VINICIUS WATANABE NAKAO

**EFEITOS DA PROTEÍNA KLOTHO NA MODULAÇÃO DE PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS DA GLIA FRENTE AO ESTÍMULO PRÓ-
INFLAMATÓRIO LPS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo
2019

RESUMO

NAKAO, VW. Efeitos da Proteína Klotho na Modulação de Processos Inflamatórios em Células da Glia frente ao Estímulo Pró-Inflamatório LPS. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

A Klotho é uma proteína anti-envelhecimento, sua superexpressão aumenta por volta de 30% a expectativa de vida em camundongos. Animais hipomórficos para Klotho apresentam uma diminuição acentuada da expectativa de vida, além do surgimento precoce de doenças e síndromes relacionadas ao envelhecimento. A Klotho possui uma ação anti-inflamatória e protetora em células renais através da inibição da ativação de NF- κ B e a subsequente produção de citocinas inflamatórias em resposta ao estímulo de TNF- α . Além disto, estudos tem demonstrado o efeito neuroprotetor da Klotho em diferentes condições em que há a presença da neuroinflamação, como o envelhecimento, modelos animais de doenças neurodegenerativas e a lesão cerebral isquêmica. Diante disso, objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da proteína Klotho em cultura primária de células da glia frente ao estímulo pró-inflamatório LPS. As células da glia foram pré-tratadas com Klotho e estimuladas com LPS, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas pró-inflamatórias. O meio condicionado das células da glia (MCG: proveniente do tratamento com LPS; MCG-KL: proveniente do pré-tratamento com Klotho e estímulo com LPS) foi utilizado em cultura de neurônio para avaliar se o MCG é capaz de induzir morte neuronal e se o MCG-KL é capaz de reverter esse efeito. Foi observado que o LPS induz as células da glia a produzirem mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ e que o MCG levou a um aumento da morte neuronal. O pré-tratamento com a proteína Klotho diminuiu a produção de TNF- α e IL-6, e o MCG-KL foi capaz de reverter a morte neuronal causada pelo MCG. Esses dados sugerem, um efeito anti-inflamatório e neuroprotetor da proteína Klotho no SNC. Evidenciado assim, um potencial terapêutico da Klotho em processos patológicos que possuem um componente neuroinflamatório.

Palavras-chave: Klotho. Neuroinflamação. Glia. LPS. Neurônio.

ABSTRACT

NAKAO, VW. Effects of Klotho Protein on the Modulation of Inflammatory Processes in Glial Cells against the Pro-Inflammatory Stimulus LPS. 2019. 72 s. Dissertation (Master thesis in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Klotho is an anti-aging protein, and its overexpression extends the life span in mice. Klotho hypomorphic animals have a marked decrease in life expectancy, in addition to the early onset of aging-related diseases and syndromes. Klotho has an anti-inflammatory and protective action on renal cells by inhibiting NF- κ B activation and subsequent production of inflammatory cytokines in response to TNF- α stimulation. Furthermore, studies have shown the neuroprotective effect of Klotho on different conditions in which neuroinflammation is present, such as aging, animal models of neurodegenerative disease and ischemic brain injury. Therefore, this work aimed to evaluate the effects of Klotho protein on primary glial cell culture against the pro-inflammatory stimulus LPS. Glial cells were pretreated with Klotho and stimulated with LPS. The supernatant was collected for proinflammatory cytokine analysis. Glial conditioned medium (GCM: from LPS treatment; GCM-KL: from Klotho pretreatment and LPS stimulation) was used in neuron culture to assess whether GCM is capable of inducing neuronal death and if GCM-KL can reverse this effect. LPS induced glial cells to produce proinflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ , and GCM increased neuronal death. Pretreatment with Klotho decreased TNF- α and IL-6 production, and MCG-KL was able to reverse neuronal death caused by GCM. These data suggest an anti-inflammatory and neuroprotective effect of Klotho protein in the CNS. This work demonstrated a therapeutic potential of Klotho in pathological processes that have a neuroinflammatory component.

Keywords: Klotho. Neuroinflammation. Glial cells. LPS. Neuron.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neuroinflamação

A neuroinflamação, termo utilizado para descrever a inflamação do sistema nervoso central (SNC), envolve um conjunto de respostas bioquímicas e celulares que pode ser desencadeado por uma variedade de estímulos, como infecções, estresse, lesões ao cérebro, dentre outros. Tem como objetivo proteger a região de patógenos, estímulos nocivos e promover o reparo do tecido lesado. Embora a neuroinflamação seja iniciada para exercer efeitos benéficos, dependendo do grau e duração da inflamação, que é influenciada pelo contexto, natureza, intensidade e tempo do estímulo, ela pode ser detrimental. Isto porque, a neuroinflamação pode desencadear diferentes respostas inflamatórias e os mesmos fatores gerados para lidar com o estímulo inicial, quando exacerbados e/ou produzidos de forma crônica podem levar ou agravar um dano tecidual. Tanto que, comumente, o termo possui uma conotação negativa.

Em muitas doenças ou lesões que afetam o SNC possuem um componente inflamatório que pode estar relacionado a um dano tecidual e disfunções cognitivas. No envelhecimento há um desequilíbrio dos processos pró e anti-inflamatórios que resulta em um estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau, denominado de *inflammaging* por Franceschi et al. (FRANCESCHI et al., 2000). A desregulação da inflamação no cérebro está associada não apenas com o déficit cognitivo relacionado ao envelhecimento (OWNBY, 2010), mas também na patogênese e na progressão de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla (KEMPURAJ et al., 2016). Já o traumatismo cranioencefálico e o acidente vascular cerebral isquêmico ativam processos inflamatórios que, quando exacerbados, podem levar a um aumento do dano cerebral (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008; LOZANO et al., 2015).

As respostas neuroinflamatórias são mediadas por citocinas, quimiocinas, segundos mensageiros e espécies reativas de oxigênio que são produzidas no SNC, principalmente, pelas células da glia, células endoteliais e células imunes infiltrantes (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). Além de atuarem como células de suporte para os neurônios, as células da glia possuem papel importante na homeostasia e na

imunidade do SNC. No SNC, as células da glia podem ser divididas em 4 tipos: astrócitos, microglia, oligodendrócitos e as células endimárias, sendo que as células mais importantes do ponto de vista inflamatório são a microglia e os astrócitos.

A microglia e os astrócitos são células da imunidade inata residentes do cérebro e podem detectar mudanças no seu microambiente por meio de receptores de membrana como os receptores de reconhecimento de padrão (PRR). Por meio dos PRRs, essas células são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Dentre os PRRs, temos os receptores do tipo Toll (TLRs) que reconhecem uma variedade de moléculas endógenas e exógenas, e possuem papel importante na sinalização no SNC assim como na resposta do sistema imune.

A ativação tanto da microglia como dos astrócitos constitui uma característica importante da neuroinflamação. A ativação dessas células frente a um estímulo inflamatório pode ter efeitos benéficos ou negativos dependendo da intensidade e duração da resposta. Em condições patológicas como doenças neurodegenerativas há uma desregulação na atividade da microglia e dos astrócitos, que as desviam de suas funções fisiológicas, benéficas e essas células passam a secretar de forma crônica mediadores pró-inflamatórios que podem levar a disfunção neural e morte celular (HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014).

As células da microglia são consideradas como o conjunto de macrófagos residentes do cérebro e são as principais células da imunidade inata do SNC (HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014). A microglia é derivada de células progenitoras do saco vitelino (GINHOUX et al., 2010). Diferentemente de outros macrófagos residentes de tecidos, a reposição da microglia adulta não é feita pela medula óssea mas pela auto-renovação de um *pool* intrínseco de microglia (AJAMI et al., 2007; HUANG et al., 2018).

Em condições fisiológicas, a microglia está em estado de “repouso”, caracterizado por uma morfologia ramificada com muitos prolongamentos que estão constantemente monitorando o ambiente de patógenos e estímulos nocivos (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Após sua ativação, a microglia sofre alterações morfológicas, há uma retração de seus prolongamentos, aumento do corpo celular, passando de uma forma ramificada para uma forma ameboide (DAVALOS et al., 2005; KETTENMANN et al., 2011). A microglia

ativada também sofre alterações na expressão genica, no perfil de moléculas secretadas e há um aumento na sua atividade fagocítica (LI; BARRES, 2018). Sua ativação pode levar a um fenótipo pró-inflamatório, geralmente associado aos efeitos neurotóxicos da ativação da microglia, ou a um fenótipo anti-inflamatório, normalmente associado aos efeitos protetores. Importante ressaltar que a ativação da microglia é um processo dinâmico no qual há uma ampla gama de respostas com diferentes produções de citocinas e diferentes estados pró e anti-inflamatórios.

Os astrócitos estão integrados nas redes neurais e são essenciais para a homeostase do SNC. Algumas de suas funções incluem regulação de íons e neurotransmissores na fenda sináptica, fornecer suporte metabólico aos neurônios e participar no controle do fluxo sanguíneo do SNC (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Além disso, os astrócitos são uma das células que constituem a barreira hematoencefálica, barreira de proteção do SNC que limita a entrada de certas moléculas conforme sua polaridade e tamanho.

Em condições patológicas do SNC, os astrócitos passam a responder de forma reativa, na qual há alterações moleculares, celulares e funcionais (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Essas alterações podem levar os astrócitos reativos a produzirem tanto mediadores pró como anti-inflamatórios. Assim como na microglia, a resposta dos astrócitos reativos varia de acordo com o estímulo e podem ter efeitos benéficos ou detrimenais dependendo do tipo, duração e intensidade da resposta. Além disso, os astrócitos reativos são um dos constituintes e participam da formação das cicatrizes gliais (FITCH; SILVER, 2008).

1.2 LPS e o modelo de neuroinflamação

Como dito anteriormente, a neuroinflamação está presente nas doenças e nas lesões que afetam o SNC e ela pode ter tanto efeitos benéficos como detrimenais. Logo, é de suma importância entender os mecanismos celulares e moleculares que regulam a neuroinflamação.

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que é capaz de induzir respostas inflamatórias, sendo assim, uma importante ferramenta para o estudo dos processos inflamatórios. Seu principal alvo é o receptor do tipo Toll 4 (TLR4). No SNC, o TLR4 é prioritariamente expresso na microglia (GORINA et al., 2011).

O LPS é liberado quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa. Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria gram-negativa como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta do mesmo, inicia-se uma série de respostas.

O LPS liga-se a proteína ligadora de LPS (LBP), formando o complexo LPS:LBP. O LBP facilita a transferência do LPS para o CD14, presente na superfície de membrana dos monócitos e que também existe na forma solúvel (LU; YEH; OHASHI, 2008). O CD14 apresenta o LPS ao complexo TLR-4-MD-2 (PARK; LEE, 2013), iniciando a ativação celular. O MD-2 é um coreceptor do TLR4 que é essencial para o reconhecimento do LPS (SHIMAZU et al., 1999). Após a ligação do LPS a esse complexo é iniciada a geração do sinal transmembranar para o núcleo, ocorrendo uma série de reações em cascata até a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que ativa os genes que codificam proteínas envolvidas na defesa contra a infecção, como as citocinas pró-inflamatórias (ADEREM; ULEVITCH, 2000). Entre as citocinas pró-inflamatórias ativadas e liberadas a partir do contato com o LPS, destacam-se o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) além de algumas outras (MILLER; ERNST; BADER, 2005).

O LPS é capaz de ativar o TLR4 da microglia e fazer com que ela produza e secrete citocinas pró-inflamatórias que podem levar a ativação dos astrócitos e amplificar a resposta inflamatória (SAIJO et al., 2009). Elas também podem ser neurotóxicas, agindo diretamente nos neurônios e levar a morte neuronal (GLASS et al., 2010).

1.3 Klotho

O gene da proteína Klotho foi descoberto fortuitamente em 1997, quando Kuro-o e colaboradores estavam tentando produzir camundongos transgênicos que superexpressassem a isoforma 1 do trocador de Na⁺/H⁺ de coelho. Uma mutação insercional desse transgene na região promotora do gene da Klotho, resultou em um alelo hipomórfico, que em homozigose levou esses camundongos a apresentarem uma síndrome de envelhecimento acelerado (KURO-O et al., 1997). Esses animais crescem normalmente até a 3-4 semana, após esse período começa a ocorrer o surgimento precoce de doenças relacionadas ao envelhecimento como arteriosclerose, osteoporose, infertilidade, atrofia da pele, enfisema pulmonar,

calcificação vascular, degeneração neural e esses animais apresentam uma diminuição acentuada na expectativa de vida, com uma morte prematura por volta de 8-9 semanas (KURO-O et al., 1997).

Em camundongos, seu gene codifica uma proteína transmembranar *single pass* do tipo I, composta por 1014 aminoácidos com peso molecular de 130 kDa (KURO-O et al., 1997; OHYAMA et al., 1998; WANG; SUN, 2009). A Klotho transmembranar possui um domínio intracelular curto e dois domínios extracelulares, conhecidos por KL1 e KL2, cujas sequências apresentam fraca homologia com as β -glicosidades (KURO-O et al., 1997). Estes domínios extracelulares podem ser clivados pelas proteases desintegrina A e metaloproteinase 10 (ADAM10), desintegrina A e metaloproteinase 17 (ADAM17) e a β -secretase 1 (BACE1) e atuar como fator humoral, podendo ser detectados no sangue, urina e fluido cerebrospinal (IMURA et al., 2004; CHEN et al., 2007; BLOCH et al., 2009). Além disso, por meio de um *splicing* alternativo, ocorre também a formação de uma proteína secretada com um único domínio KL1 (OHYAMA et al., 1998). Desta forma, podem ser encontradas duas formas da proteína Klotho: uma transmembranar e uma solúvel, esta última composta tanto pela Klotho clivada como pela Klotho secretada (Figura 1).

O gene da Klotho de camundongos é altamente homóloga a de ratos, o cDNA e a proteína Klotho de camundongo possuem 93 e 94% de homologia, respectivamente, com a de rato (OHYAMA et al., 1998). Já o cDNA e a proteína Klotho de humanos têm por volta de 80% de homologia com a de ratos e camundongos (OHYAMA et al., 1998). Apesar de seus genes apresentarem alta homologia, existem diferenças na expressão da Klotho entre as espécies. Em camundongos a expressão da forma transmembranar da Klotho predomina sobre a secretada (SHIRAKI-IIDA et al., 1998), já em humanos a principal forma de expressão da Klotho é a forma secretada (MATSUMURA et al., 1998). A forma secretada da proteína Klotho não foi encontrada em ratos (OHYAMA et al., 1998).

Figura 1. Isoformas da Klotho. A proteína klotho pode ser encontrada tanto na forma de membrana quanto na forma solúvel, a qual pode ser decorrente da clivagem da klotho de membrana pela ADAM 10, ADAM 17 e BACE1 ou de um *splicing* alternativo do RNA mensageiro. Fonte: Adaptado de Cararo-Lopes et al., 2017 (CARARO-LOPES et al., 2017).

Embora a mutação no gene da Klotho leve ao aparecimento de múltiplas doenças e síndromes relacionadas ao envelhecimento em diversos órgãos e tecidos, sua expressão é limitada a algumas regiões, demonstrando a importância dos efeitos pleiotrópicos da forma solúvel da Klotho. Em camundongos a Klotho é prioritariamente expressa nos rins e no plexo coroide, e minoritariamente expresso em outras regiões como hipófise, músculo esquelético, pâncreas, testículos e ovário (KURO-O et al., 1997). Já em ratos sua expressão também ocorre principalmente nos rins e é pouco expressa no cérebro, pulmões, intestino e ovários (OHYAMA et al., 1998). Em humanos a Klotho é expressa predominantemente nos rins, e pode ser detectada na placenta, próstata, intestino delgado e no cérebro (MATSUMURA et al., 1998; LIM et al., 2015).

A expressão da Klotho é influenciada por processos fisiológicos e patológicos. Ratos com hipertensão espontânea, 5/6 nefrectomizado e diabetes tipo 1 tiveram os níveis de mRNA de Klotho diminuída (AIZAWA et al., 1998). Ainda, fatores endógenos como a insulina e o glutamato são capazes de modular a expressão da Klotho em

neurônios de camundongos (MAZUCANTI et al., 2019). Além disso, a expressão da Klotho aumenta significativamente após o nascimento e na idade adulta (OHYAMA et al., 1998; CLINTON et al., 2013) e há uma diminuição no envelhecimento (XIAO et al., 2004; DUCE et al., 2008; YAMAZAKI et al., 2010; KING; ROSENE; ABRAHAM, 2012).

A superexpressão da Klotho aumenta por volta de 30% a expectativa de vida de camundongos (KUROSU et al., 2005). Em humanos, foi descoberta uma variante polimórfica do gene da proteína Klotho, KL-VS, em que a heterozigose tem sido associada com aumento da expectativa de vida em idosos com mais de 75 anos, diminuição de eventos cardiovasculares (ARKING et al., 2002, 2005), aumento da massa cortical e melhora cognitiva (DUBAL et al., 2014; YOKOYAMA et al., 2015).

As duas isoformas (forma transmembranar e a forma solúvel) da proteína Klotho exercem funções diferentes que parecem convergir para o aumento da longevidade. A forma transmembrana da proteína Klotho atua como coreceptor do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) (KUROSU et al., 2006; URAKAWA et al., 2006). O FGF23 é um hormônio produzido no osso que inibe a reabsorção do fosfato e a síntese do calcitriol, forma ativa da vitamina D3. Além disso, camundongos hipomórficos para Klotho e camundongos knockout para o FGF23 desenvolvem fenótipos muito semelhantes, como diminuição da expectativa de vida, infertilidade, atrofia muscular, calcificação vascular, sendo que ambos apresentam hiperfosfatemia (KUROSU et al., 2006).

Já a forma solúvel da Klotho atua como um fator humoral exercendo uma ação pleiotrópica. Ela pode inibir as vias de sinalização da insulina/fator de crescimento similar à insulina tipo I (IGF-1), da Wnt e do fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF- β 1) e esses efeitos estão relacionados com a atividade antienvelhecimento da Klotho (KUROSU, 2005; LIU et al., 2007; WOLF et al., 2008; DOI et al., 2011). No entanto, os mecanismos pelos quais a forma solúvel da Klotho inibe essas vias ainda não estão bem estabelecidos. Esta isoforma também possui atividade de sialidase, podendo inibir a internalização do canal de cálcio, receptor de potencial transitório vaniloide 5 (TRPV5), e o canal de potássio medular externo renal I (ROMK1) (CHA et al., 2008, 2009). Ainda, recentemente, foi demonstrado que a forma solúvel da Klotho também pode agir como cofator do FGF23 (CHEN et al., 2018).

No SNC, a Klotho desempenha papel importante para seu funcionamento correto. Os animais hipomórficos para Klotho apresentam alterações como déficit cognitivo, diminuição no número de sinapses no hipocampo, redução da mielização, perturbações no transporte axonal e degeneração das células de Purkinje (KURO-O et al., 1997; UCHIDA et al., 2001; NAGAI et al., 2003; SHIOZAKI et al., 2008; CHEN et al., 2013).

Corroborando com esses dados, estudos recentes têm demonstrando que a Klotho é capaz de aumentar a capacidade cognitiva e ter um efeito neuroprotetor em camundongos. A superexpressão sistêmica de Klotho foi capaz de melhorar o desempenho de animais em testes de aprendizado, memória e estimular a potencialização a longo prazo, bem como aumentar a expressão sináptica da subunidade GluN2B do receptor glutamatérgico de N-metil-D-aspartato (NMDAR) (DUBAL et al., 2014). Ainda, foi demonstrado que a administração periférica da Klotho induz uma melhora no desempenho cognitivo e resiliência neuronal tanto em camundongos jovens como em modelo animal de envelhecimento e de doença neurodegenerativa (LEON et al., 2017).

1.4 Klotho e a inflamação

Existe uma interação entre a Klotho e processos inflamatórios. Como já mencionado a expressão da Klotho está diminuída em processos patológicos. Sua expressão no rim está diminuída em ratos com hipertensão, doença renal e diabetes do tipo I (AIZAWA et al., 1998). No envelhecimento, no qual há um estado de inflamação crônica, também há uma diminuição da expressão da Klotho (XIAO et al., 2004; DUCE et al., 2008; YAMAZAKI et al., 2010; KING; ROSENE; ABRAHAM, 2012). Ainda, foi demonstrado que o LPS e citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e o indutor fraco de apoptose semelhante ao TNF (TWEAK), reduzem a expressão de Klotho nos rins (OHYAMA et al., 1998; MORENO et al., 2011).

A Klotho apresenta papel anti-inflamatório em doenças renais, através da inibição da ativação de NF- κ B e a subsequente produção de citocinas inflamatórias em resposta ao estímulo de TNF- α em células renais, ao inibir a kinase p38, bloqueando especificamente a fosforilação da Ser536 da RelA, sem afetar inibidores de κ B (I κ B), degradação de I κ B- α ou translocação de RelA para o núcleo e sua ligação com o DNA (ZHAO et al., 2011). Através deste mecanismo postulou-se que a Klotho

possui um papel renoprotetor, indicando-a como alvo terapêutico ligado ao estresse oxidativo a inflamações em casos de diabetes tipo 2.

A interação entre Klotho, TNF- α , NF- κ B e processos inflamatórios não se restringe apenas aos rins, uma vez que estudos sugerem que a disfunção endotelial observada em camundongos deficientes em Klotho, é revertida pela administração da proteína (SAITO et al., 1998, 2000). A função endotelial é mediada pela regulação de óxido nítrico e é prejudicada por processos inflamatórios (MAEKAWA et al., 2009). Assim, a Klotho parece proteger as células endoteliais da inflamação, suprimindo o desenvolvimento de aterosclerose na vasculatura. Segundo Maekawa, a Klotho inibe a expressão de moléculas de adesão induzidas pelo TNF- α em células endoteliais de veias do cordão umbilical de humanos (HUVECs), bem como a ativação de NF- κ B (Klotho inibe a fosforilação de I κ B) pelas HUVECs, além de promover a recuperação da fosforilação da eNOS induzida pelo TNF- α .

Além disto, foi demonstrado um efeito protetor da Klotho contra a lesão cerebral isquêmica, a superexpressão da Klotho no plexo coroide de camundongos melhorou o déficit neurocomportamental e aumentou o número de neurônios vivos após a hipoperfusão cerebral, acompanhada de uma diminuição da translocação do p65 para o núcleo, da produção de citocinas pró-inflamatórias e da ativação de astrócitos e micróglia (ZHOU et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi visto um efeito anti-inflamatório e neuroprotetor da proteína Klotho. Foi observado que o LPS induz as células da glia a produzirem mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ e quando o meio condicionado das células da glia tratadas com LPS (MCG) foram transferidas para uma cultura neuronal houve um aumento da morte neuronal. O pré-tratamento com a proteína Klotho leva a uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6, e quando o meio condicionado das células da glia pré-tratadas com Klotho e estimuladas com LPS foram transferidas para a cultura neuronal há reversão da morte causada pelo MCG. Evidenciado assim, um potencial terapêutico da Klotho em processos patológicos que possuem um componente neuroinflamatório.

REFERÊNCIAS*

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. **Toll-like receptors in the induction of the innate immune response***Nature*, 17 ago. 2000. .
- AIZAWA, H. et al. Downregulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 3, p. 865–871, 28 ago. 1998.
- AJAMI, B. et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 1538–1543, dez. 2007.
- ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. **Cytokines and acute neurodegeneration***Nature Reviews Neuroscience*, out. 2001. .
- ARKING, D. E. et al. 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, 22 jan. 2002.
- ARKING, D. E. et al. 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, 4 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677572>>. Acesso em: 13 nov. 2019.
- BLOCH, L. et al. Klotho is a substrate for α -, β - and γ -secretase. **FEBS Letters**, v. 583, n. 19, p. 3221–3224, 6 out. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.09.009>>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- BOWMAN, C. C. et al. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. **Glia**, v. 43, n. 3, p. 281–291, set. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.10256>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- 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, 7 maio 1976.
- BSIBSI, M. et al. Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1013–1021, 1 nov. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1093/jnen/61.11.1013>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- CARARO-LOPES, M. M. et al. **The relevance of α -KLOTHO to the central nervous system: Some key questions***Ageing Research Reviews* Elsevier Ireland Ltd, , 1 jul. 2017. .
- CARPENTIER, P. A. et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. **Glia**, v. 49, n. 3, p. 360–374, fev. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20117>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

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

CHA, S. K. et al. 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 of the United States of America**, v. 105, n. 28, p. 9805–9810, 15 jul. 2008.

CHA, S. K. et al. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K⁺ excretion by Klotho. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 38–46, jul. 2009.

CHEN, C. Di et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19796–19801, 11 dez. 2007.

CHEN, C. Di et al. The antiaging protein klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 1927–1939, 30 jan. 2013.

CHEN, G. et al. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 461–466, 25 jan. 2018.

CHEN, S.-H. et al. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. **Glia**, v. 63, n. 1, p. 118–131, jan. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22738>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

CLINTON, S. M. et al. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. **Brain Research**, v. 1527, p. 1–14, 21 ago. 2013.

CROWLEY, T. et al. Modulation of TLR3/TLR4 inflammatory signaling by the GABAB receptor agonist baclofen in glia and immune cells: relevance to therapeutic effects in multiple sclerosis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 284, 28 jul. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00284/abstract>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

CUNNINGHAM, C.; DUNNE, A.; LOPEZ-RODRIGUEZ, A. B. **Astrocytes: Heterogeneous and Dynamic Phenotypes in Neurodegeneration and Innate Immunity** Neuroscientist SAGE Publications Inc., , 1 out. 2019. .

DAI, D. et al. Peli1 controls the survival of dopaminergic neurons through modulating microglia-mediated neuroinflammation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8034, 1 dez. 2019.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 752–758, jun. 2005.

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, 25 nov. 1988.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136–153, out. 2016. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13607>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

DOI, S. et al. Klotho inhibits transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8655–8665, 2011.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310–318, set. 2008.

DUBAL, D. B. et al. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. **Cell Reports**, v. 7, n. 4, p. 1065–1076, 22 maio 2014.

DUCE, J. A. et al. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. **Glia**, v. 56, n. 1, p. 106–117, 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20593>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

FITCH, M. T.; SILVER, J. **CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure** **Experimental Neurology**, fev. 2008. .

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, n. 1, p. 244–254, 25 jan. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

GINHOUX, F. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841–845, 5 nov. 2010.

GLASS, C. K. et al. **Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration** **Cell**, mar. 2010. .

GORINA, R. et al. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF κ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 242–255, fev. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.21094>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

GUADAGNO, J. et al. Microglia-derived TNF α induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 3, p. e538, mar. 2013.

GUO, Y. et al. Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- κ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 238–251, 1 jan. 2018.

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, 12 maio 1989.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. **Innate immune activation in neurodegenerative disease** **Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 2014. .

HOLM, T. H.; DRAEBY, D.; OWENS, T. Microglia are required for astroglial toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. **Glia**, v. 60, n. 4, p. 630–638, abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22296>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

HUANG, Y. et al. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 530–540, 1 abr. 2018.

HUI, H. et al. Klotho suppresses the inflammatory responses and ameliorates cardiac dysfunction in aging endotoxemic mice. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15663–15676, 2017.

IMURA, A. et al. 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, 7 maio 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2004.03.090>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

JIN, M. et al. Klotho ameliorates cyclosporine A-induced nephropathy via PDLIM2/NF- κ B p65 signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 2, p. 451–457, 29 abr. 2017.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Journal of neurology, neurosurgery and spine**, v. 1, n. 1, p. 1003, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28127589>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 461–553, abr. 2011.

KING, G. D.; ROSENE, D. L.; ABRAHAM, C. R. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. **Age**, v. 34, n. 6, p. 1405–1419, dez. 2012.

KRICK, S. et al. Klotho Inhibits Interleukin-8 Secretion from Cystic Fibrosis Airway Epithelia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14388, 1 dez. 2017.

KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45–51, 6 nov. 1997.

KUROSU, H. et al. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 2005.

KUROSU, H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1112766>>.

KUROSU, H. et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120–6123, 10 mar. 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEHNARD, S. et al. The Toll-Like Receptor TLR4 Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Oligodendrocyte Injury in the CNS. **Journal of**

Neuroscience, v. 22, n. 7, p. 2478–2486, 1 abr. 2002.

LEHNARDT, S. et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8514–8519, 8 jul. 2003.

LEON, J. et al. Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and α -Synuclein Transgenic Mice. **Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 1360–1371, 8 ago. 2017.

LI, L. et al. Klotho reduction in alveolar macrophages contributes to cigarette smoke extract-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 46, p. 27890–27900, 13 nov. 2015.

LI, Q.; BARRES, B. A. **Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 1 abr. 2018. .

LIEBERMAN, A. P. et al. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 16, p. 6348–6352, 1989.

LIM, K. et al. α -Klotho Expression in Human Tissues. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 10, p. E1308–E1318, out. 2015.
Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2015-1800>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

LIU, H. et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803–806, 2007.

LOZANO, D. et al. **Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: Etiology, Clinical consequences, And therapeutic opportunities** *Neuropsychiatric Disease and Treatment* Dove Medical Press Ltd., , 8 jan. 2015. .

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. **LPS/TLR4 signal transduction pathway** *Cytokine*, maio 2008. .

MAEKAWA, Y. et al. 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, jun. 2009.

MATSUMURA, Y. et al. 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, 26 jan. 1998.

MAZUCANTI, C. H. et al. Activity-dependent neuronal Klotho enhances astrocytic aerobic glycolysis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 39, n. 8, p. 1544–1556, ago. 2019. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0271678X18762700>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

MAZUCANTI, C. H. Y. **Efeitos da proteína Klotho sobre a sinalização de insulina**

e metabolismo energético no sistema nervoso central. 2018. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-01082018-094137/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. **LPS, TLR4 and infectious disease diversity***Nature Reviews Microbiology*, jan. 2005. .

MINOGUE, A. M.; BARRETT, J. P.; LYNCH, M. A. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 β in a JAK2-dependent manner. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 126, 14 dez. 2012. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-9-126>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

MORENO, J. A. et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 7, p. 1315–1325, jul. 2011.

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, 16 dez. 1983.

NAGAI, T. et al. 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.

NAZEM, A. et al. **Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease***Journal of Neuroinflammation*BioMed Central Ltd., , 17 abr. 2015. .

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 27 maio 2005.

OHYAMA, Y. et al. 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, 29 out. 1998.

OWNBY, R. L. **Neuroinflammation and cognitive aging***Current Psychiatry Reports*, fev. 2010. .

PARK, B. S.; LEE, J. O. **Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes***Experimental and Molecular Medicine*Nature Publishing Group, , 2013. .

PASCUAL, O. et al. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. E197–E205, 24 jan. 2012.

RIVEST, S. **Regulation of innate immune responses in the brain***Nature Reviews Immunology*, jun. 2009. .

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure Activity Results in a Rapid Induction of Nuclear Factor- κ B in Adult but Not Juvenile Rat Limbic Structures. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 662–668, 23 nov. 1996. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1996.67020662.x>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

SAIJO, K. et al. A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 47–59, 3 abr. 2009.

SAITO, Y. et al. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, n. 2, p. 324–329, 20 jul. 1998.

SAITO, Y. et al. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 2, p. 767–772, 24 set. 2000.

SAURA, J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. **Journal of Neuroinflammation**, v. 4, n. 1, p. 26, 2007. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-4-26>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–1782, 7 jun. 1999.

SHIOZAKI, M. et al. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 924–941, 9 abr. 2008.

SHIRAKI-IIDA, T. et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. **FEBS Letters**, v. 424, n. 1–2, p. 6–10, 6 mar. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2898%2900127-6>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. **Astrocytes: Biology and pathology** *Acta Neuropathologica*, jan. 2010. .

SUN, L. et al. Lack of PINK1 alters glia innate immune responses and enhances inflammation-induced, nitric oxide-mediated neuron death. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 383, 1 dez. 2018.

TROTTA, T. et al. **Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain** *Journal of Neuroimmunology*, 2014. .

UCHIDA, A. et al. Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. **Journal of Neuroscience Research**, v. 64, n. 4, p. 364–370, 15 maio 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.1087>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

URAKAWA, I. et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 770–774, 7 dez. 2006.

WANG, Y.; SUN, Z. **Current understanding of klotho** *Ageing Research Reviews*, jan. 2009. .

WOLF, I. et al. Klotho: A tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, p. 7094–7105, 2008.

XIAO, N. et al. Klotho is a serum factor related to human aging. **Chinese medical journal**, v. 117, n. 5, p. 742–747, maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161545>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

YAMAZAKI, Y. et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 513–518, jul. 2010.

YOKOYAMA, J. S. et al. Variation in longevity gene *KLOTHO* is associated with greater cortical volumes. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 2, n. 3, p. 215–230, mar. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/acn3.161>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

ZELDICH, E. et al. Klotho Is Neuroprotective in the Superoxide Dismutase (SOD1G93A) Mouse Model of ALS. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 69, n. 2, p. 264–285, 1 out. 2019.

ZHAO, Y. et al. Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)⁵³⁶ phosphorylation. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1907–1916, jul. 2011.

ZHOU, H.-J. et al. Protective Effect of Klotho against Ischemic Brain Injury Is Associated with Inhibition of RIG-I/NF-κB Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 950, 18 jan. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00950/full>>. Acesso em: 18 nov. 2019.