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

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 encéfalo, 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 hipocampais 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

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 nemátodo 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 nemátodo 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 nemátodo 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 glutamatérgica. 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 antienvelhecimento 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.

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.

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.; THIBAULT, O.; THIBAULT, 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- α (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.; MATTSO, 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-GARZ??N, E.; PEREZ-DOMPER, P.; PEREZ-ALVAREZ, A.; MEDEROS, S.; MATSUI, T.; SANTI, A.; TRUEBA-SAI, A.; GARC??A-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.; LENEUE, 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.; GENSCH, 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 FKHRL1 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- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B 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 Metabolsim. In: SQUIRE, L.; BERG, D.; BLOOM, F. (Ed.). **Fundamental Neuroscience**. 3rd Editio ed. 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-PEREZ, A.; TREJO, J. L.; MARTIN-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 Editio ed. 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.

PFAFFL, 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 Age-related 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.; RAICHEL, 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.