK (B). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle referente a cada ponto temporal. Dados são representados como média \pm SEM de 5-3 culturas independentes (ANOVA de duas vias).

O antagonismo do FGFR1 com PD166866 também foi capaz de diminuir significativamente a fosforilação da ERK 1/2 (Figura 14B) e a liberação de lactato (Figura 14D) (Controle = $1,00 \pm 0,05$; Klotho = $1,85 \pm 0,10$; Klotho+PD166866 = $1,23 \pm 0,07$) induzidas pela Klotho. Esses resultados sugerem que, em astrócitos, o agonismo do FGFR1 pela Klotho secretada resulta na ativação da via MEKK/MAPK/ERK 1/2, culminando em um aumento da glicólise aeróbica e liberação de lactato.

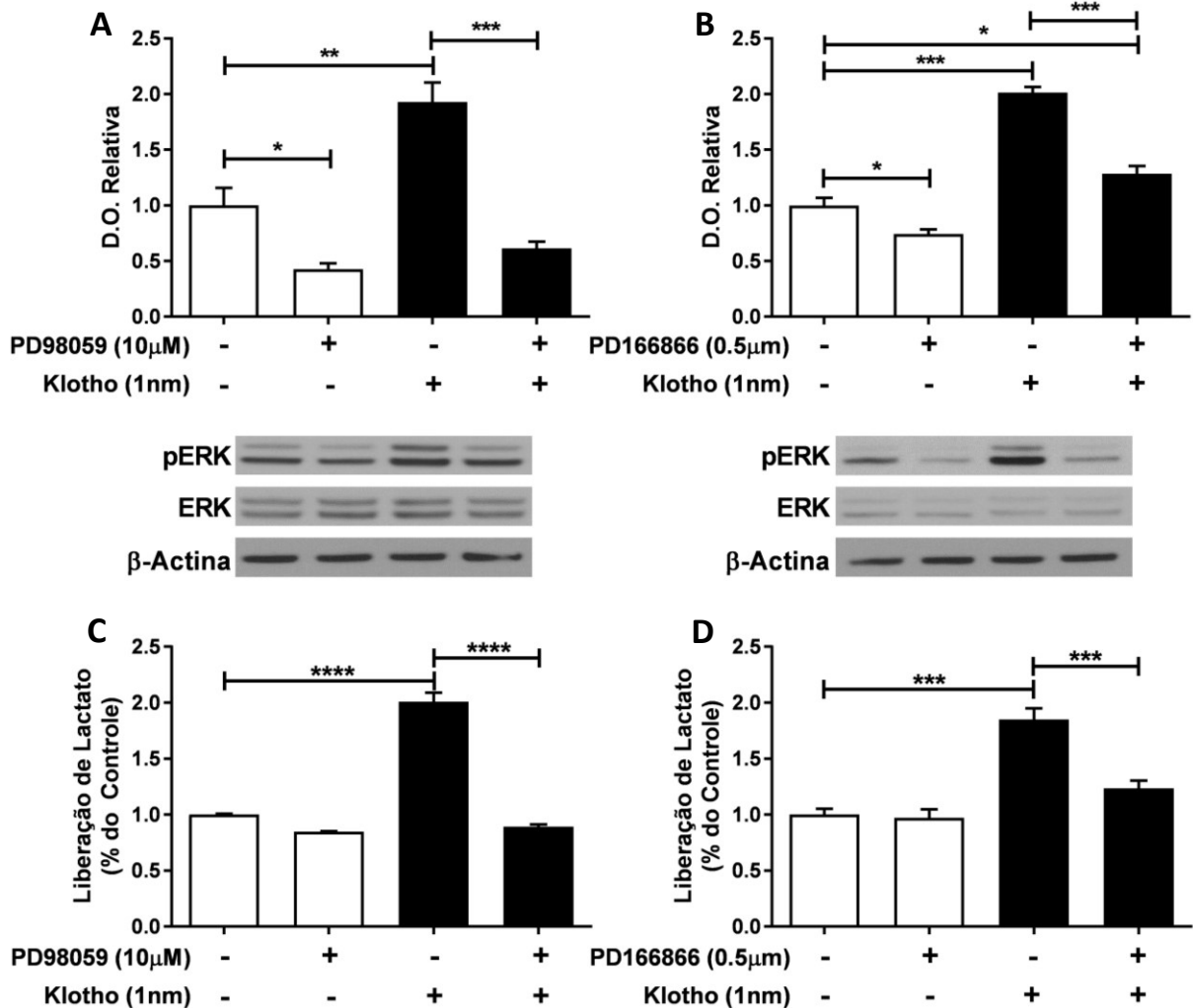


Figura 14 - Liberação de lactato induzida por Klotho é mediada pelas vias de sinalização de FGFR1 e ERK. Astrócitos foram tratados com veículo (Controle) ou Klotho 1 nM. A inibição da atividade da MEK1 com PD98059 10 μ M significativamente impediu a fosforilação de ERK induzida pela Klotho (A), e aboliu completamente a liberação de lactato (C). O antagonismo do FGFR1 com PD166866 0,5 μ M inibiu a fosforilação da ERK induzida pela Klotho (B) e impediu a liberação de lactato (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, diferenças entre grupos específicos indicados em cada gráfico. Dados representados como média \pm SEM de 3-5 culturas independentes (ANOVA de uma via).

3.6 Klotho Aumenta os Níveis de Fosforilação da LDHA, PKM2 e PDHK1 e Induz Atividade da LDH em Astrócitos

Um crescente número de evidências aponta para o papel do FGFR1 na criação do efeito Warburg em células neoplásicas. Fosforilação em resíduos de tirosina de enzimas como a piruvato desidrogenase quinase 1 (HITOSUGI et al., 2011), piruvato quinase M2 (HITOSUGI et al., 2009) e LDHA (FAN et al., 2011) pelo receptor FGFR1 parece ser um importante mecanismo para a indução da glicólise aeróbica em neoplasias. Tendo isso em vista, analisamos a

fosforilação em tirosina dessas três enzimas por imunoprecipitação com anticorpo contra fosfo-tirosina, seguida de análise por *western blotting*.

O tratamento de astrócitos com Klotho 1 nM por 24 horas foi capaz de aumentar os níveis de fosforilação em tirosina das três enzimas analisadas (Figura 15A, B e C), reforçando a ideia de que o FGFR1 desempenha um papel central nos efeitos metabólicos estudados até aqui desencadeados pela Klotho (PDHK1: controle = $1,00 \pm 0,04929$; Klotho = $1,53 \pm 0,1199$; PKM2: controle = $1,00 \pm 0,09917$; Klotho = $1,47 \pm 0,05459$; LDHA: controle = $1,00 \pm 0,02404$; Klotho = $1,20 \pm 0,04561$; n = 4)

Considerando que a fosforilação da LDHA em Tyr10 e Tyr83 promove aumento de atividade da enzima por, entre outros motivos, promover a formação do tetrâmero ativo (FAN et al., 2011), tentamos avaliar a atividade da enzima LDH em extrato proteico nativo de astrócitos tratados 24 horas com veículo (controle) (PBS) ou Klotho 1 nM, na presença ou ausência do antagonista de FGFR1 PD166866 (0,5 μ M). Quantidades representativas (2 μ g de proteína total) de cada grupo foram utilizadas para análise de atividade da LDH. Basicamente, o procedimento avalia a formação de formazan vermelho a partir da conversão de um sal de tetrazólio. Tal conversão se dá com o consumo de NADH, um dos produtos da atividade da LDH. A formação do produto colorido foi acompanhada durante 60 minutos por medição da absorbância, e a taxa de mudança na absorbância interpretada como um parâmetro proporcional à atividade da LDH (Figura 15D). Como é possível observar, o tratamento com Klotho é capaz de induzir a atividade da LDH em astrócitos, sendo esse efeito completamente abolido quando o receptor FGFR1 é antagonizado com PD166866. (Área sob a curva: controle = $1660 \pm 8,165$; PD 166866 = $1499 \pm 15,79$; Klotho = $1833 \pm 33,54$; Klotho + PD 166866 = $1714 \pm 18,84$; inclinações relativas: controle = $1,00 \pm 0,008667$; PD 166866 = $0,88 \pm 0,02985$; Klotho = $1,12 \pm 0,3909$; Klotho + PD 166866 = $1,04 \pm 0,02313$; taxa de mudança de absorbância relativa: controle = $0,60 \pm 0,008$; PD 166866 = $0,54 \pm 0,01$; Klotho = $0,68 \pm 0,02$; Klotho + PD = $0,62 \pm 0,02$; n = 4).

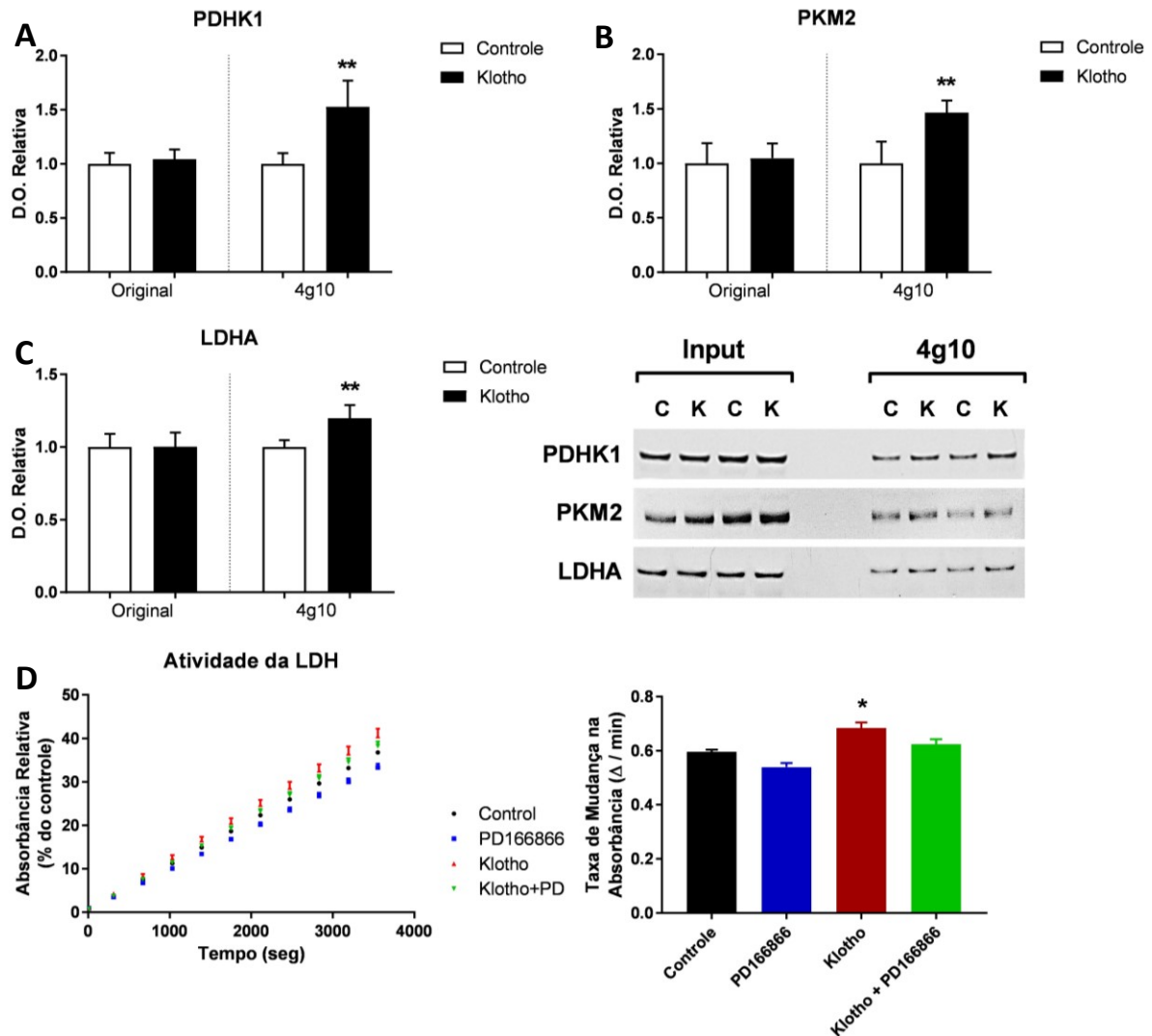


Figura 15 - Tratamento com Klotho induz fosforilação de enzimas relacionadas com metabolização de piruvato e aumento de atividade de LDH. Astrócitos foram tratados com veículo (Controle, C) (PBS) ou Klotho (K) 1 nM por 1 hora e suas proteínas extraídas em forma nativa. Após imunoprecipitação com anticorpo contra fosfo-tirosina (4g10), avaliação por *western blotting* foi feita para quantificação de PDHK1 (A), PKM2 (B) e LDHA (C). Tratamento com Klotho foi capaz de induzir a atividade da LDHA (D), avaliada pela taxa de mudança de absorbância em 340 nm. Antagonismo do FGFR1 com tratamento simultâneo com PD166866 0,5 μ M foi capaz de impedir completamente a indução de atividade da LDH promovida pela Klotho. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle imunoprecipitado com 4g10 (teste T de Student pareado); * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via). Dados são representados como média \pm SEM de 4 experimentos independentes.

3.7 A Ativação do Fator de Transcrição FOXO Promove Aumento de Defesas Antioxidantes em Astrócitos Tratados com Klotho

Os efeitos positivos da Klotho sobre a atividade dos fatores de transcrição FOXO já são bem estudados (CHÂTEAU et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2005). Regulando negativamente a via da PI3K/AKT, a Klotho é capaz de diminuir a atividade inibitória que a AKT exerce sobre tais fatores de transcrição, permitindo que os mesmos possam migrar para o núcleo e exercer sua atividade transcricional. Considerando que tratamento com Klotho foi capaz de diminuir

os níveis de fosforilação da AKT em astrócitos (Figura 13A), avaliamos o estado de fosforilação da FOXO3a após 24 horas de tratamento com Klotho 1 nM ou insulina 100 nM, como um indicativo de sua atividade (Figura 16A). Como podemos observar, a Klotho é capaz de impedir a fosforilação inibitória do fator de transcrição FOXO3a, enquanto a insulina exerce seu efeito inibitório esperado sobre tal proteína (controle = $1,00 \pm 0,07624$; insulina = $1,26 \pm 0,03678$; Klotho = $0,58 \pm 0,08931$; n = 4).

Para a avaliação mais direta de atividade transcricional, astrócitos foram previamente transfectados com plasmídeo contendo cópias de sequência responsiva à FOXO (pGL-3xDBE) como unidade promotora de um gene codificante para luciferase *Firefly*, além de plasmídeo contendo gene codificante para luciferase *Renilla* regulado por promotor constitutivo timidina quinase (pRL-TK) como controle interno da taxa de transfecção. Após transfecção, astrócitos foram mantidos por 24 horas em diferentes condições de cultivo (em meio com alta ou baixa concentração de glicose), na presença de veículo (controle) (PBS) ou Klotho 1 nM (Figura 16). A medida de luminescência relativa medida correlaciona-se com a taxa de transcrição do gene da luciferase e, portanto, à atividade do fator de transcrição FOXO. A diminuição na concentração de glicose parece ser suficiente para a indução da atividade da FOXO, porém em ambas as condições (glicose em alta ou baixa concentração) a Klotho é capaz de induzir atividade do fator de transcrição (controle em alta glicose = $1,00 \pm 0,09658$; controle em baixa glicose = $12,35 \pm 0,8978$; klotho em alta glicose = $26,26 \pm 1,316$; Klotho em baixa glicose = $25,06 \pm 2,942$; n = 5) (Figura 16B).

A ação da FOXO sobre genes relacionados à defesa antioxidante, como a MnSOD (SOD2) e a catalase, já é muito bem descrita (BURGERING, 2003). Verificamos, portanto, os níveis de catalase em astrócitos expostos após 24 horas de tratamento com Klotho recombinante em diferentes concentrações (Figura 16C). A Klotho foi capaz de induzir a expressão de catalase em todas as concentrações testadas, de uma maneira dose-independente (controle = $1,00 \pm 0,02975$; 0,2 nM = $1,80 \pm 0,1034$; 0,5 nM = $1,88 \pm 0,103$; 1,0 nM = $1,84 \pm 0,07988$; 5,0 nM = $1,87 \pm 0,1039$; n = 4).

Como maneira de averiguar um possível papel protetor contra danos oxidativos, verificamos a viabilidade de astrócitos expostos por 30 minutos a insulto com H₂O₂ 500 µM pré-tratados por 24 horas com veículo (controle) (PBS) ou Klotho recombinante em diferentes concentrações (Figura 16D). Em todas as concentrações de Klotho utilizadas, o tratamento foi capaz de prevenir a morte causada pelo insulto (controle = $1,00 \pm 0,04143$; Klotho 5 nM =

0,9354 ± 0,1413; H₂O₂ 500 μM = 0,4999 ± 0,04248; H₂O₂ + klotho 0,2 nM = 0,7802 ± 0,04736; H₂O₂ + Klotho 0,5 nM = 0,7189 ± 0,04975; H₂O₂ + Klotho 1,0 nM = 0,8071 ± 0,03735; H₂O₂ + Klotho 5,0 nM = 0,7732 ± 0,03756; n = 4-6) (Figura 16D).

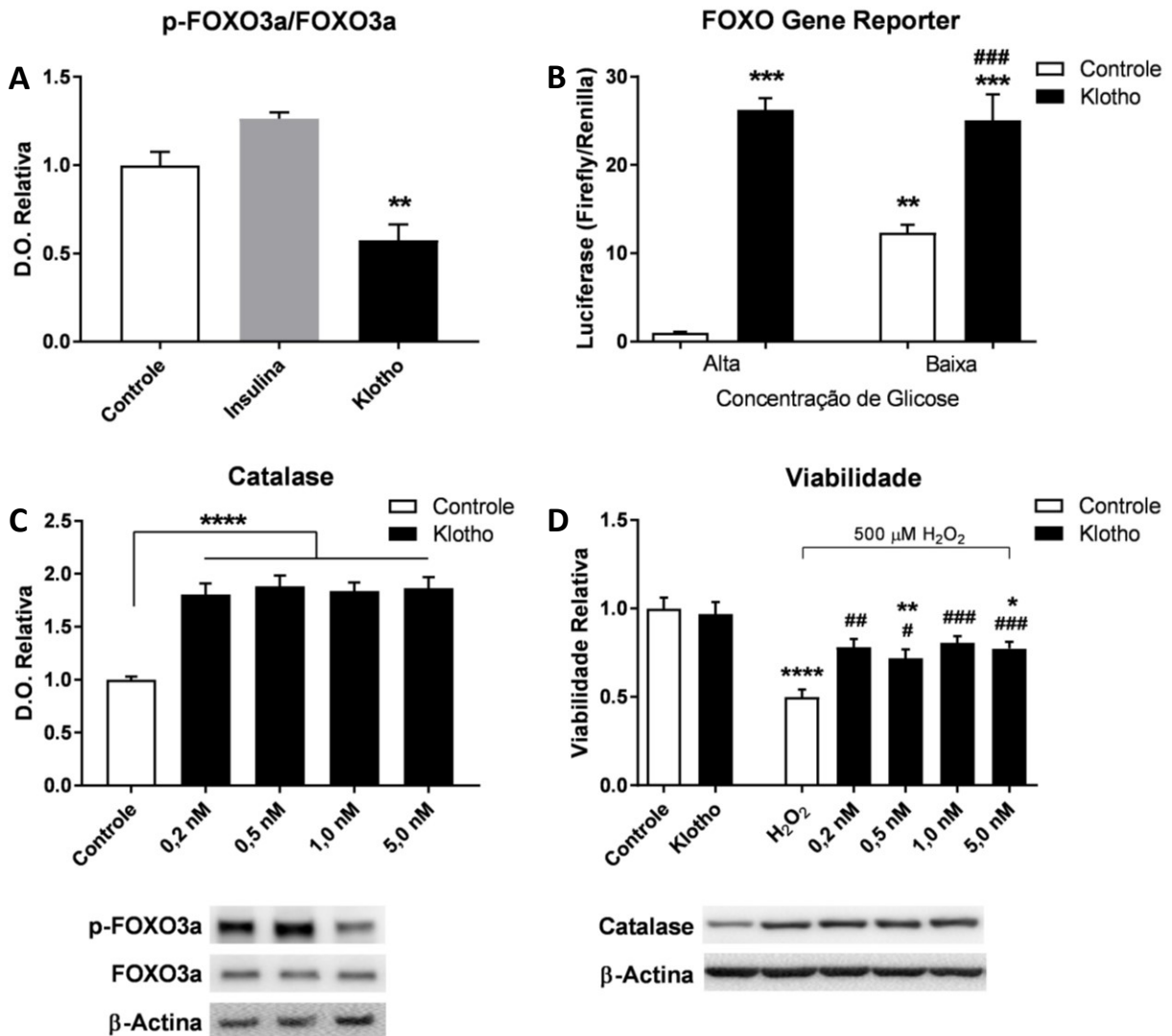
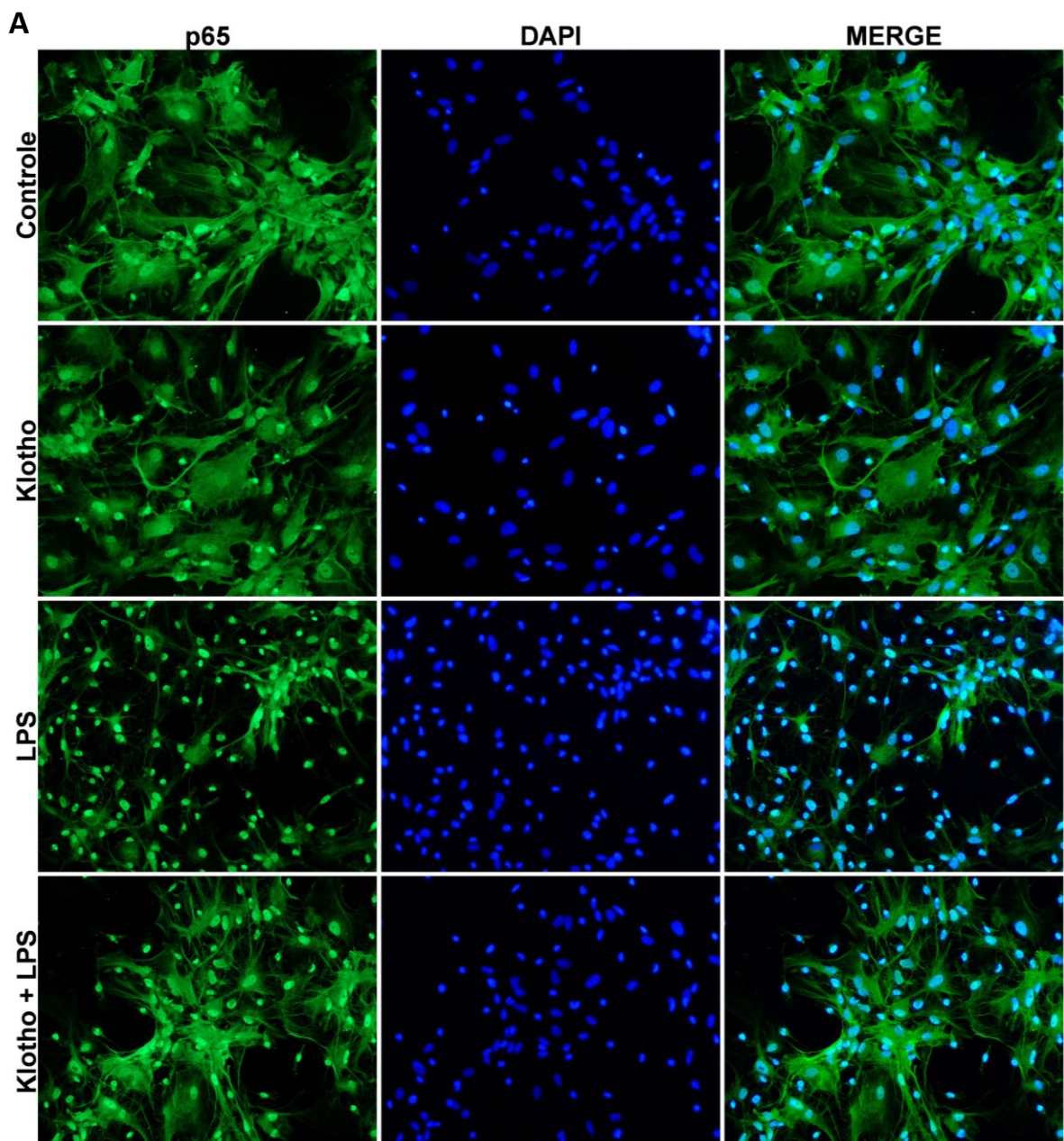


Figura 16 - Klotho promove atividade de fator de transcrição FOXO em astrócitos e confere proteção contra dano oxidativo. (A) Astrócitos em cultura foram tratados com Klotho 1 nM por 24 horas e níveis totais de fosforilação do fator de transcrição FOXO3a aferidos por *western blotting*, como indicativo de sua atividade. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via). Média e SEM de 4 culturas independentes. (B) Atividade do fator de transcrição FOXO foi medida através de transfecção de plasmídeo contendo seqüências de elemento responsivo a DAF (DBE) como promotores de gene para luciferase. A medida foi feita após 24 horas de tratamento com veículo (controle) (PBS) ou Klotho 1 nM, em meio de cultura contendo alta (4,5 g/L) ou baixa (1 g/L) concentração de glicose. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle em alta concentração de glicose; ### $p < 0,001$ comparado ao grupo controle em baixa concentração de glicose (ANOVA de duas vias). Média e SEM de 5 experimentos independentes. (C) O tratamento com 1 nM de Klotho recombinante, em diferentes concentrações, é capaz de induzir a expressão de catalase de forma dose-independente. **** $p < 0,0001$ (ANOVA de uma via). Média e SEM de 4 culturas independentes. (D) Por fim, tratamento com Klotho é capaz de conferir proteção contra dano causado por peróxido de hidrogênio. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ comparado ao grupo H₂O₂ (ANOVA de uma via). Dados representados como média ± SEM de 4-6 experimentos independentes.

3.8 Tratamento com Klotho Apresenta Propriedades Anti-inflamatórias em Astrócitos

Dando seguimento ao que foi encontrado no *array* (Tabela 6), avaliamos o potencial anti-inflamatório do pré-tratamento com proteína Klotho em cultura de astrócitos. Após purificação, astrócitos foram plaqueados em lamínulas de vidro e tratados por 24 horas com veículo (controle) (PBS) ou Klotho 1 nM. O estímulo inflamatório com LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi então realizado e as células fixadas com metanol 4 horas depois. A marcação com anticorpo contra a subunidade p65 do fator de transcrição NF- κB revelou sua translocação nuclear esperada após estímulo com LPS no grupo sem tratamento com Klotho (Figura 17).



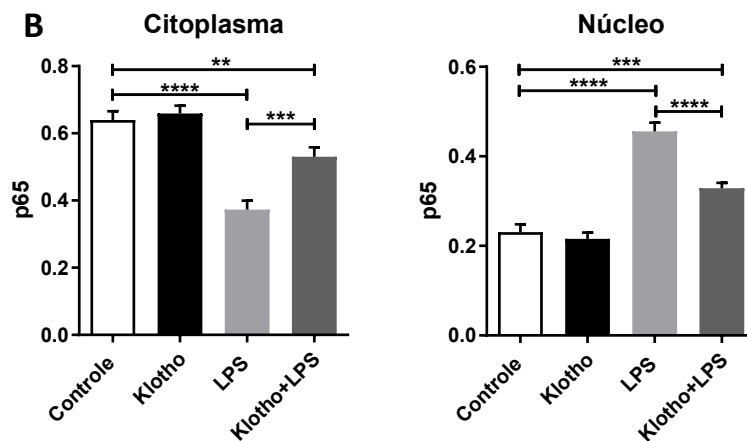


Figura 17 - Localização subcelular da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B em cultura primária de astrócitos. Astrócitos em cultura foram pré-tratados com veículo (controle) (PBS) ou Klotho 1 nM por 24 horas e então desafiados com LPS 10 μ g/mL. (A) A fixação das células foi feita 4 horas após o estímulo, seguida de marcação para a proteína p65 (verde) e DAPI (azul). (B) Quantificação da média total da intensidade de cada imagem foi feita e calculada a porcentagem correspondente ao núcleo e ao citoplasma, separadamente. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (ANOVA de uma via). Dados são representados como média \pm SEM de 3 experimentos independentes.

O pré-tratamento com a proteína Klotho recombinante, no entanto, foi capaz de reduzir significativamente a marcação nuclear após exposição com LPS, indicando uma possível ação anti-inflamatória (citoplasma: controle = $0,6394 \pm 0,02595$; Klotho = $0,6592 \pm 0,0234$; LPS = $0,3727 \pm 0,02675$; Klotho + LPS = $0,5303 \pm 0,02813$; núcleo: controle = $0,231 \pm 0,01721$; Klotho = $0,2159 \pm 0,01383$; LPS = $0,4557 \pm 0,01946$; Klotho + LPS = $0,3287 \pm 0,01214$; média de todas as células contidas em cada fotomicrografia, 3-5 fotomicrografias por cultura, 3 culturas independentes).

Para uma avaliação quantitativa, extratos celulares de frações citosólica e nuclear foram preparados e o conteúdo de p65 em cada compartimento analisado por *western blotting* (Figura 18). Novamente vemos que a translocação nuclear da subunidade p65 induzida pelo estímulo com LPS é inibida pelo tratamento com Klotho recombinante (citoplasma: controle = $1,00 \pm 0,0125$; Klotho = $1,00 \pm 0,08571$; LPS = $0,19 \pm 0,03077$; Klotho + LPS = $0,79 \pm 0,9939$; núcleo: controle = $1,00 \pm 0,05376$; Klotho = $0,95 \pm 0,1322$; LPS = $2,90 \pm 0,3924$; Klotho + LPS = $1,46 \pm 0,205$).

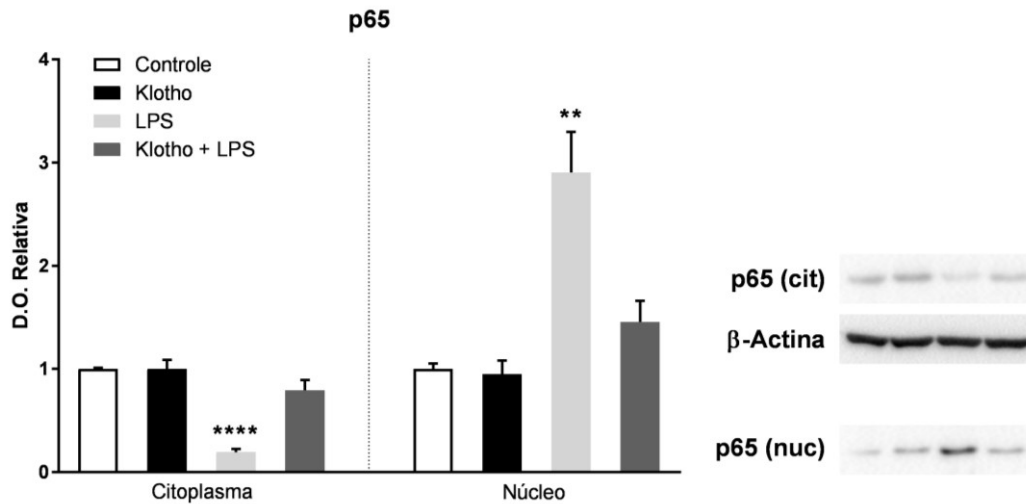


Figura 18 - Quantidades relativas de p65 nas frações citoplasmática e nuclear de astrócitos estimulados com LPS. Astrócitos em cultura foram pré-tratados com veículo (controle) (PBS) ou Klotho 1 nM por 24 horas e então estimulados com LPS 10 µg/mL por 4 horas. Análise por *western blotting* das frações citoplasmática e nuclear revela que a translocação nuclear da subunidade p65 em células estimuladas por LPS é impedida pelo pré-tratamento com Klotho recombinante. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via). Dados são representados como média \pm SEM de 3 experimentos independentes.

Por fim, o ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) para o fator de transcrição NF- κ B confirmou os dados achados até o momento. Astrócitos foram tratados com veículo ou Klotho 1 nM por 24 horas e então estimulados com LPS 10 µg/mL por 4 horas, após as quais o extrato proteico nuclear foi realizado e 2 µg de proteína utilizados para o EMSA. A ligação do extrato nuclear à sonda marcada com 32 P foi muito maior em astrócitos tratados com LPS e o pré-tratamento com a Klotho por 24 horas foi capaz de inibir a ativação do fator de transcrição (Figura 19A) (Controle = $1,00 \pm 0,03763$; LPS = $1,39 \pm 0,01696$; Klotho = $1,02 \pm 0,05382$; Klotho + LPS = $1,05 \pm 0,06933$; $n = 4$). Análise mais profunda investigando as subunidades do NF- κ B envolvidas na ligação à sonda (Figura 19B) revelou presença das subunidades p50 e p65 em todos os grupos. Grupo pré-tratado com Klotho por 24 horas e então exposto a LPS, no entanto, apresentou maior envolvimento da subunidade p50, com pouco (ou nenhuma) reação com a subunidade p65, confirmando a propriedade anti-inflamatória da proteína Klotho.

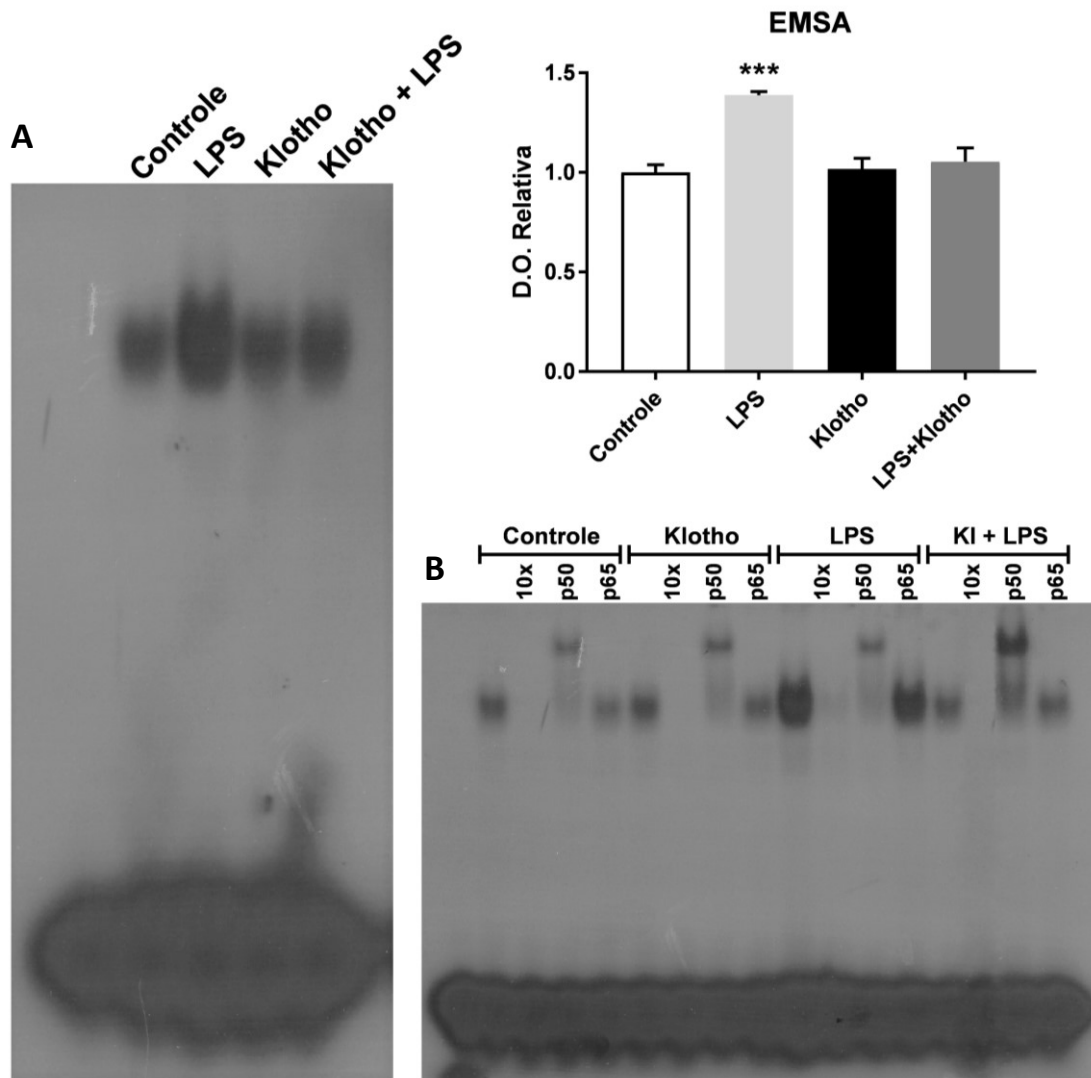


Figura 19 - Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) para o fator de transcrição NF- κ B em astrócitos tratados com Klotho e estimulados com LPS. (A) Astrócitos tratados ou não com Klotho por 24 horas foram expostos a 10 μ g/mL de LPS por 4 horas e as proteínas nucleares extraídas e avaliadas por EMSA com relação ao seu potencial de ligação a sonda marcada com 32 P responsiva ao NF- κ B. Astrócitos estimulados com LPS apresentam maior ligação com a sonda, porém o pré-tratamento com Klotho é capaz de impedir a ativação do fator de transcrição. (B) Análise por *super-shift* indica presença de dímero p50/p65 e todas as amostras. A adição de sonda fria em excesso (10x) extingue a banda radioativa, provando sua especificidade. A adição de anticorpo contra p50 aumenta o peso do complexo transcripcional e existe retardo da banda radioativa. Embora não apareça banda de retardo, a adição de anticorpo contra p65 é capaz de diminuir o sinal original de cada amostra, indicando sua presença no dímero ligado ao oligonucleotídeo. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via). Dados são representados como média \pm SEM de 4 experimentos independentes.

3.9 Ubiquitinação e Atividade Proteassomal Induzidas pela Klotho Promovem Degradação de PFKFB3 em Neurônios

A isoforma 3 da 6-fosfo-fruto-2-quinase/frutose-2,6-bisfosfatase (PFKFB3) é a principal forma da enzima encontrada no encéfalo. Ela controla a formação de frutose-2,6-bisfosfato, um importante ativador da enzima reguladora mais importante da glicólise, a 6-fosfofruto-1-

quinase (PFK1). RNA mensageiro de PFKFB3 é encontrado nos mesmos níveis tanto em neurônios quanto em astrócitos, porém o nível proteico da PFKFB3 em neurônios é mantido virtualmente nulo devido a sua ubiquitinação e consequente degradação proteossomal (HERRERO-MENDEZ et al., 2009).

A fim de testar a capacidade da Klotho em regular os níveis de PFKFB3, cultura primária de astrócitos e de neurônios hipocámpais foram tratadas com Klotho 1 nM por 24 horas, e os níveis de PFKFB3 avaliados por *western blotting* (Figura 20A). Em astrócitos, tanto o tratamento com Klotho quanto tratamento com insulina 100 nM não foram capazes de regular a quantidade da enzima encontrada. Em neurônios, no entanto, a ausência de insulina por 24 horas e o tratamento com a Klotho produziram redução nos níveis de PFKFB3 encontrados por *western blotting* (Neurônios: controle = $1,00 \pm 0,06043$; insulina [-] = $0,5545 \pm 0,06674$; Klotho = $0,6437 \pm 0,04574$; n = 3; astrócitos: controle = $1,00 \pm 0,1287$; insulina [+] = $1,04 \pm 0,06751$; Klotho = $1,013 \pm 0,1175$; n = 4)

Considerando os resultados de transcriptoma obtidos com o *array* feito em neurônios (Tabela 7), avaliamos a atividade proteossomal e os níveis de proteínas poli-ubiquitinadas em neurônios tratados com Klotho 1 nM por 24 horas ou mantidos na ausência de insulina pelo mesmo período. Para a aferição da atividade proteossomal, um quarto grupo experimental composto por células tratadas com inibidor de proteassoma (MG 132, 50 μ M, durante 2 horas) foi incluído. Como é possível observar na Figura 20B, enquanto a inibição do proteassoma tem o efeito esperado sobre a aferição da atividade proteossomal, tanto a ausência de insulina quanto o tratamento com Klotho recombinante foram capazes de aumentar a atividade proteolítica do complexo (controle = $1,00 \pm 0,04129$; MG 132 = $0,4498 \pm 0,02822$; insulina [-] = $1,377 \pm 0,03228$; Klotho = $1,302 \pm 0,01965$; n = 3). De forma semelhante, o tratamento com Klotho foi capaz de provocar aumento no conteúdo de proteínas poliubiquitinadas, efeito não observado nas células mantidas por 24 horas sem insulina (controle = $1,00 \pm 0,05619$; insulina [-] = $1,072 \pm 0,04676$; Klotho = $1,137 \pm 0,04026$; n = 3) (Figura 20C).

Com o intuito de verificar se a diminuição de PFKFB3 detectada em neurônios tratados com Klotho se deve ao aumento de sua ubiquitinação (e consequente degradação proteossomal), avaliamos os níveis de PFKFB3 poliubiquitinada realizando imunoprecipitação com anticorpo contra poliubiquitina (FK2) seguido de *western blotting* contra a PFKFB3 (Figura 20). Vemos que tanto a ausência de insulina quanto o tratamento com Klotho são capazes de

induzir ubiquitinação da PFKFB3 em cultura primária de neurônios hipocampais (controle = $1,00 \pm 0,245$; insulina [-] = $6,14 \pm 1,143$; Klotho = $8,00 \pm 1,092$; n = 3) (Figura 20D).

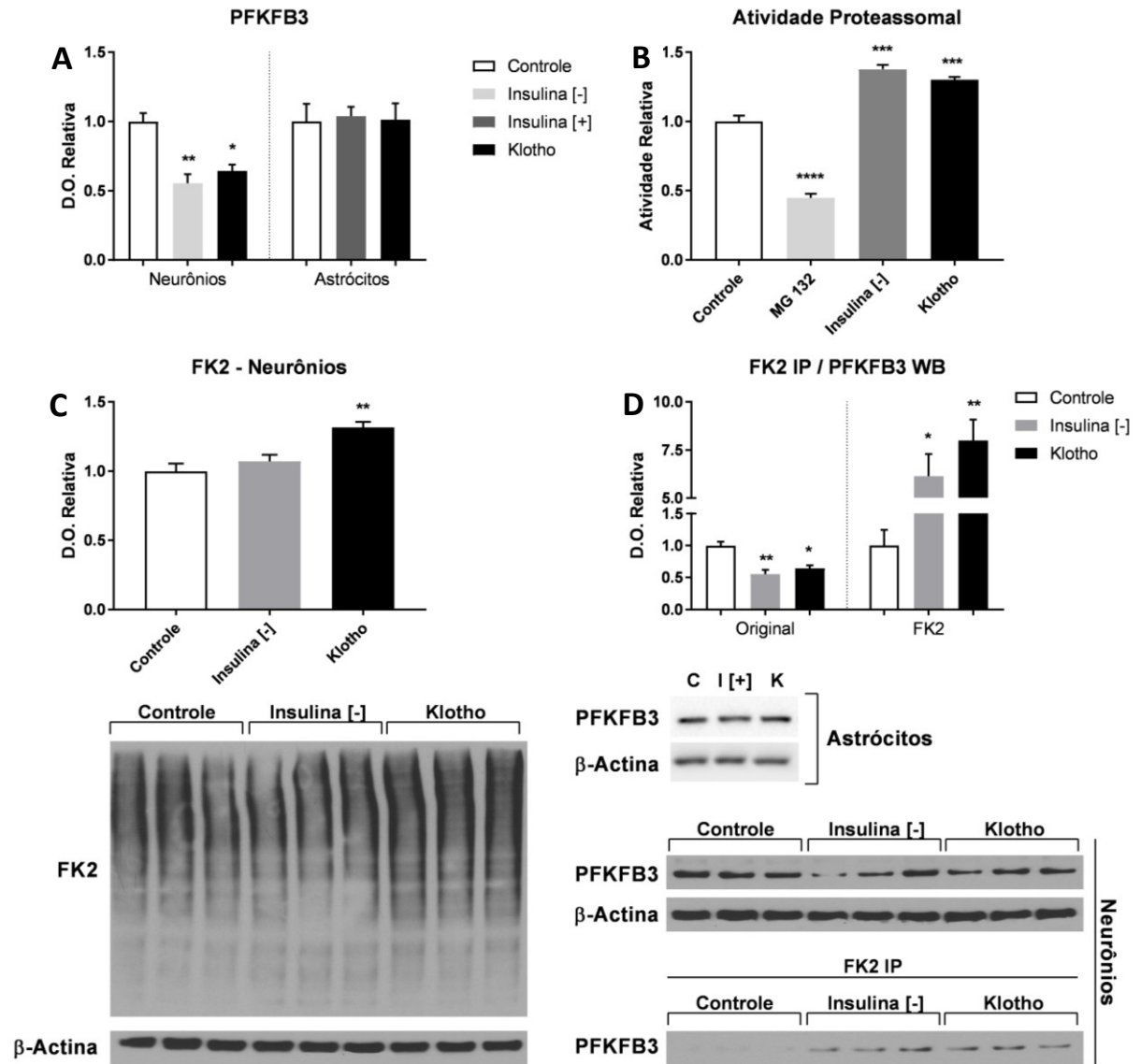


Figura 20 - Klotho promove degradação de PFKFB3 em neurônios por indução da atividade proteassomal e promoção de ubiquitinação. (A) Os níveis totais de PFKFB3 em neurônios hipocampais em cultura foram avaliados após 24 horas na ausência de insulina (Insulina [-]) ou após 24 horas de tratamento com 1 nM de Klotho recombinante. Para comparação, os níveis de PFKFB3 também foram avaliados em astrócitos em cultura após tratamento de 24 horas com adição de insulina 100 nM (Insulina [+]) ou com Klotho 1 nM. (B) A atividade proteassomal de neurônios hipocampais em cultura também foi aferida em diferentes condições. O tratamento com inibidor de proteassoma MG 132 a 50 μ M por 2 horas foi capaz de diminuir a atividade proteassomal e tanto a ausência de insulina (Insulina [-]) quanto o tratamento com 1 nM de Klotho recombinante por 24 horas foi capaz de induzir a atividade do proteassoma. (C) Os níveis de ubiquitinação foram aferidos por *western blotting* com anticorpo contra poliubiquitina (FK2). (D) Por fim, os níveis de ubiquitinação de PFKFB3 foram aferidos após respectivos tratamentos por meio de imunoprecipitação com FK2 seguido de *western blotting* contra PFKFB3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle. (ANOVA de uma via). Dados representados como média \pm SEM de 3-4 experimentos independentes.

3.10 Níveis de Klotho e Proteínas Relacionadas ao Metabolismo Energético Estão Alterados em Hipocampus de Animais Envelhecidos

Níveis séricos de Klotho correlacionam inversamente com a idade em humanos (XIAO et al., 2004; KOYAMA et al., 2015). Para avaliar os níveis de Klotho durante o processo de envelhecimento no tecido encefálico, hipocampo de camundongos de diferentes idades foram avaliados por ELISA quanto ao conteúdo de proteína Klotho (Figura 21A). Camundongos com 18 meses de idade apresentaram diminuição discreta, porém significativa (em torno de 20%) de conteúdo de Klotho em tecido hipocampal quando comparado a animais de 4 meses de idade (4 meses = $96,0 \pm 1,778$; 12 meses = $85,5 \pm 1,901$; 18 meses = $78,73 \pm 0,8185$ pg/ μ g de proteína; n = 4-5).

Proteínas relevantes à dinâmica metabólica de astrócitos e neurônios também foram avaliadas em camundongos de diferentes idades, como um critério de avaliação do estado da cooperação entre esses dois tipos celulares. Níveis de MCT2 (transportador neuronal de lactato) se mostraram diminuídos, enquanto níveis de MCT4 (transportador astrocítico de lactato) estavam aumentados (Figura 21B) (MCT2: 4 meses = $1,00 \pm 0,02277$; 12 meses = $0,8297 \pm 0,03066$; 18 meses = $0,7118 \pm 0,04624$; n = 5; MCT4: 4 meses = $1,00 \pm 0,09216$; 12 meses = $1,232 \pm 0,1366$; 18 meses = $1,827 \pm 0,124$; n = 3). O MCT2 é o transportador com maior afinidade para o lactato. Seu baixo k_m faz com que o transporte por esse facilitador aconteça em velocidade máxima em virtualmente qualquer condição fisiológica no encéfalo (BERGERSEN, 2015). Independente de uma maior expressão de MCT4, que pode indicar um maior efluxo de lactato pelos astrócitos, os menores níveis de MCT2 apontam para a possibilidade de uma menor incorporação desse substrato energético pelos neurônios em hipocampus de camundongos envelhecidos.

A PFKFB3 foi outra proteína analisada por *western blotting*. Seus maiores níveis em hipocampo de camundongos de 18 meses sugerem que haja a estabilização da enzima em neurônios ocorrendo juntamente com o envelhecimento (Figura 21B) (4 meses = $1,00 \pm 0,06193$; 12 meses = $1,41 \pm 0,2086$; 18 meses = $1,727 \pm 0,1164$; n = 4). De fato, disfunções na proteostase e *turnover* de proteínas sempre estiveram relacionadas com o envelhecimento. O sistema proteasomal, particularmente, é sabidamente afetado pelo processo de envelhecimento, e a diminuição da atividade proteasomal é considerada uma das causas do

acúmulo de proteínas mal dobradas e danificadas observado no envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

A avaliação do conteúdo das isoformas da LDH (LDHA, enriquecida em astrócitos, e LDHB, enriquecida em neurônios) (Figura 21B), mostrou modulação da LDHA com o envelhecimento (LDHA: 4 meses = $1,00 \pm 0,07152$; 12 meses = $1,038 \pm 0,06682$; 18 meses = $1,315 \pm 0,09433$; n = 5; LDHB: 4 meses = $1,00 \pm 0,0367$; 12 meses = $0,9805 \pm 0,06952$; 18 meses = $1,025 \pm 0,06674$; n = 4-5).

Aferição dos níveis de RNA mensageiro por PCR em tempo real de amostras de hipocampo de camundongos envelhecidos (Figura 21C) mostrou padrão semelhante ao encontrado no *blotting* referente à modulação nos genes de MCT2 (*slc16a7*) e MCT4 (*slc16a4*). O gene do transportador ubíquo MCT1 (*slc16a1*) não apresentou qualquer modulação (MCT1: 4 meses = $1,00 \pm 0,08134$; 12 meses = $0,8497 \pm 0,0815$; 18 meses = $1,006 \pm 0,02156$; n = 5; MCT2: 4 meses = $1,00 \pm 0,1211$; 12 meses = $0,4548 \pm 0,07261$; 18 meses = $0,5461 \pm 0,03883$; n = 4-5; MCT4: 4 meses = $1,00 \pm 0,08683$; 12 meses = $1,508 \pm 0,1565$; 18 meses = $2,347 \pm 0,1643$; n = 4-5; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (ANOVA de uma via). Dados representados como média \pm SEM).

O gene *pfkfb3* aparentou não sofrer qualquer alteração de expressão, indicando que as diferenças encontradas no *western blotting* devem-se a uma diminuição da degradação da proteína, e não ao aumento de sua expressão (PFKFB3: 4 meses = $1,00 \pm 0,09164$; 12 meses = $0,9504 \pm 0,0807$; 18 meses = $0,9102 \pm 0,02807$; n = 5. Dados representados como média \pm SEM). Devido às diferenças, embora não estatisticamente significantes, encontradas na expressão dos genes *g6pd* e *gapdh*, optou-se por não os utilizar como controles endógenos, preferindo-se a utilização dos genes *rplp0*, *actg1* e *hprt*. (G6PD: 4 meses = $1,00 \pm 0,04638$; 12 meses = $0,80 \pm 0,2008$; 18 meses = $0,66 \pm 0,1189$; n = 5; GAPDH: 4 meses = $1,00 \pm 0,1114$; 12 meses = $0,88 \pm 0,1509$; 18 meses = $0,71 \pm 0,1751$; n = 5. Dados representados como média \pm SEM).

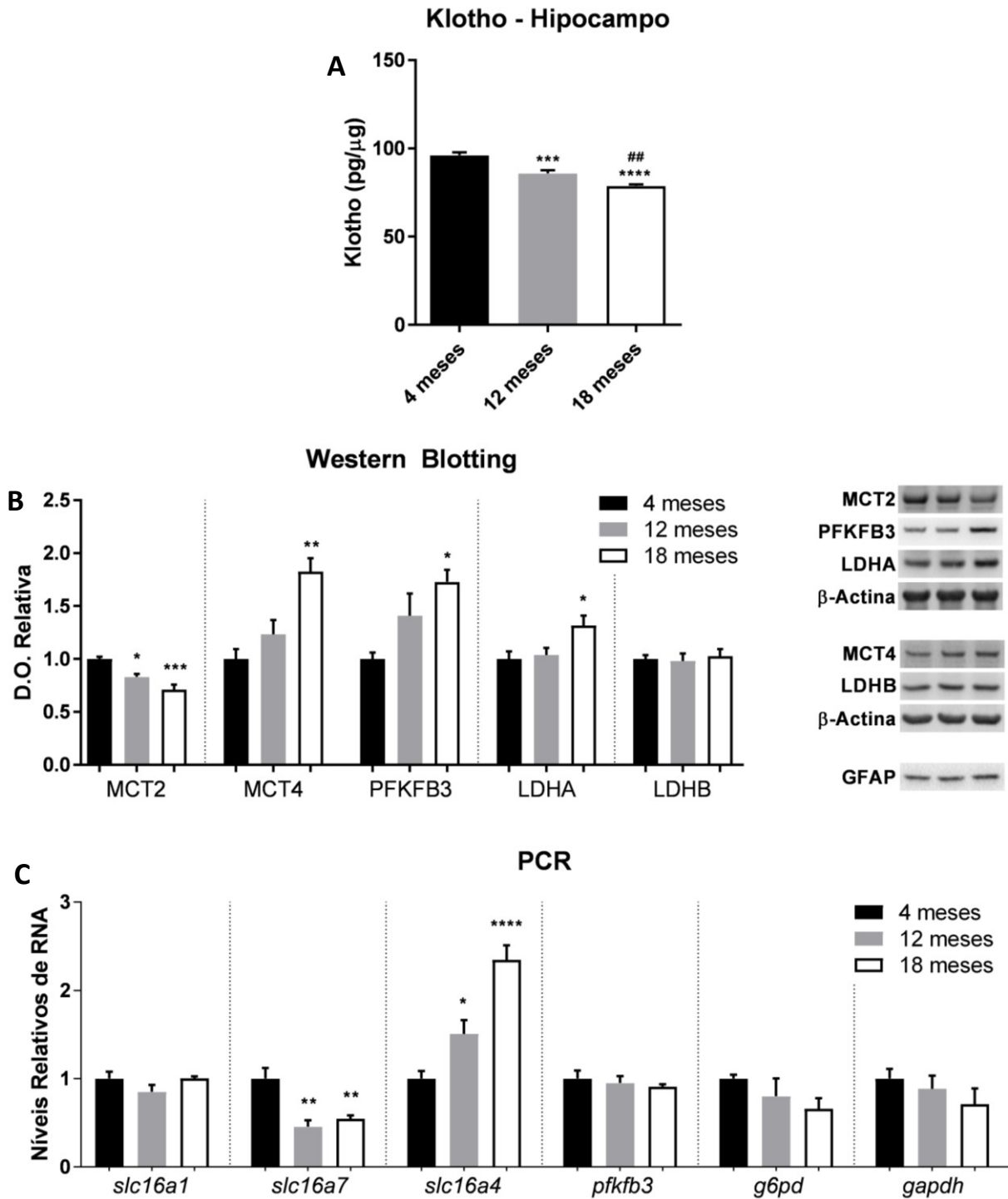


Figura 21 - O envelhecimento tem efeitos sobre os níveis de Klotho e proteínas relacionadas ao metabolismo energético no hipocampo de camundongos. (A) Hipocampo de camundongos de diferentes idades (4, 12 e 18 meses) foram avaliados quanto ao conteúdo total de proteína Klotho detectada por ELISA. (B) Níveis proteicos de MCT2, MCT4, PFKFB3, LDHA e LDHB foram avaliados nos hipocampos desses animais por *western blotting*. (C) Níveis de transcrição dos genes *slc16a1*, *slc16a7*, *slc16a4*, *pfkfb3*, *g6pd* e *gapdh* foram avaliados por PCR em tempo real e normalizados pelos níveis de expressão dos genes *actg1*, *hprt1* e *rplp0*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo 4 meses (ANOVA de uma via). Dados são representados como média \pm SEM de 3-5 animais diferentes.

4 DISCUSSÃO

Um dos primeiros parâmetros que se julgou necessário verificar nesses animais é o comportamento da regulação metabólica do organismo como um todo. A investigação da glicemia dos animais mostrou-se ser um parâmetro que nos forneceu algumas informações a respeito da função da proteína Klotho sob a regulação metabólica. Os resultados indicam que os animais *kl/kl* machos apresentam não apenas um estado hipoglicêmico de jejum, como também exibem um perfil de curva glicêmica em resposta a teste intraperitoneal de tolerância à glicose diferente dos animais *wild type*. Animais machos com o gene hipomórfico para a proteína Klotho têm desempenho no teste de tolerância à glicose coerente com aquele apresentado por animais especialmente sensíveis à insulina.

Além de sua função como co-ativador para o FGF23 enquanto presa à membrana, a proteína Klotho, uma vez clivada e liberada para o meio extracelular, pode agir como hormônio. Alcançada a corrente sanguínea, a proteína Klotho pode agir, de alguma forma ainda não estabelecida, reprimindo os sinais intracelulares da insulina e fator de crescimento insulínico 1 (IGF-1) (KUROSU, 2005). De fato, a hipoglicemia causada pela maior sensibilidade à insulina em animais hipomórficos para a proteína Klotho já foi anteriormente descrita (UTSUGI et al., 2000). Não apenas esses animais apresentam glicemia menor em teste de tolerância à glicose, indicando maior sensibilidade à insulina, como também a produção de insulina nas células β pancreáticas desses animais encontra-se diminuída. Além de influenciar na produção e sensibilidade à insulina, a proteína Klotho também é capaz de aumentar a liberação do hormônio pelas células β pancreáticas aumentando a localização de receptores vanilóides do tipo TRPV2 nas membranas dessas células, provocando maior influxo de cálcio nessas células quando expostas à glicose (LIN; SUN, 2012).

O fato de que fêmeas apresentaram resposta diferente de machos no teste de tolerância à glicose é especialmente interessante. Diferenças de expectativa de vida e, mais especificamente, de mecanismos moleculares que governam a regulação da longevidade em machos e fêmeas são observadas em diversas espécies de animais. De um ponto de vista genético, por exemplo, existe uma tendência do sexo homogamético (fêmeas em humanos e *Drosophila*, machos em aves e hermafrodita em *C. elegans*) apresentar uma expectativa de vida maior do que o sexo heterogamético (machos em humanos e *Drosophila*, fêmeas em aves) ou que apresenta apenas um cromossomo sexual (X0 em *C. elegans* machos) (TOWER;

ARBEITMAN, 2009). Existem evidências mostrando que reduzida sinalização de insulina/IGF-1 e restrição na dieta afetam a longevidade de machos e fêmeas de diferentes espécies de forma diferente. Por exemplo, o pico de ganho na longevidade não somente é maior em fêmeas de *Drosophila* (aumento de 60% em fêmeas e apenas 30% em machos), como também é alcançado com menor restrição calórica (60% da dieta padrão em fêmeas, contra 40% da dieta padrão em machos) (MAGWERE; CHAPMAN; PARTRIDGE, 2004). Em camundongos, enquanto a deleção de receptores de insulina no tecido adiposo leva a um aumento de aproximadamente 20% (BLUHER, 2003) tanto em machos quanto em fêmeas, a presença de apenas uma cópia funcional do gene de IGF1R resulta em extensão de longevidade apenas em fêmeas (aumento de 33%) (HOLZENBERGER et al., 2003). De forma interessante, superexpressão da proteína Klotho em camundongos leva a um aumento de longevidade mais significativo em machos (30%) do que em fêmeas (20%) (KUROSU, 2005). Talvez de acordo com as discrepâncias sexuais encontradas no nosso estudo com relação ao teste intraperitoneal de tolerância à glicose, apenas machos que superexpressam a Klotho apresentam leve resistência à insulina, enquanto fêmeas são ligeiramente resistentes a IGF-1 (KUROSU, 2005).

Continuando a caracterização do modelo de envelhecimento no animal mutante para a proteína Klotho, foram observadas algumas características julgadas pertinentes no sistema nervoso central desses animais, mais especificamente no hipocampo dos camundongos. Primeiramente foi avaliado o eixo mTOR-AKT-FOXO, sendo a importância desse último componente para a longevidade já extensivamente discutida neste trabalho. O mTOR é uma proteína regulatória que desempenha papel central em diversos processos do metabolismo celular incluindo crescimento celular, proliferação e sobrevivência sob condições tanto fisiológicas quanto patológicas (GUERTIN; SABATINI, 2007). Essa molécula é um dos principais componentes de dois complexos multi-proteicos, o complexo mTOR 1 (TORC1) e o complexo mTOR 2 (TORC2). O mTOR é inibido sob privação de nutrientes, o que é um passo crucial para a indução da autofagia (NODA; OHSUMI, 1998; SCOTT; SCHULDINER; NEUFELD, 2004). A via de sinalização do mTOR é o ponto convergente de diversas vias de transdução de sinal. Das vias *upstream* responsáveis pela ativação do mTOR incluem-se a via de sobrevivência celular PI3K/AKT e a via da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (MELEY et al., 2006; SARBASSOV, 2005).

A investigação do estado de fosforilação do mTOR nos camundongos mutantes para a proteína Klotho mostrou que nos animais hipomórficos para a proteína o estado de fosforilação do mTOR encontra-se aumentado quando comparado aos seus pares que expressam a proteína Klotho. O estado de fosforilação exacerbado da proteína mTOR em animais deficientes em Klotho já foi reportado para outros tecidos e tipos celulares, como músculo (IIDA et al., 2011), células de câncer gástrico (XIE et al., 2013b) e células do rim (LIN; KURO-O; SUN, 2013). A maior taxa de ativação do mTOR implica numa menor ativação de mecanismos de reparo celular, como a autofagia. Vale enfatizar aqui que a diminuição de processos autofágicos e a quebra da proteostase são características intimamente relacionadas com os danos celulares associados ao envelhecimento.

Outro ponto chave para este estudo foi a avaliação do estado de ativação da proteína AKT. A AKT contém um domínio de homologia à pleckstrina (PH) que se liga ao PIP₃ [fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato] na membrana plasmática com alta afinidade (FRANKE, 1997). Uma vez recrutada à membrana, a AKT pode ser fosforilada pela proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítideo 1 (PDK-1) no resíduo de treonina localizado na posição 308 (Thr308) (ALESSI et al., 1996, 1997). A fosforilação do resíduo de serina localizada na posição 473 (Ser473) é feita pelo complexo 2 do mTOR (mTORC2) (SARBASSOV, 2005) ou pela proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) (FENG et al., 2004). O importante a notar aqui é que a atividade máxima da AKT somente é atingida quando ambos os sítios (Thr308 e Ser473) estão fosforilados (ALESSI et al., 1996); a fosforilação adicional na Ser473, na verdade, aumenta o espectro de ação da AKT, que agora pode ter como alvo, por exemplo, toda a família de fatores de transcrição FOXO (YUNG; CHARNOCK-JONES; BURTON, 2011). A Figura 7 mostra o estado relativo de fosforilação no resíduo Ser473 da proteína Akt em hipocampos de camundongos mutantes para a proteína Klotho. Novamente, os animais que não expressam a proteína Klotho apresentam maior nível de fosforilação quando comparados aos animais com genótipo selvagem ou heterozigoto para a proteína Klotho. Esse dado corrobora a maior atividade da via do mTOR mostrado anteriormente, visto que o sítio Ser473 da proteína AKT é alvo do complexo TORC2, o qual a proteína mTOR faz parte.

O último ponto do eixo estudado, e, de fato, as proteínas efetoras do mesmo, são os fatores de transcrição da família FOXO. Na Figura 7 é mostrado o estado de fosforilação para dois componentes dessa família de fatores de transcrição, a FOXO1a e a FOXO3. O primeiro estudo mostrando a regulação da FOXO de mamíferos pela AKT foi feito por Brunet et al.

publicado no início de 1999 (BRUNET et al., 1999). Esse estudo demonstra a atividade da AKT sobre a FOXO3, fosforilando o fator de transcrição em três sítios diferentes (Thr32, Ser253 e Ser315) tanto *in vitro* quanto *in vivo*, resultando na exclusão nuclear da FOXO3. Além disso, o estudo mostrou que o fator de transcrição pode mediar a sinalização de sobrevivência *downstream* à AKT, e que sua ativação exagerada pode induzir apoptose. Um estudo feito por Kops et al. (KOPS et al., 1999), publicado no mesmo ano, demonstrou comportamento regulatório de fosforilação pela AKT e resposta transcricional similar para a FOXO4. Esses estudos foram seguidos por inúmeros estudos que demonstraram a habilidade da AKT em fosforilar FOXO1 e outros membros da família das FOXOs, corroborando esse mecanismo regulatório crucial (BIGGS et al., 1999; DEL PESO et al., 1999; NAKAE; PARK; ACCILI, 1999; RENA et al., 1999; SHAODONG et al., 1999; TAKAISHI et al., 1999; TANG et al., 1999). Esses estudos foram também confirmados para o DAF-16 (em *C. elegans*) e em *Drosophila*, demonstrando a conservação desse mecanismo através da evolução (CAHILL et al., 2001; JUNGER et al., 2003; LIN et al., 2001; PUIG et al., 2003). Concordando com os resultados apresentados para a proteína AKT, os níveis de fosforilação encontrados para as FOXOs estudadas foram maiores nos animais que não expressam a proteína Klotho.

Analisando em conjunto o resultado do estado de fosforilação das três proteínas apresentadas (mTOR, AKT e FOXO), em hipocampos dos camundongos mutantes para a proteína Klotho, podemos tentar entender a ação que a proteína Klotho (ou sua ausência) tem sobre a estrutura. A ausência da proteína, ao causar maior sensibilidade à insulina, acaba por aumentar o sinal intracelular da via PI3K/AKT. Associado a isso ocorre a ativação do mTOR que, por sua vez, provoca ativação completa da proteína AKT. Uma vez totalmente fosforilada, a AKT age sobre os fatores de transcrição da família FOXO, fosforilando-os e concentrando-os no citoplasma, sendo impedidos de exercer seu papel como fatores de transcrição. Deve existir, portanto uma diminuição da transcrição dos genes alvo para os fatores de transcrição da família FOXO, entre eles genes associados à resposta antioxidante e ao metabolismo energético no hipocampo de camundongos hipomórficos para a proteína Klotho. O tratamento de cultura neuronal de córtices de camundongos com insulina ou Klotho por 24 horas prova que esse tipo celular também se comporta como o esperado frente ao estímulo com ambas as proteínas, embora haja relato na literatura que mostra ativação da via PI3K/AKT em neurônios estimulados por Klotho (ZELDICH et al., 2014).

A ativação dos fatores de transcrição FOXO pelo tratamento com a proteína Klotho foi mais profundamente avaliada em astrócitos. De acordo com o que previamente já foi discutido, o tratamento de astrócitos com insulina induziu maior fosforilação da FOXO3a, enquanto os níveis de fosforilação após tratamento com a Klotho mostraram-se diminuídos. Os ensaios com de *gene reporter* com plasmídeos contendo genes de luciferase controlados por promotor responsivo aos fatores de transcrição FOXO mostram que o estado de fosforilação da FOXO correlaciona com sua atividade transcricional em astrócitos. Importante notar que é possível que a Klotho ative FOXO não somente pela inibição do eixo PI3K/AKT mas também pela inibição da SGK ou mesmo ativação da JNK ou beta-catenina (YAMAMOTO et al., 2005). A habilidade da FOXO3a em regular genes envolvidos na resposta anti-oxidante foi avaliada e, como esperado, níveis aumentados de catalase foram encontrados em astrócitos tratados com a proteína Klotho, o que conferiu proteção contra dano oxidativo causado por peróxido de hidrogênio. Concordando com os nossos dados, já foi demonstrado que o tratamento com Klotho recombinante em camundongos confere proteção contra danos oxidativos causados por tacrolimo através do aumento da atividade transcricional de FOXO3a e consequente aumento de expressão de SOD2 ao regular negativamente a via PI3K/AKT (LIM et al., 2017). O papel das FOXOs no sistema nervoso central e, mais especificamente, a possibilidade de regulação da sua atividade como estratégia terapêutica, tem ganhado notoriedade (MAIESE, 2016). Estudo feito em encéfalos humanos sugere um possível papel neuroprotetor da FOXO3a de astrócitos, correlacionado os estímulos oxidativos comuns aos processos de envelhecimento e fisiopatológico da doença de Alzheimer com a maior retenção nuclear da FOXO e consequente aumento transcricional de glutamina sintetase (FLUTEAU et al., 2015). A glutamina sintetase astrocítica é um importante regulador da transmissão neuronal glutamatérgica, contribuindo para a homeostase sináptica ao reduzir os níveis de glutamato e prevenindo então dano neuronal por excitotoxicidade.

Aqui também mostramos evidências que a proteína Klotho é produzida em neurônios em resposta à insulina, bem como em resposta à estimulação glutamatérgica. Nós também mostramos que a Klotho secretada tem influência sobre o metabolismo de astrócitos, estimulando a glicólise aeróbica e a liberação de lactato em um mecanismo dependente da ativação de FGFR1 e ERK 1/2. De um ponto de vista mecanístico, a habilidade da Klotho de modular a sinalização de FGFR1 em astrócitos é consistente com os resultados em outros tipos celulares (KUROSU et al., 2006). Em células cancerígenas, a ativação de FGFR1 diminui a

utilização mitocondrial de piruvato e promove glicólise aeróbica através da fosforilação de LDHA (FAN et al., 2011), PKM2 (HITOSUGI et al., 2009) e PDHK1 (HITOSUGI et al., 2011). O fato de termos encontrado o mesmo perfil de fosforilação em astrócitos tratados com a proteína Klotho é bastante interessante, uma vez que as propriedades anti-neoplásicas da mesma já foi provada extensivamente em diversos tipos celulares (SUN et al., 2015; XIE et al., 2013b; ZHOU et al., 2017; ZHU et al., 2013), principalmente devido à sua atividade inibitória sobre a via de insulina/IGF-1, promoção de autofagia, e regulação da sinalização da Wnt (XIE et al., 2013a). De forma semelhante, a via MAPK/ERK também tem sido associada com a formação de lactato em macrófagos ativados (TRAVES et al., 2012). Novamente nos encontramos na mesma interessante situação, uma vez que as propriedades anti-inflamatórias da proteína Klotho foram não somente demonstradas em outros trabalhos (LIU et al., 2011; MAEKAWA et al., 2009; OHYAMA et al., 1998), como nós aqui também observamos redução de ativação do fator de transcrição NF- κ B em astrócitos pré-tratados com Klotho e desafiados com LPS. Além disso, a manutenção de níveis elevados de glicólise aeróbica devido à clivagem dependente de ADAM17 de fatores de crescimento e ativação constitutiva da via MAPK/ERK também foi descrita em síndrome do ovário policístico (BECK GOOZ et al., 2014).

Com relação ao encéfalo especificamente, a atividade neuronal tem sido associada com o estímulo da atividade de ADAM10 e ADAM17, o que facilita a clivagem dos domínios extracelulares de diversas proteínas transmembrana como nectin-1 (KIM et al., 2010), receptor de proteína regulatória de sinal α (SIRP α) (TOTH et al., 2013) e o precursor de neuregulina-1 tipo II (IWAKURA et al., 2017). Em neurônios hipocâmpais, a Klotho transmembrana é expressa em ambos os compartimentos pré e pós-sinápticos (LI et al., 2017). Devido ao papel das ADAM10 e ADAM17 na clivagem da Klotho em outros tecidos (CHEN et al., 2007), é possível que o aumento dependente de atividade no conteúdo proteico de Klotho em neurônios em cultura que foi observado neste trabalho é mediado tanto pelo aumento de síntese quanto pelo aumento de sua clivagem.

Já é bem estabelecido que neurônios e astrócitos são funcionalmente acoplados. Por exemplo, astrócitos desempenham um importante papel sobre a excitabilidade neuronal controlando as concentrações extracelulares de potássio e removendo neurotransmissores como glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) da fenda sináptica (HERTZ; ZIELKE, 2004). Os astrócitos fazem a ponte entre vasos sanguíneos e neurônios removendo nutrientes essenciais da corrente sanguínea e transferindo-os a neurônios (CAMANDOLA; MATTSON,

2017) Cada vez mais tem sido demonstrado que o lactato produzido por astrócitos é um importante metabólito para os neurônios (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). O reconhecimento da importância da lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS) em condições fisiológicas e patológicas tem crescido veemente nas últimas décadas (PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012; FINSTERWALD; MAGISTRETTI; LENGACHER, 2015). Por exemplo, o transporte de lactato pelos MCTs em sinapses excitatórias dá suporte constitutivo à transmissão sináptica (NAGASE et al., 2014), e é necessário para o estabelecimento de formação de memória de longa duração (SUZUKI et al., 2011).

Enquanto a hipótese da ANLS assume que o lactato é exclusivamente utilizado para o metabolismo energético ao substituir a glicose como substrato, deve-se notar que outras necessidades metabólicas dos neurônios podem ser supridas pelo lactato, ora diretamente ora “poupando” a glicose (DIENEL, 2012). Por exemplo, o piruvato gerado a partir do lactato em neurônios pode ser utilizado para contribuir indiretamente com a síntese de intermediários do ciclo de ácidos tricarboxílicos através do acoplamento de sua transaminação a alanina com a conversão de glutamato a α -cetoglutarato, que é justamente o substrato limitante do ciclo (Figura 22). Como um outro possível destino, neurônios podem direcionar parte do piruvato gerado para a síntese de lipídeos necessários para manter ou criar novas conexões sinápticas. Agindo através do recém descoberto receptor de ácido hidroxicarboxílico 1, o lactato pode também agir como uma molécula sinalizadora e não apenas como um metabólito (BOZZO; PUYAL; CHATTON, 2013).

Camundongos Klotho hipomórficos apresentam anormalidades relacionadas à mielinização e desregulação da maturação e função de oligodendrócitos (CHEN et al., 2013). Oligodendrócitos satélite estão intimamente relacionados com neurônios e astrócitos (BATTEFELD; KLOOSTER; KOLE, 2016) e avidamente captam lactato para finalidades energéticas e síntese de lipídeos (SÁNCHEZ-ABARCA; TABERNERO; MEDINA, 2001). É, portanto, possível que a Klotho produzida em neurônios aja em astrócitos para estimular a glicólise aeróbica e a liberação de lactato, e em oligodendrócitos para estimular a síntese de lipídeos através da captura de lactato (Figura 22). Nossas descobertas sugerem que a Klotho pode desempenhar um papel importante na coordenação da cooperação metabólica e funcional entre diversos tipos celulares no encéfalo. Além disso, elas provêm uma nova ideia à recente observação que a atividade neuronal modifica a expressão gênica de astrócitos para provocar uma regulação positiva de seu metabolismo e promover exportação de lactato

(HASEL et al., 2017). Devido a sua alta demanda energética e metabólica, é coerente que neurônios tenham a habilidade de modificar rapidamente o metabolismo de astrócitos com a finalidade de obter substratos para suas necessidades funcionais. A Klotho, nesse cenário, poderia ser uma molécula sinalizadora utilizada por neurônios para induzir tais mudanças.

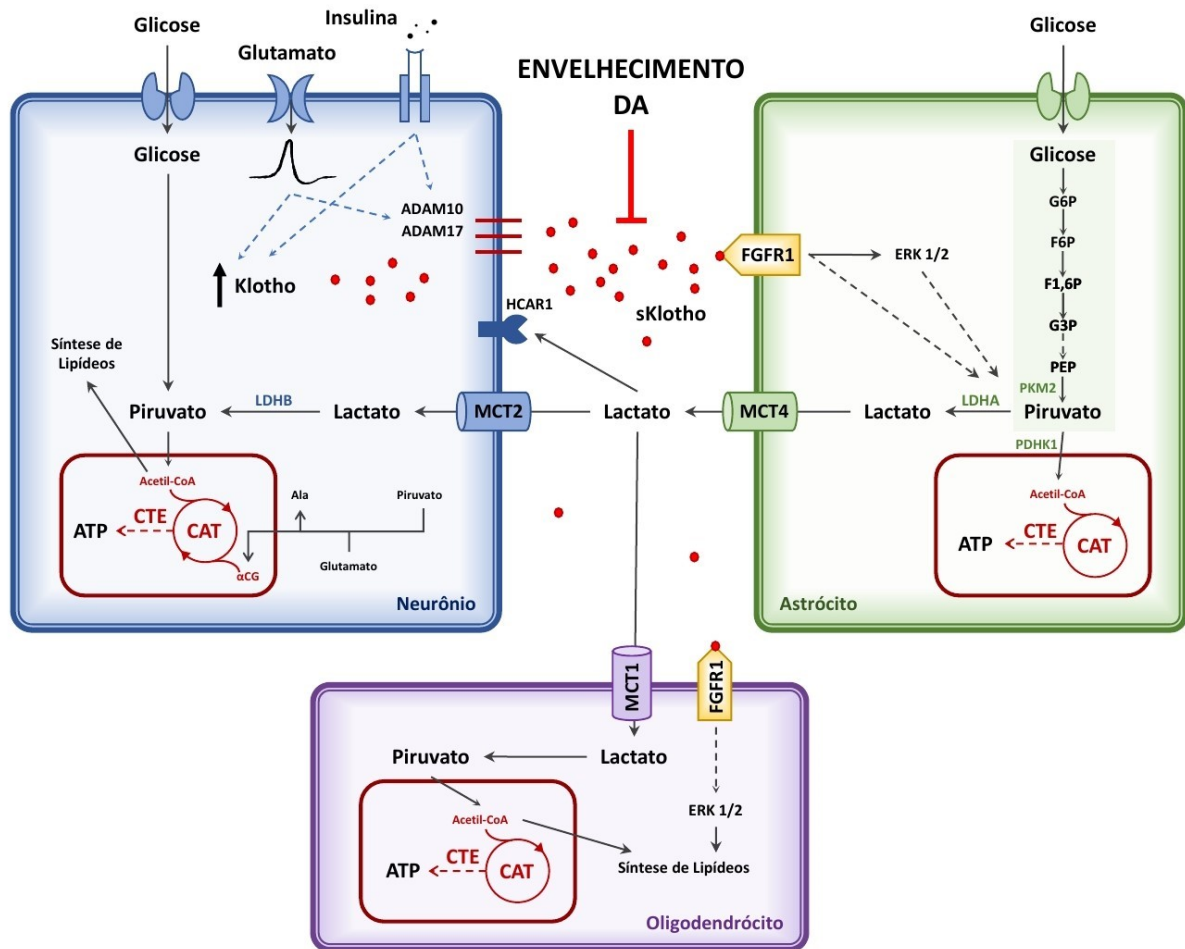


Figura 22 - Klotho produzida por neurônios estimula a glicólise aeróbica em astrócitos e a liberação de lactato. A expressão de Klotho em neurônios é regulada positivamente pela neurotransmissão glutamatérgica e estímulo por insulina. A Klotho secretada (sKlotho) por neurônios provoca um rápido aumento na glicólise aeróbica em astrócitos e a consequente liberação de lactato através de um mecanismo que necessita da ativação do receptor 1 de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR1) e da quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2). O lactato liberado por astrócitos no meio extracelular pode ser diretamente utilizado por neurônios para suprir suas necessidades energéticas durante momentos de alta atividade. De forma alternativa o lactato pode indiretamente suprir a oxidação fosforilativa neuronal ao acoplar a transaminação de piruvato a alanina (Ala) com a conversão de glutamato a α -cetoglutarato (α CG). Além disso, o lactato pode ser usado como substrato para a síntese de lipídios contribuindo para o estabelecimento e manutenção de arborização dendrítica e plasticidade sináptica. Oligodendrócitos satélite estão intimamente associados com neurônios e astrócitos e também podem utilizar o lactato liberado para propósitos energéticos, bem como síntese de lipídios. Durante o envelhecimento ou em condições patológicas como na doença de Alzheimer (DA), a reduzida produção de sKlotho impactaria o acoplamento de neurônios e astrócitos, resultando em geração insuficiente de lactato e disfunção neuronal. ADAM: uma proteína desintegrina e metaloproteinase; CAT: ciclo dos ácidos tricarbóxicos; CTE: cadeia de transporte de elétrons; F6P: frutose-6-fosfato; F1,6P: frutose-1,6-bisfosfato; G6P: glicose-6-fosfato; G3P: gliceraldeído-3-fosfato; HCAR1: receptor 1 de ácido hidroxicarboxílico; LDH: lactato desidrogenase; MCT: transportador de ácidos monocarbóxicos; PDHK1: piruvato desidrogenase quinase 1; PEP: fosfoenolpiruvato; PKF1: fosfofrutoquinase 1; PKM2: piruvato quinase M2.

O achado de que, assim como ocorre em hepatócitos (CHEN et al., 2007), a produção de Klotho neuronal é aumentada na presença de insulina pode explicar, em parte, como a insulina é capaz de modular o metabolismo energético encefálico. É bem estabelecido que receptores de insulina são amplamente expressos no encéfalo, e que a insulina é capaz de cruzar a barreira hemato-encefálica, além de ser produzida localmente por células do encéfalo (CSAJBÓK; TAMÁS, 2016). A maior expressão de receptores de insulina em neurônios do que em células da glia (UNGER et al., 1989) é provavelmente a razão pela qual as funções da insulina no encéfalo são primariamente neurotróficas (BANKS; OWEN; ERICKSON, 2012). Sinalização deficiente do receptor de insulina tem sido associada com diminuída plasticidade evocada por experiência (CHIU; CHEN; CLINE, 2008), e animais *knockout* para o IRS-2 apresentam LTP diminuída (MARTÍN et al., 2012). Embora a insulina não modifique a captura de glicose nem em neurônios nem em astrócitos (FERNANDEZ et al., 2017), um aumento agudo de glicólise local foi observado em hipocampo após administração intracerebroventricular direta de insulina (MCNAY et al., 2010). É possível que, em resposta à sinalização de insulina, os neurônios produzam mais Klotho, que pode então estimular a glicólise local em astrócitos.

Glicólise aeróbica particularmente aumentada no encéfalo de humanos tem sido observada em áreas associadas com a rede neural em modo padrão (*default mode network*, DMN), e nos córtices dorsolateral, pré-frontal e parietal associados com o processamento do controle de tarefas (VAISHNAVI et al., 2010). Há de se notar que, de forma interessante, as áreas que apresentam alta glicólise aeróbica são aquelas com um alto número de células não-neuronais, e são quase idênticas às afetadas pela deposição amiloide e alteração metabólica na doença de Alzheimer (VLASSENKO et al., 2010).

O hipometabolismo de glicose é uma característica silenciosa do processo de envelhecimento natural e um achado pré-clínico em muitas doenças neurodegenerativas (CAMANDOLA; MATTSON, 2017). Em humanos, genes da ANLS dependentes de atividade em astrócitos foram encontrados diminuídos com o envelhecimento (HASEL et al., 2017). Os níveis de Klotho no sistema nervoso central também são menores em adultos idosos versus jovens, e são ainda mais diminuídos em pacientes com doença de Alzheimer quando comparados a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária (SEMBA et al., 2014). Tendo em vista nossos achados, é tentador especular que a inabilidade dos neurônios em produzir Klotho suficiente pode estar envolvida com as alterações do metabolismo energético encefálico durante o

envelhecimento e em processos patológicos. Diminuída produção de Klotho resultaria na inabilidade dos astrócitos em responder de forma rápida modificando seu fluxo metabólico para aumentar sua liberação de lactato com a finalidade de suprir as necessidades funcionais e metabólicas de neurônios e oligodendrócitos adjacentes (Figura 22).

Nossos estudos *in vivo* de camundongos envelhecidos mostram desregulação de proteínas e genes relacionados ao acoplamento metabólico. Níveis de expressão da proteína astrocítica MCT4 e seu gene, *slc16a4*, parecem aumentar com o envelhecimento, enquanto o transportador neuronal MCT2 e níveis de RNA mensageiro de seu gene *slc16a7* apresentam-se diminuídos (Figura 21). Acompanhando o aumento do transportador MCT4 foi observado um aumento na expressão da isoforma A da lactato desidrogenase (LDHA). De fato, esses achados correlacionam com o acúmulo de lactato encefálico característico do processo de envelhecimento. A maior produção de lactato em astrócitos devido ao aumento da expressão de LDHA (ROSS et al., 2010) associado ao aumento do transportador MCT4 explicariam o aumento de lactato encontrado em encéfalos de idosos. No entanto, de forma aparentemente contraditória, níveis de glicólise aeróbica no encéfalo de humanos parecem diminuir com o envelhecimento (GOYAL et al., 2017). Uma possível explicação para esses achados poderia ser a menor capacidade de neurônios em utilizar o lactato como substrato, mecanismo sugerido pelos menores níveis de MCT2 encontrados aqui neste trabalho em hipocampo de camundongos envelhecidos, o que resultaria em seu acúmulo no tecido encefálico.

Outro ponto importante na regulação metabólica de células do sistema nervoso central é a proteína PFKFB3. Agindo de forma dual como quinase e fosfatase, as enzimas PFKFB regulam o conteúdo de frutose-2,6-bisfosfato, um ativador crucial da enzima PFK1. A isoforma 3 da PFKFB, encontrada no encéfalo, é a isoforma com maior razão de atividade quinase / fosfatase, apresentando atividade quinase 700 vezes maior em seu estado nativo, podendo chegar a 3000 vezes maior quando ativada pela PKA ou AMPK (CAVALIER et al., 2012). A PFKFB3 age, portanto, exclusivamente produzindo frutose-2,6-bisfosfato, ativando PFK1 e glicólise. Em neurônios, a quantidade de PFKFB3 é mantida nula através de processos pós-transcricionais. A constante ubiquitinação e degradação proteossomal da PFKFB3 em neurônios garante que, nesse tipo celular, a glicose seja metabolizada através da via das pentoses-fosfato (HERRERO-MENDEZ et al., 2009), devido à ausência de frutose-2,6-bisfosfato e portanto baixa atividade da PFK1. Isso garante constante redução de NADP a NADPH, o que pode constituir um importante mecanismo protetor em neurônios, uma vez que o NADPH é

utilizado em reações de reparo de danos oxidativos. A reciclagem de glutatona, por exemplo, é especialmente crucial para neurônios. Neurônios são incapazes de sintetizar novas moléculas de glutatona por si só, dependendo de astrócitos para a incorporação de cisteínas no sistema nervoso central (POW, 2001). A glutatona sintetizada em astrócitos é secretada e metabolizada extracelularmente e, então, a cisteína resultante é incorporada por neurônios para a síntese de glutatona (DRINGEN et al., 2001).

A importância do papel protetor da via das pentoses em neurônios foi demonstrada previamente, enfatizando a ausência da PFKFB3 como um importante mecanismo de sobrevivência neuronal. Nesse sentido, foi visto que estímulos excitotóxicos estabilizam a PFKFB3 neuronal, reduzindo a atividade da via das pentoses e aumentando a glicólise, resultando em dano oxidativo e consequente morte neuronal (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2012). Esses efeitos puderam ser impedidos através da superexpressão de glicose-6-fosfato desidrogenase, a enzima responsável pela catálise da etapa-limitante na via das pentoses (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2012). Mostramos aqui que a Klotho é capaz de induzir degradação proteossomal de PFKFB3 em neurônios não somente aumentando sua ubiquitinação como também induzindo a atividade do proteassoma. Essa última observação é particularmente interessante, uma vez que é sabido que o acúmulo de proteínas mal dobradas e danificadas devido ao aumento de danos e, especialmente, diminuição de atividade proteossomal, é uma característica do envelhecimento e está intimamente correlacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SAEZ; VILCHEZ, 2014). Nossos dados mostram que existe acúmulo de PFKFB3 no hipocampo de camundongos envelhecidos devido provavelmente a menor atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, e que a diminuição da Klotho pode ser um dos fatores que contribuem para esse achado. O acúmulo de PFKFB3 e menor atividade de via das pentoses pode explicar, por fim, a maior susceptibilidade de encéfalos envelhecidos a danos oxidativos e excitotoxicidade.

Em resumo, este trabalho sugere que a proteína Klotho desempenha um papel significativo no metabolismo encefálico, modulando o acoplamento neurônio-astrócito, e a forma como os neurônios processam diferentes substratos energéticos ao regular o sistema ubiquitina-proteassoma e o conteúdo neuronal de PFKFB3. Somamos evidências apoiando a hipótese de que o acoplamento metabólico/oxidativo entre astrócitos e neurônios é fundamental para a homeostase neuronal, e que essa dinâmica pode ser orquestrada pela proteína Klotho.

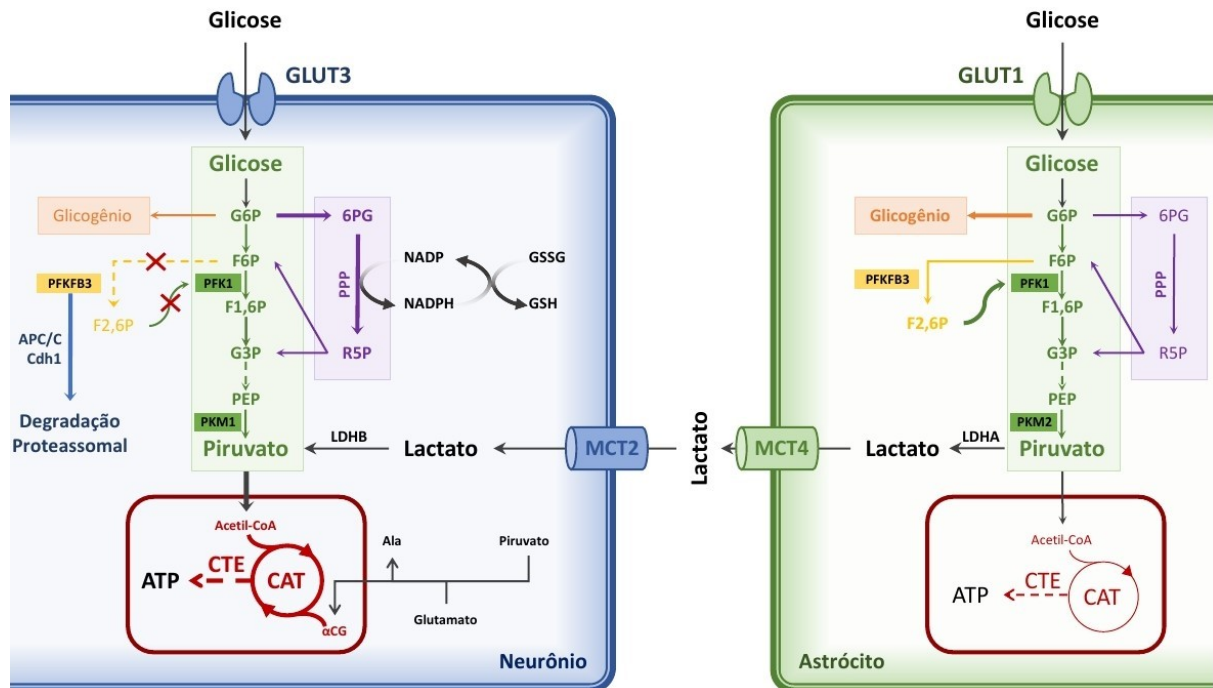


Figura 23 - Cooperação metabólica e os diferentes fins da glicose em astrócitos e neurônios. A glicose entra no neurônio através do transportador de glicose tipo 3 (GLUT3), sendo então fosforilada a glicose-6-fosfato (G6P) que pode então seguir pela glicólise ou pela via das pentoses (PPP). Em neurônios, a glicólise é inibida devido à constante degradação proteossomal do 6-fosfo-fruto-2-quinase/frutose-2,6-fosfatase 3 (PFKFB3), regulada pela ubiquitinação dependente da E3 ligase complexo promotor de anáfase/ciclossomo (APC/C) e seu ativador, caderina 1 (Cdh1). Na PPP, a G6P é convertida a 6-fosfogluconato (6PG) que é por fim transformada a ribulose-5-fosfato (R5P), com a produção acoplada de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH). O NADPH é utilizado em reações redutoras, como na reciclagem de glutathiona oxidada (GSSG), restituindo níveis de glutathiona reduzida (GSH) em neurônios. O esqueleto de carbonos gerado na PPP pode retornar à glicólise e ser metabolizado a piruvato. Adicionalmente, em neurônios, piruvato pode ser gerado a partir de lactato devido ao enriquecimento da isoforma B da lactato desidrogenase (LDHB). O piruvato pode, por fim, ser metabolizado na mitocôndria através do ciclo de ácidos tricarboxílicos (CAT), e todos os cofatores reduzidos podem ser novamente oxidados na cadeia de transporte de elétrons (CTE) acoplado geração de ATP por fosforilação oxidativa. Em astrócitos, a glicose é incorporada através do transportador de glicose tipo 1 (GLUT1) e então estocada como glicogênio ou metabolizada pela via glicolítica. A presença de PFKFB3 permite a produção de frutose-2,6-bisfosfato (F2,6P) em astrócitos, ativando a fosfofrutoquinase-1 (PFK1) e aumentando a glicólise. O piruvato é então convertido a lactato devido à presença preferencial da isoforma A da lactato desidrogenase (LDHA) em astrócitos. Adaptado de Camandola, Mattson, 2017.

5 CONCLUSÕES

Foi constatada maior sensibilidade à insulina por parte dos animais que não expressam a proteína Klotho. Foi possível concluir que essa sensibilidade provoca efeitos tanto periféricos (hipoglicemia e anormalidades no teste de tolerância à glicose) quanto efeitos centrais e associados a cascatas de sinalização intracelular de estruturas encefálicas. A maior ativação da via de insulina/IGF-1 pode ser responsável pela maior atividade do mTOR no hipocampo dos animais mutantes para a proteína Klotho, induzindo maior atividade da proteína AKT e consequente fosforilação/inativação dos fatores de transcrição da família da FOXO.

A proteína Klotho é expressa em neurônios em resposta à sinalização glutamatérgica e à insulina, indicando que sua função pode estar associada à atividade neuronal. De fato, uma dessas funções parece ser a estimulação de astrócitos e a promoção de produção e liberação de lactato. Agindo através do receptor FGFR1 e ativação da ERK, a Klotho consegue promover glicólise aeróbica em astrócitos, auxiliando no acoplamento metabólico entre neurônios e astrócitos. Ainda afetando o metabolismo energético, a Klotho é capaz de induzir degradação de PFKFB3 em neurônios através de promoção de ubiquitinação e atividade proteassomal, podendo assim ser um importante fator que contribui para a produção de NADPH em neurônios, conferindo a eles proteção antioxidante.

Já em astrócitos, a atividade protetora da Klotho parece estar relacionada principalmente a dois fatores. Ativando os fatores de transcrição FOXO, a Klotho é capaz de induzir transcrição de genes de enzimas antioxidantes em astrócitos, como a catalase, conferindo assim proteção contra insultos oxidativos. Por outro lado, a Klotho apresentou papel anti-inflamatório, inibindo a translocação e ativação do fator de transcrição NF- κ B em astrócitos insultados com LPS.

Por fim, no processo fisiológico de envelhecimento a expressão da proteína Klotho diminui no hipocampo de camundongos. Alteradas também estão diversas proteínas relacionadas ao acoplamento metabólico de neurônios e astrócitos, corroborando a importância de uma apropriada cooperação metabólica para função neuronal e cognitiva saudável.

6 MATERIAL SUPLEMENTAR

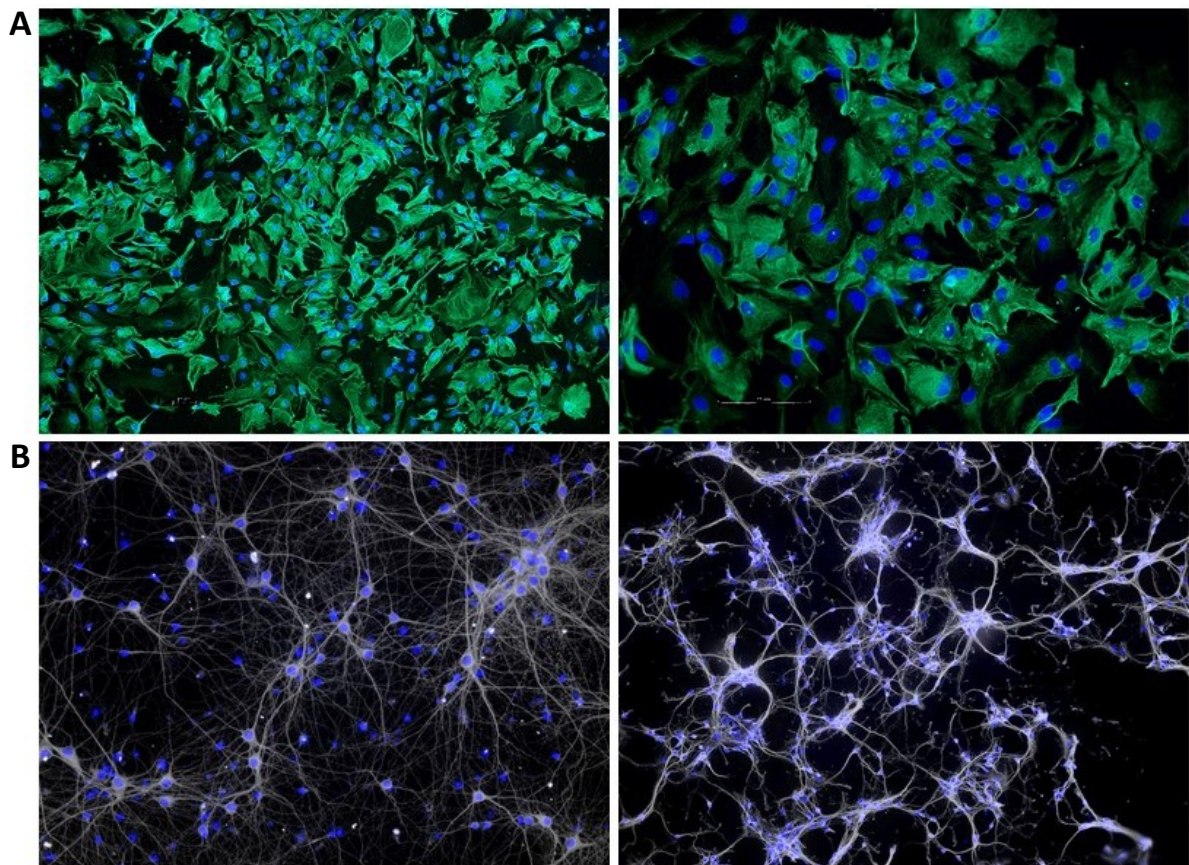


Figura Suplementar 1 - Fotomicrografias representativas das culturas primárias de astrócitos e neurônios de camundongos. (A) Camundongos neonatos com até 3 dias de vida foram utilizados para a realização de cultura primária de astrócitos. Células fixadas em metanol 100% e marcadas contra proteína glial fibrilar ácida (GFAP (verde) e DAPI (azul). (B) Embriões de camundongos com 16-17 dias de desenvolvimento foram utilizados para a realização de cultura primária de neurônios corticais. Células fixadas em metanol 100% e marcadas contra proteína associada a microtúbulo-1 (MAP-2) (branco) e DAPI (azul).

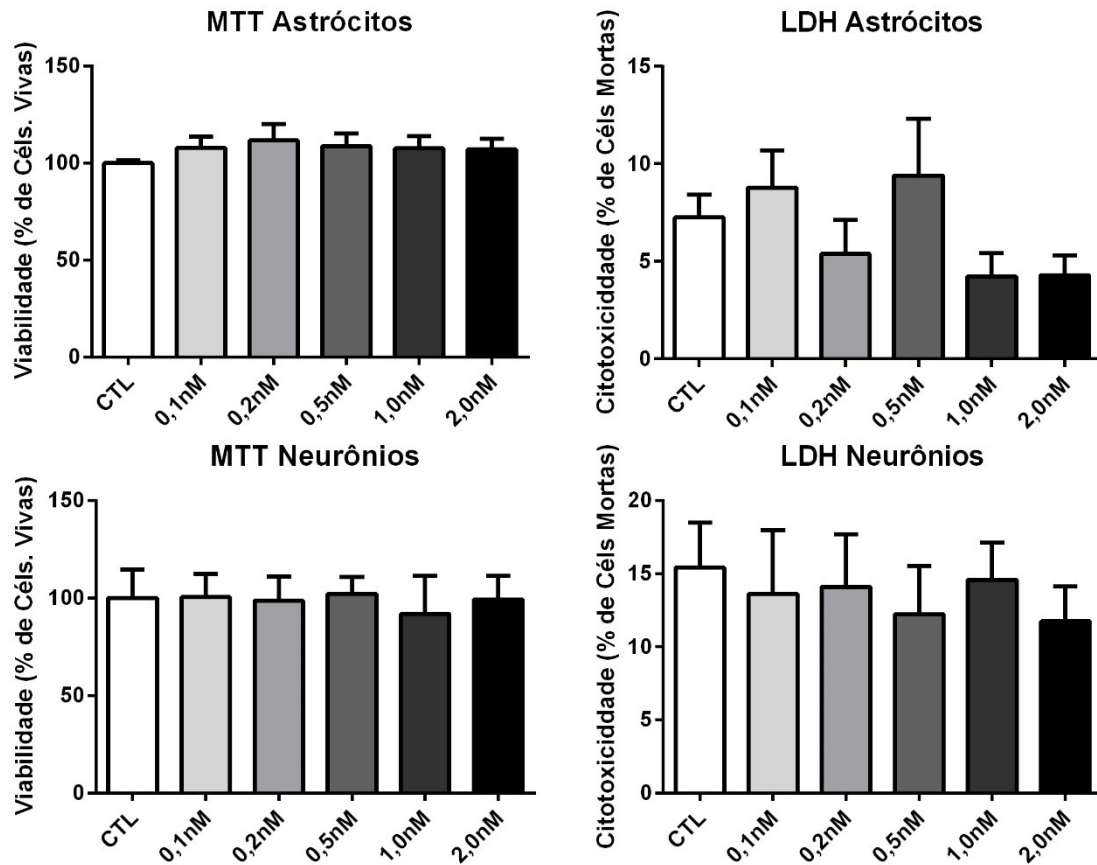


Figura Suplementar 2 - Efeito do tratamento da proteína Klotho por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular de cultura de astrócitos e cultura de neurônios. Cultura primária de astrócitos ou de neurônios corticais de camundongos foi submetida a tratamento por 24 horas com Klotho recombinante em diversas concentrações e os índices de citotoxicidade e viabilidade celular foram avaliados pela atividade da LDH no meio de cultura e pela redução do MTT, respectivamente. Nenhuma dose testada apresentou toxicidade às células ou influenciou sua viabilidade.

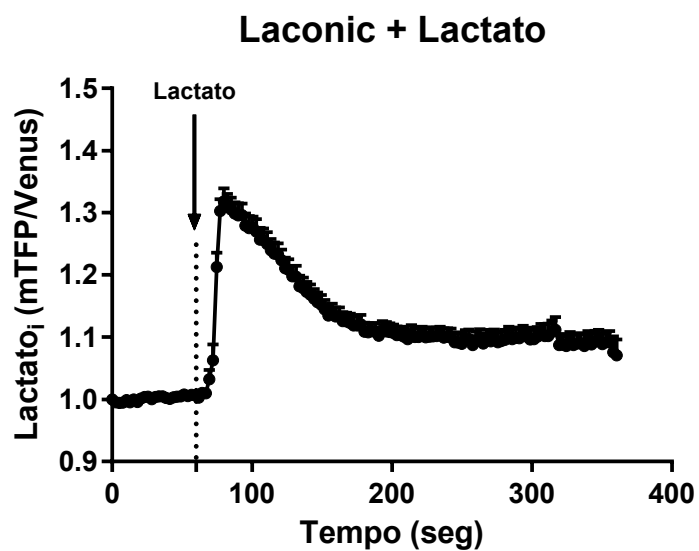


Figura Suplementar 3 - Resposta de astrócitos em cultura transfectados com o plasmídeo *Laconic* quando da adição de lactato extracelular. Astrócitos cultivados de córtex de camundongos neonatos foram transfectados com o plasmídeo genômico baseado em FRET responsivo a lactato *Laconic*, e sua resposta ao lactato testada pela adição de lactato extracelular. Os sinais dos fluoróforos mTFP e Venus foram gravados em tempo real e utilizados para o cálculo de FRET. Como é possível observar, a sonda intracelular é, como esperado, responsiva a lactato.

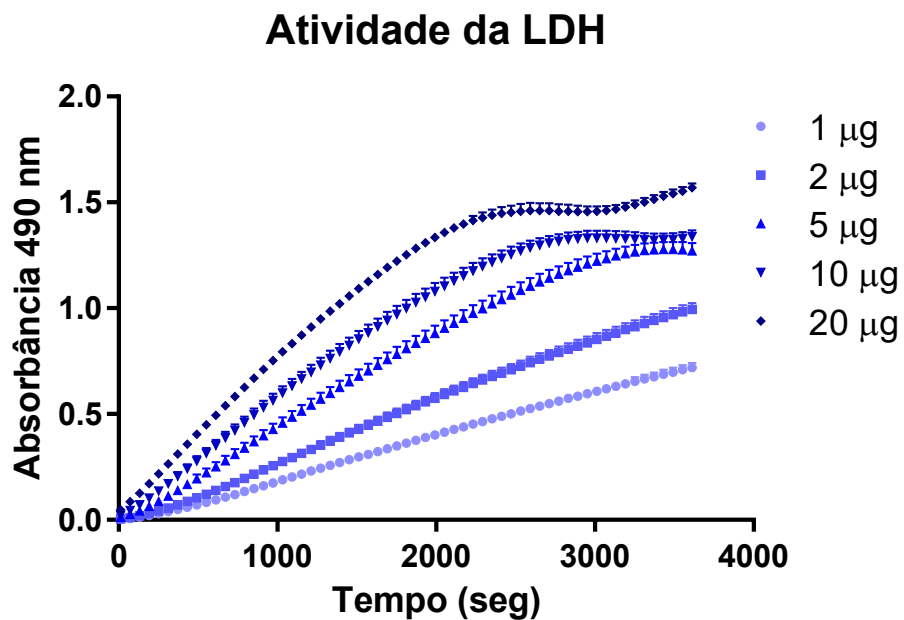


Figura Suplementar 4 - Padronização do ensaio da atividade da lactato desidrogenase em extrato proteico de astrócitos. Astrócitos cultivados de córtices de camundongos neonatos foram lisados e suas proteínas colhidas em forma nativa. Diferentes quantidades de proteína foram adicionadas ao meio reacional com a finalidade de se achar a melhor opção para a realização dos experimentos. A conversão de NAD a NADH pela lactato desidrogenase foi estimada em tempo real pela leitura de absorbância em comprimento de onda igual a 490 nm, referente à formação de formazan a partir da redução de INT. A quantidade de proteína escolhida foi de 5 µg.

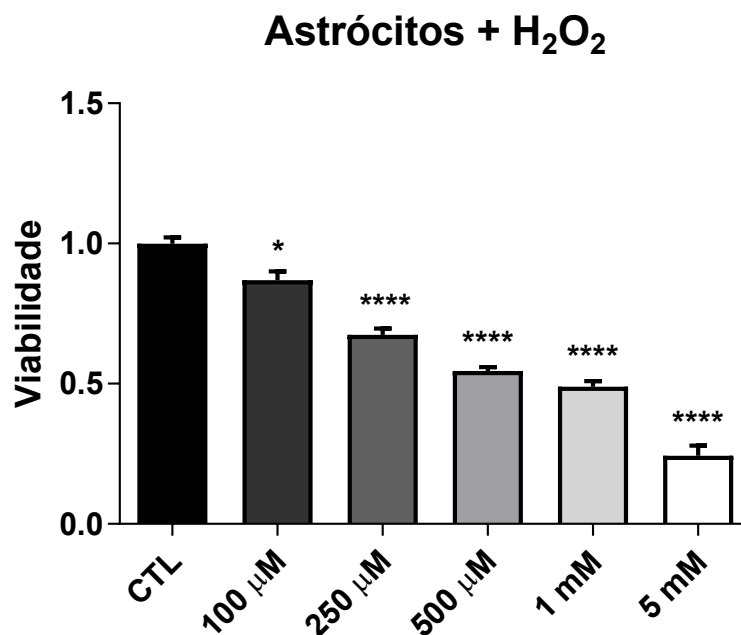


Figura Suplementar 5 - Padronização do insulto oxidativo em cultura primária de astrócitos. Astrócitos em cultura foram desafiados por 30 min com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e sua viabilidade aferida posteriormente por MTT. Todas as doses testadas foram suficientes para a redução da viabilidade das células tratadas. A dose de 500 µM foi escolhida para a realização de experimentos seguinte. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle (ANOVA de uma via). Resultados são representados como média \pm SEM de 3 experimentos independentes.

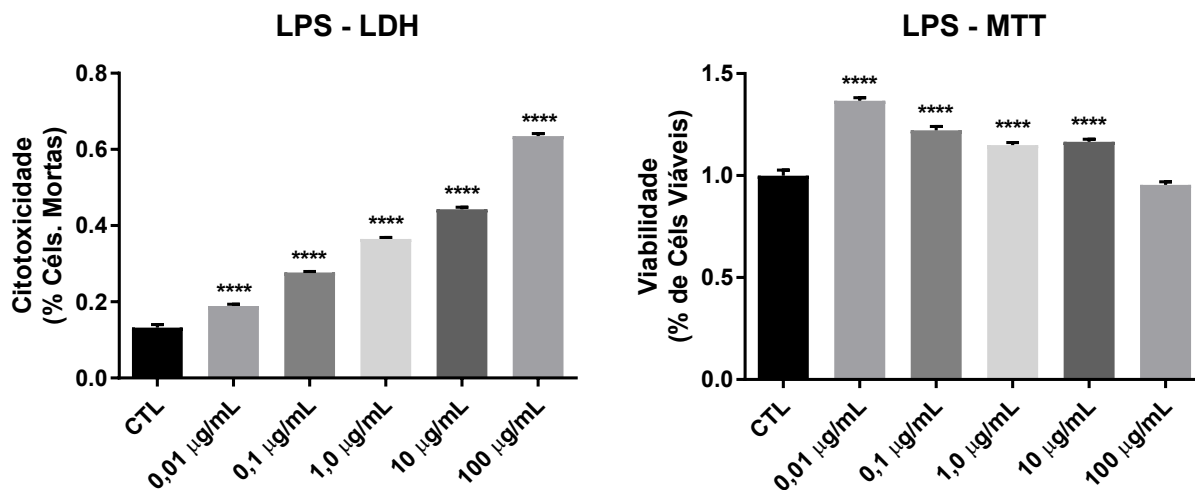
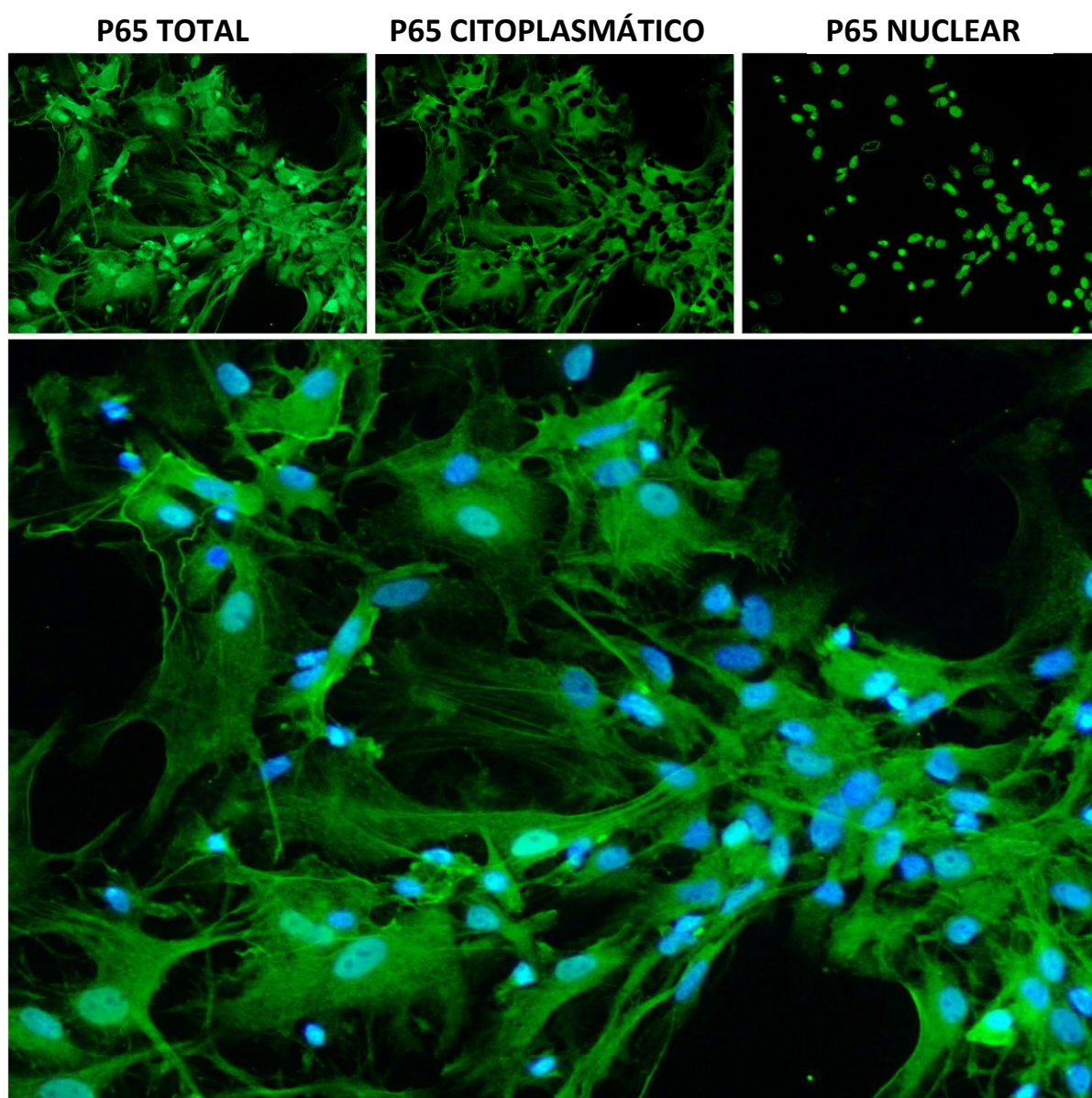


Figura Suplementar 6 - Padronização do insulto inflamatório em cultura primária de astrócitos. Astrócitos em cultura foram desafiados por 24 horas com diferentes concentrações de LPS e sua viabilidade aferida posteriormente por LDH e MTT. Todas as doses de LPS testadas foram capazes de induzir alterações nos valores encontrados para a atividade de LDH extracelular e/ou redução do MTT. Doses tão baixas quanto 0,01 µg/mL já foram capazes de induzir aumento de atividade de LDH. Os maiores valores de redução do MTT podem ser explicados pela ativação das células gliais em resposta ao LPS. **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via). Resultados são apresentados como média \pm SEM de 3 experimentos independentes.



MERGE P65 + DAPI

Figura Suplementar 7 - Células de astrócitos cultivados marcados contra subunidade p65 do fator de transcrição *NF- κ B*. Para aferição semi-quantitativa do nível de translocação nuclear da subunidade p65, imunofluorescência contra a proteína foi feita em astrócitos fixados com metanol 100%. Intensidade média de fluorescência da marcação total de p65 (verde) foi comparada com a intensidade média da marcação sem regiões que co-localizam com o DAPI (p65 citoplasmático) e com a intensidade média da marcação apenas com regiões que co-localizam com o DAPI (p65 nuclear).

REFERÊNCIAS*

- ALCEDO, J.; KENYON, C. Regulation of *C. elegans* Longevity by Specific Gustatory and Olfactory Neurons. **Neuron**, v. 41, n. 1, p. 45–55, 2004.
- ALESSI, D. R.; ANDJELKOVIC, M.; CAUDWELL, B.; CRON, P.; MORRICE, N.; COHEN, P.; HEMMINGS, B. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **The EMBO journal**, v. 15, n. 23, p. 6541–6551, 1996.
- ALESSI, D. R.; JAMES, S. R.; DOWNES, C. P.; HOLMES, A. B.; GAFFNEY, P. R. J.; REESE, C. B.; COHEN, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . **Current Biology**, v. 7, n. 4, p. 261–269, 1997.
- ANAMIZU, Y.; KAWAGUCHI, H.; SEICHI, A.; YAMAGUCHI, S.; KAWAKAMI, E.; KANDA, N.; MATSUBARA, S.; KURO-O, M.; NABESHIMA, Y.; NAKAMURA, K.; OYANAGI, K. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. **Acta Neuropathologica**, v. 109, n. 5, p. 457–466, 2005.
- APFELD, J.; KENYON, C. Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 402, n. 6763, p. 804–809, 1999.
- ARKING, D. E.; ATZMON, G.; ARKING, A.; BARZILAI, N.; DIETZ, H. C. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation Research**, v. 96, n. 4, p. 412–418, 2005.
- ARKING, D. E.; BECKER, D. M.; YANEK, L. R.; FALLIN, D.; JUDGE, D. P.; MOY, T. F.; BECKER, L. C.; DIETZ, H. C. KLOTHO Allele Status and the Risk of Early-Onset Occult Coronary Artery Disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 5, p. 1154–1161, 2003.
- ARKING, D. E.; KREBSOVA, A.; MACEK, M.; ARKING, A.; MIAN, I. S.; FRIED, L.; HAMOSH, A.; DEY, S.; MCINTOSH, I.; DIETZ, H. C. Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 856–861, 2002.
- BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. A. Insulin in the brain: There and back again. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 82–93, 2012.
- BATTEFELD, A.; KLOOSTER, J.; KOLE, M. H. P. Myelinating satellite oligodendrocytes are integrated in a glial syncytium constraining neuronal high-frequency activity. **Nature Communications**, v. 7, p. 11298, 2016.
- BECK GOOZ, M.; MALDONADO, E. N.; DANG, Y.; AMRIA, M. Y.; HIGASHIYAMA, S.; ABOUD, H. E.; LEMASTERS, J. J.; BELL, P. D. ADAM17 promotes proliferation of collecting duct kidney epithelial cells through ERK activation and increased glycolysis in polycystic kidney disease. **AJP: Renal Physiology**, v. 307, n. 5, p. F551–F559, 2014.
- BERGERSEN, L. H. Lactate Transport and Signaling in the Brain: Potential Therapeutic Targets and Roles in Body–Brain Interaction. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 2, p. 176–185, 2015.
- BERKICH, D. A.; OLA, M. S.; COLE, J.; SWEATT, A. J.; HUTSON, S. M.; LANOUE, K. F. Mitochondrial transport proteins of the brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 15, p. 3367–3377, 2007.
- BERNARDINELLI, Y.; MAGISTRETTI, P. J.; CHATTON, J.-Y. Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14937–14942, 2004.
- BIGGS, W. H.; MEISENHOLDER, J.; HUNTER, T.; CAVENEE, W. K.; ARDEN, K. C. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 13, p. 7421–7426, 1999.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

- BISHOP, N. A.; GUARENTE, L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. **Nature**, v. 447, n. 7144, p. 545–549, 2007.
- BITTAR, P. G.; CHARNAY, Y.; PELLERIN, L.; BOURAS, C.; MAGISTRETTI, P. J. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 16, n. 6, p. 1079–1089, 1996.
- BLALOCK, E. M.; GRONDIN, R.; CHEN, K.; THIBAUT, O.; THIBAUT, V.; PANDYA, J. D.; DOWLING, A.; ZHANG, Z.; SULLIVAN, P.; PORTER, N. M.; LANDFIELD, P. W. Aging-Related Gene Expression in Hippocampus Proper Compared with Dentate Gyrus Is Selectively Associated with Metabolic Syndrome Variables in Rhesus Monkeys. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 17, p. 6058–6071, 2010.
- BLUHER, M. Extended Longevity in Mice Lacking the Insulin Receptor in Adipose Tissue. **Science**, v. 299, n. 5606, p. 572–574, 2003.
- BOUTCHUENG-DJIDJOU, M.; COLLARD-SIMARD, G.; FORTIER, S.; HÉBERT, S. S.; KELLY, I.; LANDRY, C. R.; FAURE, R. L. The Last Enzyme of the De Novo Purine Synthesis Pathway 5-aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase (ATIC) Plays a Central Role in Insulin Signaling and the Golgi/Endosomes Protein Network. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 4, p. 1079–1092, 2015.
- BOZZO, L.; PUYAL, J.; CHATTON, J. Y. Lactate Modulates the Activity of Primary Cortical Neurons through a Receptor-Mediated Pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71721, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRAUN, M.; QORRAJ, M.; BÜTTNER, M.; KLEIN, F. A.; SAUL, D.; AIGNER, M.; HUBER, W.; MACKENSEN, A.; JITSCHIN, R.; MOUGIAKAKOS, D. CXCL12 promotes glycolytic reprogramming in acute myeloid leukemia cells via the CXCR4/mTOR axis. **Leukemia**, n. March, p. 1–4, 2016.
- BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M. J.; LIN, M. Z.; JUO, P.; HU, L. S.; ANDERSON, M. J.; ARDEN, K. C.; BLENIS, J.; GREENBERG, M. E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857–868, 1999.
- BUDD, S.; NICHOLLS, D. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J Neurochem**, v. 67, n. 6, p. 2282–2291, 1996.
- BUFFENSTEIN, R.; PINTO, M. Endocrine function in naturally long-living small mammals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, n. 1, p. 101–111, 2009.
- BURGERING, B. M. T. Decisions on life and death : FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB / Akt is off duty. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. June, p. 689–701, 2003.
- CAHILL, C. M.; TZIVION, G.; NASRIN, N.; OGG, S.; DORE, J.; RUVKUN, G.; ALEXANDER-BRIDGES, M. Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Inhibits DAF-16 DNA Binding and Function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 13402–13410, 2001.
- CALÌ, C.; MARCHALAND, J.; REGAZZI, R.; BEZZI, P. SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: Imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 198, n. 1–2, p. 82–91, 2008.
- CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 11, p. 1474–1492, 2017.
- CASTILHO, R. F.; HANSSON, O.; WARD, M. W.; BUDD, S. L.; NICHOLLS, D. G. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 24, p. 10277–10286, 1998.

- CAVALIER, M. C.; KIM, S. G.; NEAU, D.; LEE, Y. H. Molecular basis of the fructose-2,6-bisphosphatase reaction of PFKFB3: Transition state and the C-terminal function. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 4, p. 1143–1153, 2012.
- CHA, S.-K.; HU, M.-C.; KUROSU, H.; KURO-O, M.; MOE, O.; HUANG, C.-L. Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K(+) Excretion by Klotho. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 38–46, 2009.
- CHA, S.-K.; ORTEGA, B.; KUROSU, H.; ROSENBLATT, K. P.; KURO-O, M.; HUANG, C.-L. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 28, p. 9805–9810, 2008.
- CHARLES, A. Reaching out beyond the synapse: glial intercellular waves coordinate metabolism. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. December 2007, p. pe6, 2005.
- CHÂTEAU, M. T.; ARAIZ, C.; DESCAMPS, S.; GALAS, S. Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging**, v. 2, n. 9, p. 567–581, 2010.
- CHEN, C.-D.; SLOANE, J. A.; LI, H.; AYTAN, N.; GIANNARIS, E. L.; ZELDICH, E.; HINMAN, J. D.; DEDEOGLU, A.; ROSENE, D. L.; BANSAL, R.; LUEBKE, J. I.; KURO-O, M.; ABRAHAM, C. R. The Antiaging Protein Klotho Enhances Oligodendrocyte Maturation and Myelination of the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 1927–1939, 2013.
- CHEN, C.; PODVIN, S.; GILLESPIE, E.; LEEMAN, S. E.; ABRAHAM, C. R. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **PNAS**, v. 104, n. 50, p. 1–6, 2007.
- CHIAPPALONE, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. **Brain Research**, v. 1093, n. 1, p. 41–53, 2006.
- CHIU, S. L.; CHEN, C. M.; CLINE, H. T. Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo. **Neuron**, v. 58, n. 5, p. 708–719, 2008.
- CLARK, D. D.; SOKOLOFF, L. Regulation of Cerebral Metabolic Rate. In: SIEGEL, J. G.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISHER, S. K.; UHLER, M. D. (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th Editio ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 637–669.
- CLINTON, S. M.; GLOVER, M. E.; MALTARE, A.; LASZCZYK, A. M.; MEHI, S. J.; SIMMONS, R. K.; KING, G. D. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. **Brain Research**, v. 1527, p. 1–14, 2013.
- COPP, J.; MANNING, G.; HUNTER, T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. **Cancer research**, v. 69, n. 5, p. 1821–1827, 2009.
- COX, D. W. G.; BACHELARD, H. S. Attenuation of evoked field potentials from dentate granule cells by low glucose, pyruvate + malate, and sodium fluoride. **Brain Research**, v. 239, n. 2, p. 527–534, 1982.
- CSAJBÓK, É. A.; TAMÁS, G. Cerebral cortex: a target and source of insulin? **Diabetologia**, v. 59, n. 8, p. 1609–1615, 2016.
- DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.
- DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF)

activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 115, n. 1, p. 61–69, 1988.

DEL PESO, L.; GONZÁLEZ, V. M.; HERNÁNDEZ, R.; BARR, F. G.; NÚÑEZ, G. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. **Oncogene**, v. 18, n. 51, p. 7328–7333, 1999.

DIENEL, G. A. Brain Lactate Metabolism: The Discoveries and the Controversies. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1107–1138, 2012.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; GROS, C.; HIRRLINGER, J. Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 5, p. 1003–1008, 2001.

DUBAL, D. B.; YOKOYAMA, J. S.; ZHU, L.; BROESTL, L.; WORDEN, K.; WANG, D.; STURM, V. E.; KIM, D.; KLEIN, E.; YU, G. Q.; HO, K.; EILERTSON, K. E.; YU, L.; KURO-O, M.; DE JAGER, P. L.; COPPOLA, G.; SMALL, G. W.; BENNETT, D. A.; KRAMER, J. H.; ABRAHAM, C. R.; MILLER, B. L.; MUCKE, L. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. **Cell Reports**, v. 7, n. 4, p. 1065–1076, 2014.

DUMONT, M.; HO, D. J.; CALINGASAN, N. Y.; XU, H.; GIBSON, G.; BEAL, M. F. Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 7, p. 1019–1027, 2009.

FAN, J.; HITOSUGI, T.; CHUNG, T.-W.; XIE, J.; GE, Q.; GU, T.-L.; POLAKIEWICZ, R. D.; CHEN, G. Z.; BOGGON, T. J.; LONIAL, S.; KHURI, F. R.; KANG, S.; CHEN, J. Tyrosine Phosphorylation of Lactate Dehydrogenase A Is Important for NADH/NAD⁺ Redox Homeostasis in Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 24, p. 4938–4950, 2011.

FENG, J.; PARK, J.; CRON, P.; HESS, D.; HEMMING, B. A. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 41189–41196, 2004.

FERNANDEZ, A. M.; HERNANDEZ-GARZÓN, E.; PEREZ-DOMPER, P.; PEREZ-ALVAREZ, A.; MEDEROS, S.; MATSUI, T.; SANTI, A.; TRUEBA-SAIZ, A.; GARCÍA-GUERRA, L.; POSE-UTRILLA, J.; FIELITZ, J.; OLSON, E. N.; DE LA ROSA, R. F.; GARCIA, L. G.; POZO, M. A.; IGLESIAS, T.; ARAQUE, A.; SOYA, H.; PEREA, G.; MARTIN, E. D.; ALEMAN, I. T. Insulin regulates astrocytic glucose handling through cooperation with IGF-I. **Diabetes**, v. 66, n. 1, p. 64–74, 2017.

FINSTERWALD, C.; MAGISTRETTI, P.; LENGACHER, S. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 25, p. 3570–3581, 2015.

FLUTEAU, A.; INCE, P. G.; MINETT, T.; MATTHEWS, F. E.; BRAYNE, C.; GARWOOD, C. J.; RATCLIFFE, L. E.; MORGAN, S.; HEATH, P. R.; SHAW, P. J.; WHARTON, S. B.; SIMPSON, J. E. The nuclear retention of transcription factor FOXO3a correlates with a DNA damage response and increased glutamine synthetase expression by astrocytes suggesting a neuroprotective role in the ageing brain. **Neuroscience Letters**, v. 609, p. 11–17, 2015.

FOUQUET, M.; DESGRANGES, B.; LANDEAU, B.; DUCHESNAY, E.; MZENGE, F.; DE LA SAYETTE, V.; VIADER, F.; BARON, J. C.; EUSTACHE, F.; CHTELAT, G. Longitudinal brain metabolic changes from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimers disease. **Brain**, v. 132, n. 8, p. 2058–2067, 2009.

FRANKE, T. F. Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. **Science**, v. 275, n. 5300, p. 665–668, 1997.

GIANNAKOU, M. E.; PARTRIDGE, L. Role of insulin-like signalling in Drosophila lifespan. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 4, p. 180–188, 2007.

GOYAL, M. S.; VLASSENKO, A. G.; BLAZEY, T. M.; SU, Y.; COUTURE, L. E.; DURBIN, T. J.; BATEMAN, R. J.; BENZINGER, T. L. S.; MORRIS, J. C.; RAICHEL, M. E. Loss of Brain Aerobic Glycolysis in Normal Human

Aging. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 2, p. 353–360.e3, 2017.

GUARENTE, L.; KENYON, C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 255–262, 2000.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the Role of mTOR in Cancer. **Cancer Cell**, v. 12, n. 1, p. 9–22, 2007.

GUNSTAD, J.; LHOTSKY, A.; WENDELL, C. R.; FERRUCCI, L.; ZONDERMAN, A. B. Longitudinal examination of obesity and cognitive function: Results from the baltimore longitudinal study of aging. **Neuroepidemiology**, v. 34, n. 4, p. 222–229, 2010.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 203–210, 1989.

HASEL, P.; DANDO, O.; JIWAJI, Z.; BAXTER, P.; TODD, A. C.; HERON, S.; MÁRKUS, N. M.; MCQUEEN, J.; HAMPTON, D. W.; TORVELL, M.; TIWARI, S. S.; MCKAY, S.; ERASO-PICHOT, A.; ZORZANO, A.; MASGRAU, R.; GALEA, E.; CHANDRAN, S.; WYLLIE, D. J. A.; SIMPSON, T. I.; HARDINGHAM, G. E. Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. **Nature Communications**, v. 8, p. 15132, 2017.

HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 11, n. 24, p. 1975–1980, 2001.

HERRERA, E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S. B.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103–108, 2002.

HERRERO-MENDEZ, A.; ALMEIDA, A.; FERNÁNDEZ, E.; MAESTRE, C.; MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 6, p. 747–752, 2009.

HERTWECK, M.; GÖBEL, C.; BAUMEISTER, R. C. *elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 577–588, 2004.

HERTZ, L.; ZIELKE, H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: Astrocytes as stars of the show. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 12, p. 735–743, 2004.

HITOSUGI, T.; FAN, J.; CHUNG, T.-W.; LYTHGOE, K.; WANG, X.; XIE, J.; GE, Q.; GU, T.-L.; POLAKIEWICZ, R. D.; ROESEL, J. L.; CHEN, G. Z.; BOGGON, T. J.; LONIAL, S.; FU, H.; KHURI, F. R.; KANG, S.; CHEN, J. Tyrosine phosphorylation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase 1 is important for cancer metabolism. **Molecular cell**, v. 44, n. 6, p. 864–877, 2011.

HITOSUGI, T.; KANG, S.; VANDER HEIDEN, M. G.; CHUNG, T.-W.; ELF, S.; LYTHGOE, K.; DONG, S.; LONIAL, S.; WANG, X.; CHEN, G. Z.; XIE, J.; GU, T.-L.; POLAKIEWICZ, R. D.; ROESEL, J. L.; BOGGON, T. J.; KHURI, F. R.; GILLILAND, D. G.; CANTLEY, L. C.; KAUFMAN, J.; CHEN, J. Tyrosine Phosphorylation Inhibits PKM2 to Promote the Warburg Effect and Tumor Growth. **Science Signaling**, v. 2, n. 97, p. ra73-ra73, 2009.

HOLZENBERGER, M.; DUPONT, J.; DUCOS, B.; LENEUVE, P.; GÉLOËN, A.; EVEN, P. C.; CERVERA, P.; LE BOUC, Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 182–187, 2003.

HUA, Q. xin; NAKAGAWA, S. H.; WILKEN, J.; RAMOS, R. R.; JIA, W.; BASS, J.; WEISS, M. A. A divergent INS protein in *Caenorhabditis elegans* structurally resembles human insulin and activates the human insulin receptor. **Genes and Development**, v. 17, n. 7, p. 826–831, 2003.

HYDER, F.; PATEL, A. B.; GJEDDE, A.; ROTHMAN, D. L.; BEHAR, K. L.; SHULMAN, R. G. Neuronal–Glial

Glucose Oxidation and Glutamatergic–GABAergic Function. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, n. 7, p. 865–877, 2006.

ICHIKAWA, M.; MURAMOTO, K.; KOBAYASHI, K.; KAWAHARA, M.; KURODA, Y. Formation and maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: an electron microscopic study. **Neuroscience Research**, v. 16, n. 2, p. 95–103, 1993.

IIDA, R. H.; KANKO, S.; SUGA, T.; MORITO, M.; YAMANE, A. Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the klotho mouse, a mouse model for aging. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 348, n. 1–2, p. 89–98, 2011.

IMURA, A.; IWANO, A.; TOHYAMA, O.; TSUJI, Y.; NOZAKI, K.; HASHIMOTO, N.; FUJIMORI, T.; NABESHIMA, Y. I. Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS Letters**, v. 565, n. 1–3, p. 143–147, 2004.

INVIDIA, L.; SALVIOLI, S.; ALTILIA, S.; PIERINI, M.; PANOURGIA, M. P.; MONTI, D.; DE RANGO, F.; PASSARINO, G.; FRANCESCHI, C. The frequency of Klotho KL-VS polymorphism in a large Italian population, from young subjects to centenarians, suggests the presence of specific time windows for its effect. **Biogerontology**, v. 11, n. 1, p. 67–73, 2010.

IWAKURA, Y.; WANG, R.; INAMURA, N.; ARAKI, K.; HIGASHIYAMA, S.; TAKEI, N.; NAWA, H. Glutamate-dependent ectodomain shedding of neuregulin-1 type II precursors in rat forebrain neurons. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.

JUNGER, M. A.; RINTELEN, F.; STOCKER, H.; WASSERMAN, J. D.; VEGH, M.; RADIMERSKI, T.; GREENBERG, M. E.; HAFEN, E. The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. **J Biol**, v. 2, n. 3, p. 20, 2003.

KENYON, C. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 449–460, 2005.

KENYON, C.; CHANG, J.; GENSCHE, E.; RUDNER, A.; TABTIANG, R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. **Nature**, v. 366, n. 6454, p. 461–464, 1993.

KETY, S. S.; SCHMIDT, C. F. The determination of cerebral blood flow in man by use of nitrous oxide in low concentrations. **Am J Physiol**, v. 143, p. 53–56, 1945.

KIM, E. B.; FANG, X.; FUSHAN, A. A.; HUANG, Z.; LOBANOV, A. V.; HAN, L.; MARINO, S. M.; SUN, X.; TURANOV, A. A.; YANG, P.; YIM, S. H.; ZHAO, X.; KASAIKINA, M. V.; STOLETZKI, N.; PENG, C.; POLAK, P.; XIONG, Z.; KIEZUN, A.; ZHU, Y.; CHEN, Y.; KRYUKOV, G. V.; ZHANG, Q.; PESHKIN, L.; YANG, L.; BRONSON, R. T.; BUFFENSTEIN, R.; WANG, B.; HAN, C.; LI, Q.; CHEN, L.; ZHAO, W.; SUNYAEV, S. R.; PARK, T. J.; ZHANG, G.; WANG, J.; GLADYSHEV, V. N. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. **Nature**, v. 479, n. 7372, p. 223–227, 2011.

KIM, J.; LILLIEHOOK, C.; DUDAK, A.; PROX, J.; SAFTIG, P.; FEDEROFF, H. J.; LIM, S. T. Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 22919–22926, 2010.

KIM, S.-Y.; VOLSKY, D. J. PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. **BMC bioinformatics**, v. 6, p. 144, 2005.

KIMURA, K. D. daf-2, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in Caenorhabditis elegans. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 942–946, 1997.

KLASS, M.; HIRSH, D. Non-ageing developmental variant of Caenorhabditis elegans. **Nature**, v. 260, n. 5551, p. 523–525, 1976.

KOPS, G. J.; DE RUITER, N. D.; DE VRIES-SMITS, A. M.; POWELL, D. R.; BOS, J. L.; BURGERING, B. M. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. **Nature**, v. 398, n. April, p. 630–634, 1999.

- KOYAMA, D.; SATO, Y.; AIZAWA, M.; MAKI, T.; KUROSAWA, M.; KURO-O, M.; FURUKAWA, Y. Soluble α klotho as a candidate for the biomarker of aging. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 1019–1025, 2015.
- KRAMER, B.; BUFFENSTEIN, R. The pancreas of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): An ultrastructural and immunocytochemical study of the endocrine component of thermoneutral and cold acclimated animals. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 206–214, 2004.
- KURO-O, M. Klotho. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 2, p. 333–343, 2010.
- KURO-O, M.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; KAWAGUCHI, H.; SUGA, T.; UTSUGI, T.; OHYAMA, Y.; KURABAYASHI, M.; KANAME, T.; KUME, E.; IWASAKI, H.; IIDA, A.; SHIRAKI-IIDA, T.; NISHIKAWA, S.; NAGAI, R.; NABESHIMA, Y. I. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45–51, 1997.
- KUROSU, H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 2005.
- KUROSU, H.; OGAWA, Y.; MIYOSHI, M.; YAMAMOTO, M.; NANDI, A.; ROSENBLATT, K. P.; BAUM, M. G.; SCHIAVI, S.; HU, M. C.; MOE, O. W.; KURO-O, M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120–6123, 2006.
- LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at glance. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 10, p. 2135–2140, 2013.
- LEE, R. Y. N.; HENCH, J.; RUVKUN, G. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. **Current Biology**, v. 11, n. 24, p. 1950–1957, 2001.
- LEE, S. S.; LEE, R. Y. N.; FRASER, A. G.; KAMATH, R. S.; AHRINGER, J.; RUVKUN, G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. **Nature Genetics**, v. 33, n. 1, p. 40–48, 2003.
- LI, Q.; VO, H. T.; WANG, J.; FOX-QUICK, S.; DOBRUNZ, L. E.; KING, G. D. Klotho regulates CA1 hippocampal synaptic plasticity. **Neuroscience**, v. 347, p. 123–133, 2017.
- LI, S.-A.; WATANABE, M.; YAMADA, H.; NAGAI, A.; KINUTA, M.; TAKEI, K. Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. **Cell Structure and Function**, v. 29, n. 4, p. 91–99, 2004.
- LI, W.; KENNEDY, S. G.; RUVKUN, G. daf-28 encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. **Genes and Development**, v. 17, n. 7, p. 844–858, 2003.
- LI, X.; JIANG, Y.; MEISENHELDER, J.; YANG, W.; HAWKE, D. H.; ZHENG, Y.; XIA, Y.; ALDAPE, K.; HE, J.; HUNTER, T.; WANG, L.; LU, Z. Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. **Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 705–719, 2016.
- LIM, S. W.; JIN, L.; LUO, K.; JIN, J.; SHIN, Y. J.; HONG, S. Y.; YANG, C. W. Klotho enhances FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase expression by negatively regulating PI3K/AKT pathway during tacrolimus-induced oxidative stress. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 8, p. e2972, 2017.
- LIN, K.; HSIN, H.; LIBINA, N.; KENYON, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. **Nature genetics**, v. 28, n. 2, p. 139–145, 2001.
- LIN, Y.; KURO-O, M.; SUN, Z. Genetic deficiency of anti-aging gene klotho exacerbates early nephropathy in STZ-induced diabetes in male mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 10, p. 3855–3863, 2013.
- LIN, Y.; SUN, Z. Antiaging gene Klotho enhances glucose-induced insulin secretion by up-regulating plasma membrane levels of TRPV2 in MIN6 β -cells. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 3029–3039, 2012.
- LIU, F.; WU, S.; REN, H.; GU, J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation.

Nature Cell Biology, v. 13, n. 3, p. 254–262, 2011.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, 2013.

LUCHSINGER, J. A.; REITZ, C.; PATEL, B.; TANG, M.-X.; MANLY, J. J.; MAYEUX, R. Relation of Diabetes to Mild Cognitive Impairment. **Archives of Neurology**, v. 64, n. 4, p. 570, 2007.

MAEKAWA, Y.; ISHIKAWA, K.; YASUDA, O.; OGURO, R.; HANASAKI, H.; KIDA, I.; TAKEMURA, Y.; OHISHI, M.; KATSUYA, T.; RAKUGI, H. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. **Endocrine**, v. 35, n. 3, p. 341–346, 2009.

MAGISTRETTI, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2304–2311, 2006.

MAGISTRETTI, P. J. Brain Energy Metabolism. In: SQUIRE, L.; BERG, D.; BLOOM, F. (Ed.). **Fundamental Neuroscience**. 3rd Edition. San Diego: Academic Press, 2008. p. 271–293.

MAGWERE, T.; CHAPMAN, T.; PARTRIDGE, L. Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male *Drosophila melanogaster*. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59A, n. 1, p. 3–9, 2004.

MAIESE, K. Forkhead transcription factors: new considerations for Alzheimer's disease and dementia. **Journal of Translational Science**, v. 2, n. 4, p. 241–247, 2016.

MAJUMDAR, V.; CHRISTOPHER, R. Association of exonic variants of Klotho with metabolic syndrome in Asian Indians. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11–12, p. 1116–1121, 2011.

MAJUMDAR, V.; NAGARAJA, D.; CHRISTOPHER, R. Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 403, n. 3–4, p. 412–416, 2010.

MARTÍN, E. D.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; TREJO, J. L.; MARTÍN-ALDANA, J. A.; CANO JAIMEZ, M.; PONS, S.; ACOSTA UMANZOR, C.; MENES, L.; WHITE, M. F.; BURKS, D. J. IRS-2 deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 8, p. 1717–1727, 2012.

MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; SHIRAKI-IIDA, T.; NAGAI, R.; KURO-O, M.; NABESHIMA, Y. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626–630, 1998.

MCKENNA, M.; DIENEL, G.; SONNEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, H. S.; SCHOUSBOE, A. Energy Metabolism of the Brain. In: BRADY, S.; SIEGEL, G. (Ed.). **Basic Neurochemistry**. 8th Edition. Waltham: Academic Press, 2012. p. 200–226.

MCNAY, E. C.; ONG, C. T.; MCCRIMMON, R. J.; CRESSWELL, J.; BOGAN, J. S.; SHERWIN, R. S. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 93, n. 4, p. 546–553, 2010.

MELÉNDEZ, A.; TALLÓCZY, Z.; SEAMAN, M.; ESKELINEN, E.; DAVID, H.; LEVINE, B.; MELENDEZ, A.; TALLFICY, Z. Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in *C. elegans*. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1387–1391, 2009.

MELEY, D.; BAUVY, C.; HOUBEN-WEERTS, J. H. P. M.; DUBBELHUIS, P. F.; HELMOND, M. T. J.; CODOGNO, P.; MEIJER, A. J. AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34870–34879, 2006.

MIELKE, J. G.; NICOLITCH, K.; AVELLANEDA, V.; EARLAM, K.; AHUJA, T.; MEALING, G.; MESSIER, C. Longitudinal study of the effects of a high-fat diet on glucose regulation, hippocampal function, and cerebral insulin sensitivity in C57BL/6 mice. **Behav Brain Res**, v. 175, n. 2, p. 374–382, 2006.

MORRIS, J. Z.; TISSENBAUM, H. A.; RUVKUN, G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member

- regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 536–539, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MURPHY, C. T.; MCCARROLL, S. A.; BARGMANN, C. I.; FRASER, A.; KAMATH, R. S.; AHRINGER, J.; LI, H.; KENYON, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277–283, 2003.
- NAGAI, T.; YAMADA, K.; KIM, H. C.; KIM, Y. S.; NODA, Y.; IMURA, A.; NABESHIMA, Y. ichi; NABESHIMA, T. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 50–52, 2003.
- NAGASE, M.; TAKAHASHI, Y.; WATABE, A. M.; KUBO, Y.; KATO, F. On-Site Energy Supply at Synapses through Monocarboxylate Transporters Maintains Excitatory Synaptic Transmission. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2605–2617, 2014.
- NAKAE, J.; PARK, B. C.; ACCILI, D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a wortmannin-sensitive pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 15982–15985, 1999.
- NAVÉ, B. T.; OUWENS, D. M.; WITHERS, D. J.; ALESSI, D. R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: Identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. **Biochemical Journal**, v. 344, n. 2, p. 427–431, 1999.
- NEUSCH, C.; ROZENGURT, N.; JACOBS, R. E.; LESTER, H. A.; KOFUJI, P. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5429–5438, 2001.
- NICHOLLS, D. G.; BUDD, S. L. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1366, n. 1–2, p. 97–112, 1998.
- NODA, T.; OHSUMI, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 3963–3966, 1998.
- O'BRIEN, J.; KLA, K. M.; HOPKINS, I. B.; MALECKI, E. A.; MCKENNA, M. C. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 4–5, p. 597–607, 2007.
- OGG, S.; RUVKUN, G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. **Molecular Cell**, v. 2, n. 6, p. 887–893, 1998.
- OH, S. W.; MUKHOPADHYAY, A.; DIXIT, B. L.; RAHA, T.; GREEN, M. R.; TISSENBAUM, H. A. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. **Nat.Genet.**, v. 38, n. 2, p. 251–257, 2006.
- OHYAMA, Y.; KURABAYASHI, M.; MASUDA, H.; NAKAMURA, T.; AIHARA, Y.; KANAME, T.; SUGA, T.; ARAI, M.; AIZAWA, H.; MATSUMURA, Y.; KURO-O, M.; NABESHIMA, Y. I.; NAGAIL, R. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 251, n. 3, p. 920–925, 1998.
- PARADIS, D.; NADEAU, D. Quantitative determination of lactic acid in cell culture media and biological fluids: Optimization by automatic rate analysis. **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 7, n. 4, p. 175–180, 1982.
- PARADIS, S.; AILION, M.; TOKER, A.; THOMAS, J. H.; RUVKUN, G. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Genes and Development**, v. 13, n. 11, p. 1438–1452, 1999.
- PARADIS, S.; RUVKUN, G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from

age-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. **Genes and Development**, v. 12, n. 16, p. 2488–2498, 1998.

PARK, S.-J.; SHIN, E.-J.; MIN, S. S.; AN, J.; LI, Z.; HEE CHUNG, Y.; HOON JEONG, J.; BACH, J.-H.; NAH, S.-Y.; KIM, W.-K.; JANG, C.-G.; KIM, Y.-S.; NABESHIMA, Y.; NABESHIMA, T.; KIM, H.-C. Inactivation of JAK2/STAT3 Signaling Axis and Downregulation of M1 mAChR Cause Cognitive Impairment in *klotho* Mutant Mice, a Genetic Model of Aging. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1426–1437, 2013.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 1994.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Sweet Sixteen for ANLS. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1152–1166, 2012.

PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PIERCE, S. B.; COSTA, M.; WISOTZKEY, R.; DEVADHAR, S.; HOMBURGER, S. A.; BUCHMAN, A. R.; FERGUSON, K. C.; HELLER, J.; PLATT, D. M.; PASQUINELLI, A. a; LIU, L. X.; DOBERSTEIN, S. K.; RUVKUN, G. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. **Genes & development**, v. 15, n. 6, p. 672–686, 2001.

POW, D. V. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to aminoadipic acid, a selectively transported substrate. **Glia**, v. 34, n. 1, p. 27–38, 2001.

PUIG, O.; MARR, M. T. M.; RUHF, M. L.; TJIAN, R. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. **Genes & development**, v. 17, n. 16, p. 2006–2020, 2003.

QUICK, K. L.; ALI, S. S.; ARCH, R.; XIONG, C.; WOZNIAK, D.; DUGAN, L. L. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 1, p. 117–128, 2008.

RAZZAQUE, M. S. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. **The FASEB Journal**, 2006.

RENA, G.; SHAODONG, G.; CICHY, S. C.; UNTERMAN, T. G.; COHEN, P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 17179–17183, 1999.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P.; FERNANDEZ, E.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J. P. Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 10, p. 1582–1589, 2012.

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. **Journal of neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 662–668, 1996.

ROSS, J. M.; ÖBERG, J.; BRENÉ, S.; COPPOTELLI, G.; TERZIOGLU, M.; PERNOLD, K.; GOINY, M.; STINIKOV, R.; KEHR, J.; ALEKSANDRA, T.; LRSSON, N.-G.; HOFFER, B. J.; OLSON, L. High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 20087–20092, 2010.

ROTH, G. S.; LANE, M. a; INGRAM, D. K.; MATTISON, J. a; ELAHI, D.; TOBIN, J. D.; MULLER, D.; METTER, E. J. Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 811, 2002.

SAEZ, I.; VILCHEZ, D. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Agerelated Diseases. **Current Genomics**, v. 15, n. 1, p. 38–51, 2014.

- SAN MARTÍN, A.; CEBALLO, S.; RUMINOT, I.; LERCHUNDI, R.; FROMMER, W. B.; BARROS, L. F. A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- SÁNCHEZ-ABARCA, L. I.; TABERNEIRO, A.; MEDINA, J. M. Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. **GLIA**, v. 36, n. 3, p. 321–329, 2001.
- SARBASSOV, D. D. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, 18 fev. 2005.
- SCOTT, R. C.; SCHULDINER, O.; NEUFELD, T. P. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. **Developmental Cell**, v. 7, n. 2, p. 167–178, 2004.
- SELMAN, C.; LINGARD, S.; CHOUDHURY, A. I.; BATTERHAM, R. L.; CLARET, M.; CLEMENTS, M.; RAMADANI, F.; OKKENHAUG, K.; SCHUSTER, E.; BLANC, E.; PIPER, M. D.; AL-QASSAB, H.; SPEAKMAN, J. R.; CARMIGNAC, D.; ROBINSON, I. C. A.; THORNTON, J. M.; GEMS, D.; PARTRIDGE, L.; WITHERS, D. J. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 807–818, 2007.
- SELMAN, C.; PARTRIDGE, L.; WITHERS, D. J. Replication of extended lifespan phenotype in mice with deletion of insulin receptor substrate 1. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.
- SEMBA, R. D.; MOGHEKAR, A. R.; HU, J.; SUN, K.; TURNER, R.; FERRUCCI, L.; O'BRIEN, R. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 37–40, 2014.
- SHAODONG, G.; RENA, G.; CICHY, S.; XIAOWEI, H.; COHEN, P.; UNTERMAN, T. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 17184–17192, 1999.
- SHARDELL, M.; SEMBA, R. D.; ROSANO, C.; KALYANI, R. R.; BANDINELLI, S.; CHIA, C. W.; FERRUCCI, L. Plasma Klotho and Cognitive Decline in Older Adults: Findings From the InCHIANTI Study. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 677–682, 2016.
- SHERMAN, P. W.; JARVIS, J. U. M. Extraordinary life spans of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). **Journal of Zoology**, v. 258, n. 3, p. S0952836902001437, 2002.
- SIBSON, N. R.; DHANKHAR, A.; MASON, G. F.; ROTHMAN, D. L.; BEHAR, K. L.; SHULMAN, R. G. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. **Neurobiology**, v. 95, n. January, p. 316–321, 1998.
- SMITH, K. M.; MARAGNOLI, M. E.; PHULL, P. M.; TRAN, K. M.; CHOUBEY, L.; VACCARINO, F. M. Fgfr1 inactivation in the mouse telencephalon results in impaired maturation of interneurons expressing parvalbumin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- SPERLING, R. A.; DICKERSON, B. C.; PIHLAJAMAKI, M.; VANNINI, P.; LAVIOLETTE, P. S.; VITOLO, O. V.; HEDDEN, T.; BECKER, J. A.; RENTZ, D. M.; SELKOE, D. J.; JOHNSON, K. A. Functional alterations in memory networks in early alzheimer's disease. **NeuroMolecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 27–43, 2010.
- STRANAHAN, A. M.; ARUMUGAM, T. V.; CUTLER, R. G.; LEE, K.; EGAN, J. M.; MATTSON, M. P. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 309–317, 2008.
- SUN, H.; GAO, Y.; LU, K.; ZHAO, G.; LI, X.; LI, Z.; CHANG, H. Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ β -catenin signaling pathway. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 1, p. 307, 2015.
- SUZUKI, A.; STERN, S. A.; BOZDAGI, O.; HUNTLEY, G. W.; WALKER, R. H.; MAGISTRETTI, P. J.; ALBERINI, C. M. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. **Cell**, v. 144, n.

5, p. 810–823, 2011.

TAKAISHI, H.; KONISHI, H.; MATSUZAKI, H.; ONO, Y.; SHIRAI, Y.; SAITO, N.; KITAMURA, T.; OGAWA, W.; KASUGA, M.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 21, p. 11836–11841, 1999.

TANG, E. D.; NUÑEZ, G.; BARR, F. G.; GUAN, K. L. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 16741–16746, 1999.

TATAR, M. A Mutant Drosophila Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. **Science**, v. 292, n. 5514, p. 107–110, 2001.

TORO, P.; SCHÖNKNECHT, P.; SCHRÖDER, J. Type II diabetes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: results from a prospective population-based study in Germany. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, p. 687–691, 2009.

TOTH, A. B.; TERAUCHI, A.; ZHANG, L. Y.; JOHNSON-VENKATESH, E. M.; LARSEN, D. J.; SUTTON, M. A.; UMEMORI, H. Synapse maturation by activity-dependent ectodomain shedding of SIRP α . **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 1417–1425, 2013.

TOWER, J.; ARBEITMAN, M. The genetics of gender and life span. **Journal of Biology**, v. 8, n. 4, p. 38, 2009.

TRAVES, P. G.; DE ATAURI, P.; MARIN, S.; PIMENTEL-SANTILLANA, M.; RODRIGUEZ-PRADOS, J.-C.; MARIN DE MAS, I.; SELIVANOV, V. A.; MARTIN-SANZ, P.; BOSCA, L.; CASCANTE, M. Relevance of the MEK/ERK Signaling Pathway in the Metabolism of Activated Macrophages: A Metabolomic Approach. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1402–1410, 2012.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 877–885, 1996.

UNGER, J.; MCNEILL, T. H.; MOXLEY, R. T.; WHITE, M.; MOSS, A.; LIVINGSTON, J. N. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. **Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 143–157, 1989.

URAKAWA, I.; YAMAZAKI, Y.; SHIMADA, T.; IJIMA, K.; HASEGAWA, H.; OKAWA, K.; FUJITA, T.; FUKUMOTO, S.; YAMASHITA, T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 770–774, 2006.

UTSUGI, T.; OHNO, T.; OHYAMA, Y.; UCHIYAMA, T.; SAITO, Y.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; ITOH, H.; KURABAYASHI, M.; KAWAZU, S.; TOMONO, S.; OKA, Y.; SUGA, T.; KURO-O, M.; NABESHIMA, Y.; NAGAI, R. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 9, p. 1118–1123, 2000.

VAISHNAVI, S. N.; VLASSENKO, A. G.; RUNDLE, M. M.; SNYDER, A. Z.; MINTUN, M. A.; RAICHLE, M. E. Regional aerobic glycolysis in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 41, p. 17757–17762, 2010.

VÉGA, C.; POITRY-YAMATE, C. L.; JIROUNEK, P.; TSACOPOULOS, M.; COLES, J. a. Lactate is released and taken up by isolated rabbit vagus nerve during aerobic metabolism. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 1, p. 330–337, 1998.

VLASSENKO, A. G.; VAISHNAVI, S. N.; COUTURE, L.; SACCO, D.; SHANNON, B. J.; MACH, R. H.; MORRIS, J. C.; RAICHLE, M. E.; MINTUN, M. A. Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 41, p. 17763–17767, 2010.

WALZ, W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. **Neurochemistry International**, v. 36, n. 4–5, p. 291–300, 2000.

- WINOCUR, G.; GREENWOOD, C. E. The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats. **Behavioural brain research**, v. 101, n. 2, p. 153–161, 1999.
- XIAO, N.; ZHANG, Y.; ZHENG, Q.; GU, J. Klotho is a serum factor related to human aging. **Chinese medical journal**, v. 117, n. 5, p. 742–747, 2004.
- XIE, B.; CHEN, J.; LIU, B.; ZHAN, J. Klotho acts as a tumor suppressor in cancers. **Pathology and Oncology Research**, v. 19, n. 4, p. 611–617, 2013a.
- XIE, B.; ZHOU, J.; SHU, G.; LIU, D.-C.; ZHOU, J.; CHEN, J.; YUAN, L. Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 18, 2013b.
- YAMAMOTO, M.; CLARK, J. D.; PASTOR, J. V.; GURNANI, P.; NANDI, A.; KUROSU, H.; MIYOSHI, M.; OGAWA, Y.; CASTRILLON, D. H.; ROSENBLATT, K. P.; KURO-O, M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 38029–38034, 2005.
- YOKOYAMA, J. S.; MARX, G.; BROWN, J. A.; BONHAM, L. W.; WANG, D.; COPPOLA, G.; SEELEY, W. W.; ROSEN, H. J.; MILLER, B. L.; KRAMER, J. H.; DUBAL, D. B. Systemic klotho is associated with KLOTHO variation and predicts intrinsic cortical connectivity in healthy human aging. **Brain Imaging and Behavior**, v. 11, n. 2, p. 391–400, 2017.
- YUNG, H. W.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BURTON, G. J. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.
- ZANELLA, F.; ROSADO, A.; GARCIA, B.; CARNERO, A.; LINK, W. Using multiplexed regulation of luciferase activity and GFP translocation to screen for FOXO modulators. **BMC cell biology**, v. 10, n. 1, p. 14, 2009.
- ZELDICH, E.; CHEN, C. Di; COLVIN, T. A.; BOVE-FENDERSON, E. A.; LIANG, J.; TUCKER ZHOU, T. B.; HARRIS, D. A.; ABRAHAM, C. R. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24700–24715, 2014.
- ZHOU, X.; FANG, X.; JIANG, Y.; GENG, L.; LI, X.; LI, Y.; LU, K.; LI, P.; LV, X.; WANG, X. Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 37, 2017.
- ZHU, Y.; XU, L.; ZHANG, J.; XU, W.; LIU, Y.; YIN, H.; LV, T.; AN, H.; LIU, L.; HE, H.; ZHANG, H.; LIU, J.; XU, J.; LIN, Z. Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3 β /Snail signaling in renal cell carcinoma. **Cancer Science**, v. 104, n. 6, p. 663–671, 2013.
- ZOU, Y.-R.; KOTTMANN, A. H.; KURODA, M.; TANIUCHI, I.; LITTMAN, D. R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 595–599, 1998.