Fernanda Oliveira Coelho

Efeitos renais da exposição crônica a nicotina em
camundongos com deficiência de klotho

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coelho, Fernanda Oliveira

Efeitos renais da exposição crônica a nicotina em camundongos com
deficiência de klotho / Fernanda Oliveira Coelho. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Nicotina 2.Proteína klotho 3.Taxa de filtração glomerular
4.Inulina 5.Aldosterona 6.Barorreflexo 7.Análise espectral

USP/FM/DBD-247/15

Trabalho realizado no laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM-12), Disciplina de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através de concessão de bolsa (140041/2012-5) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através dos auxílios à pesquisa (Processos 2010/19012-0 e 2010/08529-2).

Agradecimentos

À Deus por me permitir a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Fernando e Fátima, pela amizade, suporte e companheirismo incondicionais.

À meu irmão, José Neto e à minha cunhada Alina, à minha avó Maria e à toda a família pelo amor, apoio e incentivo.

À minha orientadora, Prof Dra Lúcia Andrade, pela paciência e pelos importantes ensinamentos que ultrapassam esta tese.

Aos meus amigos da Megaliga, por fazerem meus dias mais felizes há mais de 10 anos!

À Leticia pela companhia no laboratório e no dia-a-dia, e à Sabrina e Lílian, que também acompanharam de perto todo esse percurso e fizeram os dias mais leves.

À Talita, à Ana Carolina, à Daniele, à Helô e ao Rildo pela ajuda fundamental e paciente no dia-a-dia da bancada e pela alegria dos intervalos.

À Camila, ao Roberto, ao José Manuel, à Letícia, ao Igor, à Cecília, à Fabíola, à Denise, à Eloá, ao Nivaldo e aos demais membros atuais e prévios do LIM-12 pela simpatia e prestatividade em todos os momentos.

À Prof Dra Cláudia Helou, à Prof Dra Maria Cláudia Irigoyen e à Prof Dra Rosa Moisés por dividirem o conhecimento de maneira generosa.

Ao Prof Dr Makoto Kuro-o pela disponibilidade e gentileza, mesmo antes de conhecer o nosso grupo.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa
ignorância”.
(John F. Kennedy)

Normatização adotada

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
“Abstract”	
1	Introdução 1
1.1	Importância do tabagismo 2
1.2	Tabagismo e doença renal 3
1.3	Principais vias de inflamação e fibrogênese renal 4
1.4	A Nicotina 7
1.5	Nicotina e doença renal 11
1.6	O gene klotho (KI) 13
1.7	Klotho e rim 17
1.8	Nicotina e klotho 19
2	Objetivos 21
3	Métodos 23
3.1	Animais e genotipagem 24
3.2	Exposição crônica a nicotina 24
3.3	Gaiola metabólica 25
3.4	Sacrifício e coleta de plasma 26
3.5	Medida da taxa de filtração glomerular (TFG) 26
3.6	Avaliação hemodinâmica 28
3.7	Análise da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial – análise espectral 31
3.8	Análises bioquímicas 32
3.9	Dosagem de cotinina plasmática e urinária 32
3.10	Extração, quantificação de proteínas e “Western blotting” 32
3.11	Reação em cadeia da polimerase quantitativa – qPCR 34
3.12	Imunohistoquímica 35
3.13	Marcadores de estresse oxidativo 36
3.14	Dosagem de paratormônio (PTH) 36
3.15	Dosagem de fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) 37
3.16	Dosagem de hormônio antidiurético (ADH) 37
3.17	Dosagens de citocinas no tecido renal 37
3.18	Dosagem de aldosterona plasmática 37
4	Análise estatística 38
5	Resultados 40
5.1	Genotipagem 41
5.2	Exposição à nicotina 41
5.3	Função renal e eletrólitos 42
5.4	Função tubular – Eletrólitos urinários, osmolalidade e transportadores de sódio, água e potássio 46
5.5	Receptores nicotínicos 52
5.6	Klotho renal – Expressão protéica e RNAm 55
5.7	Interleucinas e estresse oxidativo 57
5.8	Resposta hemodinâmica, eNOS e VEGF 60
5.9	SRAA –aldosterona plasmática, expressão de renina e AT1 renais 71
5.10	Fibronectina tecido renal 74
6	Discussão 75
7	Conclusões 83
8	Referências bibliográficas 85

Lista de abreviaturas e siglas

ADH:	hormônio anti-diurético
Ang-II:	angiotensina II
ANOVA:	análise de variância
AQP2:	aquaporina 2
AT-1:	receptor de angiotensina tipo 1
cDNA:	DNA complementar
DRC:	doença renal crônica
DRT:	doença renal terminal
EMT:	transição epitélio-mesenquimal
e-NOS:	óxido nítrico sintase endotelial
FC:	frequência cardíaca
FE:	fração de excreção
FEK:	fração de excreção de potássio
FEMg:	fração de excreção de magnésio
FENa:	fração de excreção de sódio
FEP:	fração de excreção de fósforo
FGF-23:	fator de crescimento de fibroblastos 23
FITC:	fluoresceína isocianato
FOXO:	fator de transcrição “forkhead box” o
GSH:	glutathiona
HF:	alta frequência
IL-10:	interleucina-10
IL-12:	interleucina-12
IL-6:	interleucina-6
IL-8:	interleucina-8
INF- γ :	interferon γ
i-NOS:	óxido nítrico sintase indutível
IP:	intervalo de pulso
<i>kl/kl</i> :	camundongo homozigoto para mutação do gene klotho
Kl:	gene klotho
Kl ^{+/-} :	camundongo haploinsuficiente para mutação do gene klotho
Kl ^{+/+} :	camundongo “wild type”
LF:	baixa frequência
MCP-1:	proteína quimiotática de monócitos-1
nAChR:	receptor nicotínico da acetilcolina
NaPi2a:	canais sódio-fosfato 2a
NHE3:	trocador sódio-hidrogênio tipo 3
NIC+:-	animais Kl ^{+/-} expostos a nicotina
NIC++:	animais Kl ^{+/+} expostos a nicotina
NKCC2:	co-transportador Na-K-2Cl

NO:	óxido nítrico
PAD:	pressão arterial diastólica
PAM:	pressão arterial média
PAS:	pressão arterial sistólica
PCR:	reação em cadeia da polimerase
PTH:	Paratormônio
qPCR:	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RMSSD:	raiz quadrada da média das diferenças dos intervalos R-R sucessivos
RNA _m :	RNA mensageiro
ROM-K:	canal de potássio da medula externa renal
ROS:	espécies reativas de oxigênio
RT-PCR:	“real-time” PCR
SAC ^{+/-} :	animais KI ^{+/-} não-expostos a nicotina
SAC ⁺⁺ :	animais KI ^{+/+} não-expostos a nicotina
SOD:	superóxido dismutase
SRAA:	sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TBARS:	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFG:	taxa de filtração glomerular
TGF- β :	fator de transformação do crescimento β
TNF- α :	fator de necrose tumoral α
VEGF:	fator de crescimento vascular endotelial
VLF:	muito baixa frequência
WT:	“wild-type”
$\alpha 7$ -nAChR:	receptor nicotínico da acetilcolina $\alpha 7$
α -ENAC:	canal de sódio epitelial α
α -SMA:	actina α de músculo liso

Lista de figuras

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.1	O desbalanço entre oxidantes e anti-oxidantes determina o estresse oxidativo	5
Figura 1.2	Principais vias de sinalização relacionadas a transição epitélio-mesenquimal no tecido renal	6
Figura 1.3	Ativação das vias de fibrose pela ligação da angiotensina II ao receptor de angiotensina tipo 1	6
Figura 1.4	Principais vias de metabolização da nicotina	8
Figura 1.5	Esquema ilustrativo do corte transversal dos diferentes tipos de receptores nicotínicos	9
Figura 1.6	Esquema ilustrativo da produção de fator de transformação do crescimento β e do fator de crescimento do tecido conjuntivo induzidas pela nicotina	12
Figura 1.7	Animais kl/kl apresentam fenótipo semelhante ao envelhecimento humano	14
Figura 1.8	Ações da proteína Klotho em suas formas transmembrana e secretada	15
Figura 1.9	Ação de β -galactosidase da proteína Klotho na modulação do canal iônico TRPV5	16
Figura 1.10	Regulação dos fatores de transcrição FOXO pela sinalização IGF1/insulina	17
Figura 1.11	Mecanismo proposto para os efeitos benéficos do Klotho na lesão renal aguda	18

Capítulo 3 – Métodos

Figura 3.1	Representação esquemática do protocolo de exposição a nicotina ou sacarina	25
Figura 3.2	Modelo de gaiola metabólica utilizada para quantificação do volume ingerido, quantificação e coleta da diurese por 24 horas	26
Figura 3.3	Exemplo de curva de decaimento exponencial em duas fases utilizada para cálculo da taxa de filtração glomerular após injeção de dose única de FITC-inulina.	28
Figura 3.4	Camundongo submetido à canulação da artéria carótida e da veia jugular	29

Capítulo 5 – Resultados

Figura 5.1	Exemplo de genotipagem evidenciando os alelos mutante e “wild type” (WT)	41
Figura 5.2	Taxa de filtração glomerular (TFG) medida por depuração de inulina marcada com FITC	43
Figura 5.3	Níveis plasmáticos de uréia	44
Figura 5.4	Excreção urinária de proteína	45
Figura 5.5	Osmolalidade urinária	47
Figura 5.6	Níveis plasmáticos de hormônio antidiurético (ADH)	47
Figura 5.7	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína AQP2	48
Figura 5.8	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína α -ENAC	49
Figura 5.9	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína NKCC2	50
Figura 5.10	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína NHE3	51
Figura 5.11	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína ROM-K	53
Figura 5.12	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína $\alpha 7$ -nAChR	54
Figura 5.13	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína Klotho nos animais $KI^{+/+}$ com e sem exposição a nicotina	55
Figura 5.14	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína Klotho nos animais $KI^{+/-}$ com e sem exposição a nicotina	56
Figura 5.15	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína Klotho nos dois grupos expostos à nicotina	56
Figura 5.16	Expressão gênica de klotho por q-PCR	57
Figura 5.17	Níveis de interleucinas detectáveis no tecido renal	58
Figura 5.18	Marcadores de estresse oxidativo no tecido renal	59
Figura 5.19	Índices de sensibilidade barorreflexa após infusão de fenilefrina	61
Figura 5.20	Índices de sensibilidade barorreflexa após infusão de nitroprussiato	62
Figura 5.21	Desvio padrão do intervalo de pulso (DP-IP)	63
Figura 5.22	Raiz quadrada da média das diferenças dos intervalos R-R (RMSSD)	64
Figura 5.23	Relação LF/HF	66
Figura 5.24	Índice alfa	67
Figura 5.25	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína e-NOS nos animais $KI^{+/+}$ com e sem exposição a nicotina	68
Figura 5.26	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína e-NOS nos animais $KI^{+/-}$ com e sem exposição a nicotina	68

Figura 5.27	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína e-NOS nos dois grupos expostos à nicotina	69
Figura 5.28	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína VEGF nos animais KI ⁺⁺ com e sem exposição a nicotina	69
Figura 5.29	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína VEGF nos animais KI ⁺⁻ com e sem exposição a nicotina	70
Figura 5.30	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína VEGF nos dois grupos expostos à nicotina	70
Figura 5.31	Níveis plasmáticos de aldosterona	71
Figura 5.32	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína renina	72
Figura 5.33	Avaliação semiquantitativa da expressão renal da proteína AT-1	73
Figura 5.34	Imunohistoquímica para fibronectina no tecido renal	74

Lista de tabelas

Tabela 1	Anticorpos utilizados para “western blotting”	33
Tabela 2	Dosagens de cotinina	42
Tabela 3	Dados da gaiola metabólica	42
Tabela 4	Eletrólitos plasmáticos	45
Tabela 5	Fração de excreção de eletrólitos	46
Tabela 6	Níveis plasmáticos de FGF-23 e PTH intactos	46
Tabela 7	Medidas diretas de pressão arterial e frequência cardíaca	60
Tabela 8	Análise espectral das bandas de baixa (LF) e de alta frequência (HF) e relação LF/HF	65
Tabela 9	Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e índice alfa	67

Resumo

COELHO FO. ***Efeitos renais da exposição crônica a nicotina em camundongos com deficiência de klotho*** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A nicotina é o principal componente do tabaco e dos cigarros eletrônicos. A exposição crônica a nicotina, em quantidades semelhantes às atingidas pelo tabagismo humano, é responsável por piora da lesão renal aguda e da doença renal crônica. O gene klotho, predominantemente expresso no rim, foi descoberto após uma mutação insercional, com o surgimento de um fenótipo semelhante ao envelhecimento humano nos camundongos homozigotos para esse transgene. A proteína Klotho transmembrana tem ação de co-receptor do fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) e sua forma secretada atua em diversas vias intracelulares e em órgãos a distância. A deficiência de Klotho ocorre no envelhecimento, em situações que levam a lesão renal aguda e na doença renal crônica. A expressão reduzida de Klotho também agrava lesão renal aguda e participa da progressão da doença renal crônica, enquanto o seu aumento, ou a sua reposição, protegem dos processos inflamatórios e do estresse oxidativo. Neste estudo, objetivamos avaliar os efeitos renais, hemodinâmicos e sobre a expressão de Klotho da exposição crônica a nicotina e quais os efeitos dessa exposição nos animais haploinsuficientes para o transgene klotho ($KI^{+/-}$). Utilizamos para estas avaliações camundongos $KI^{+/-}$ e seus controles wild type ($KI^{+/+}$), que foram expostos a nicotina (200 mcg/mL) ou veículo (sacarina 2%) diluídos em água por 28 dias. Ao final do estudo foram avaliados diurese, eletrólitos plasmáticos e urinários, ureia, aldosterona, ADH, FGF-23 e PTH intactos plasmáticos, expressão protéica renal de Klotho, $\alpha 7$ -nAChR, NHE3, ENaC, NKCC2, AQP2, e-NOS, VEGF, MnSOD e renina, expressão genica renal de klotho, interleucinas, TBARS e GSH em tecido renal, taxa de filtração glomerular por FITC-inulina, pressão arterial e frequência cardíaca invasivas, sensibilidade baroreflexa e modulação autonômica cardíaca e periférica por análise espectral. Após a exposição a nicotina, os animais $KI^{+/+}$ apresentaram redução da expressão renal da proteína e do RNAm de Klotho e uma tendência a

aumento dos níveis plasmáticos de FGF-23, associados a uma queda da diurese e da taxa de filtração glomerular, sem alteração dos níveis de ADH. Esses animais $KI^{+/-}$ também apresentaram aumento da sensibilidade barorreflexa em resposta ao nitroprussiato e um predomínio da modulação simpática cardíaca, com redução da expressão renal dos $\alpha 7$ -nAChR. Os animais $KI^{+/-}$ tiveram níveis renais ainda menores de Klotho após a exposição a nicotina, com aumento de TBARS, IL-6, uréia e aldosterona em relação aos $KI^{+/-}$ não expostos. A diurese, a taxa de filtração glomerular e a expressão dos $\alpha 7$ -nAChR não se reduziram e não houve aumento da sensibilidade barorreflexa após exposição a nicotina, com um predomínio da modulação parassimpática cardíaca, nesses animais $KI^{+/-}$. A ingesta hídrica, a pressão arterial e a frequência cardíaca foram semelhantes entre os 4 grupos. A proteinúria foi maior nos animais $KI^{+/-}$ do que nos animais $KI^{+/+}$ após a exposição a nicotina. Podemos concluir que a exposição crônica à nicotina reduz a expressão renal de Klotho, estimula vias de inflamação, fibrose e estresse oxidativo renais e tem efeitos renais e sistêmicos diferentes de acordo com os níveis basais de Klotho.

Descritores: nicotina; proteína Klotho; taxa de filtração glomerular; inulina; aldosterona; barorreflexo; análise espectral.

Abstract

COELHO, FO. ***Renal effects of chronic nicotine exposure in klotho deficient mice*** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Nicotine is a major compound of tobacco and electronic cigarettes. Chronic exposure to nicotine concentrations that are similar to human smoke worsens acute kidney injury and chronic kidney disease. The klotho (KI) gene is expressed predominantly by the kidney and was discovered after an unintentional insertional mutation that resulted, in transgenic homozygous mice, in a phenotype similar to human aging. Klotho transmembrane protein acts as a co-receptor to fibroblastic growth factor 23 (FGF-23) and the secreted form interacts in multiple intracellular pathways, with effects in distant organs. Klotho deficiency occurs in aging and in multiple acute kidney injury and chronic kidney disease etiologies, whereas klotho upregulation and replacement protect from inflammation and oxidative stress. Here, we investigated renal and hemodynamic effects of chronic nicotine exposure, its effects over renal expression of KI, and compared wild type (KI^{+/+}) and KI haploinsufficient mice (KI^{+/-}) in terms of the effects of that exposure. KI^{+/-} and KI^{+/+} mice received nicotine (200 µg/ml) or vehicle (saccharine 2%) in drinking water for 28 days. We evaluated diuresis, ions in serum and urine, urea, plasma and urinary levels of cotinine, aldosterone, plasma antidiuretic and parathyroid hormone, plasma FGF-23, protein expression of (immunoblotting for) Klotho and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, NHE3, NKCC2, ENaC, aquaporin-2, e-NOS, VEGF and renin, klotho mRNA, kidney interleukines, TBARS and GSH, glomerular filtration rate by fluorescein isothiocyanate-inulin clearance, mean arterial pressure, heart rate, baroreflex sensitivity and autonomic cardiac and peripheral modulation by spectral analysis. After nicotine exposure, KI^{+/+} mice showed decreased Klotho protein and mRNA and a tendency towards an elevation in plasma FGF-23, which were associated with both diuresis and glomerular filtration rate reductions, without modifications in ADH levels. Besides that, KI^{+/+} animals increased baroreflex sensitivity after nitroprusside, a predominant sympathetic cardiac modulation and lower $\alpha 7$ -nAChR kidney expression. KI^{+/-}

mice reduced even more Klotho renal expression, with higher levels of TBARS, IL-6, urea and aldosterone. Diuresis, glomerular filtration rate, $\alpha 7$ -nAChR expression and baroreflex sensitivity were the same of their controls. Cardiac parasympathetic modulation predominated in $KI^{+/-}$ mice. Fluid intake, mean arterial pressure and heart rate were similar across the 4 groups. Renal protein excretion was higher in $KI^{+/-}$ than in their controls after nicotine exposure. We can conclude that chronic nicotine exposure downregulates Klotho kidney expression induces inflammation and oxidative stress and stimulates fibrosis, with different renal and systemic responses according to basal Klotho levels.

Descriptors: nicotine; Klotho, protein; glomerular filtration rate; aldosterone; inulin; baroreflex; spectrum analysis.

1 Introdução

1.1 Importância do tabagismo

A cada ano, trinta milhões de adultos jovens começam a fumar em todo o mundo. De acordo com os padrões de comportamento, a maioria desses jovens não irá deixar de fumar(1). No Brasil, em 2008, 17,5% da população com 15 anos ou mais era usuária de algum tipo de tabaco, o equivalente a 25 milhões de pessoas(2).

O tabagismo é a principal causa de morte evitável no mundo, estando comprovadamente implicado no desenvolvimento e na mortalidade relacionados a diversos tipos de câncer, principalmente pulmão, boca, laringe, faringe, esôfago, estômago, pâncreas, bexiga, rim, colo uterino e leucemia mielóide aguda; doença pulmonar obstrutiva crônica, doença coronariana, hipertensão arterial e acidente vascular encefálico(3). Além do tabagismo ativo, as exposições passiva e durante a gestação também contribuem para o desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças(4).

O tabagismo é responsável pela perda de 1 década de vida e a sua interrupção é capaz de reduzir essa perda em aproximadamente 90%(1). Calcula-se que o fumo seja responsável por mais de cinco milhões de mortes a cada ano. Se as tendências atuais de consumo dos produtos de tabaco persistirem, esse número pode superar oito milhões de mortes anuais até 2030. Quanto ao fumo passivo, estima-se que provoque cerca de 600 mil mortes anuais de indivíduos expostos à fumaça do cigarro(5).

Na última década surgiram dispositivos, chamados de cigarros eletrônicos, que simulam o ato de fumar pela vaporização de soluções contendo nicotina e algum solvente, na maioria dos casos o propilenoglicol. Inicialmente comercializados como ferramentas para cessação do tabagismo, já que reduz uma parte da morbidade associada ao tabaco, seu uso tem crescido exponencialmente entre adolescentes e adultos jovens(6). Esse uso indiscriminado tem motivado discussões a cerca dos riscos desta nova forma de exposição. Os cigarros eletrônicos resultam em níveis séricos do principal metabólito da nicotina similares aos gerados pelo tabaco, tanto após a exposição passiva quanto ativa(7).

1.2 Tabagismo e doença renal

Além dos efeitos carcinogênicos e do seu papel como fator de risco para doença cardiovascular, o tabagismo é um fator de risco independente para doença renal(8). Em 1996, o seguimento de uma população de 332.544 pacientes, incluídos num ensaio clínico de prevenção primária de doença cardiovascular, sugeriu uma associação entre tabagismo e aumento do risco de doença renal terminal(9). Nos anos seguintes, em vários grupos populacionais, essa associação foi documentada. Em indivíduos menores de 70 anos, em uma amostra populacional norueguesa, os fumantes ativos apresentaram um risco 4 vezes maior de doença renal quando comparados a quem nunca fumou(10). Numa coorte prospectiva americana, após 20 anos de seguimento, verificou-se um maior risco de morte por doença renal crônica (DRC) e doença renal terminal (DRT) entre os tabagistas ativos(11). Na população japonesa, em 10 anos de seguimento de 123.764 indivíduos, o tabagismo foi um preditor de DRC em homens e mulheres acima de 40 anos(12).

Na população idosa, o tabagismo também parece ser um fator de risco importante para perda de função renal. O tabagismo ativo foi o mais forte preditor independente de perda patológica da função renal em indivíduos italianos de 65 a 84 anos que fumavam mais de 20 cigarros por dia, independente da creatinina de base(13), e, em pacientes asiáticos a partir de 65 anos, foi associado a proteinúria não detectada previamente(14).

Mesmo numa população de adolescentes, com baixa prevalência de fatores de risco para DRC, como diabetes e hipertensão, a taxa de filtração glomerular (TFG) diminuiu de forma linear com o aumento das concentrações séricas de cotinina(15).

Em pacientes com nefropatia diabética, o tabagismo aumenta o risco de desenvolvimento de microalbuminúria e acelera a progressão para macroalbuminúria e DRT(10). No seguimento observacional de 1105 pacientes participantes do DCCT (“Diabetes Control and Complications Trial”), com diabetes tipo 1 e excreção de albumina normal no início do estudo, os tabagistas ativos tiveram um aumento de 4,3 vezes na taxa de declínio da

filtração glomerular(16). Essa associação também é vista em pacientes com diabetes tipo 2(17).

Estudos clínicos também mostram uma correlação entre tabagismo e deterioração da função renal em pacientes com nefrite lúpica(18), doença renal policística(19) e glomerulonefrites(20).

Em transplantados renais, o tabagismo associa-se a maior incidência de função retardada do enxerto(21) e pior sobrevida renal(22). O tabagismo pré-transplante já foi associado com um risco de 2,3 vezes de perda do enxerto(23) e a sobrevida do rim transplantado é menor entre fumantes(22). Alguns estudos sugerem até que rins de doadores com história de tabagismo também podem ter uma pior sobrevida quando transplantados(24, 25).

1.3 Principais vias de inflamação e fibrogênese renal

Embora os eventos iniciais envolvidos na lesão renal aguda sejam variados (isquemia, sepse e nefrotoxinas, principalmente), as respostas subsequentes envolvem vias similares(26). Os mecanismos envolvidos nesse tipo de lesão estão relacionados, principalmente, a inflamação e ao estresse oxidativo.

Em condições fisiológicas, espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas são inativadas por mecanismos de defesa celulares e extra-celulares, existindo um balanço entre oxidantes e anti-oxidantes. Os danos teciduais ocorrem nas condições patológicas em que existe um aumento da geração de ROS e/ou uma depleção dos sistemas de defesa anti-oxidantes. No tecido renal, condições como inflamação, choque, sepse, isquemia ou exposição a substâncias nefrotóxicas podem desencadear estresse oxidativo(27). As ROS incluem o anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxila ($OH\cdot$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$). No rim, o óxido nítrico (NO) é principalmente produzido pelas enzimas óxido nítrico sintases endotelial e indutível (eNOS e iNOS, respectivamente). Os mecanismos antioxidantes incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase e algumas moléculas não enzimáticas, como a

glutaciona (GSH), o selênio e as vitaminas C e E. As enzimas reduzem o superóxido a peróxido de hidrogenio e, posteriormente, a água. A glutaciona e o selênio contribuem para a redução do peróxido de hidrogênio a água e as vitaminas C e E previnem a peroxidação lipídica(28).

Figura 1.1 (adaptada)– O desbalanço entre oxidantes e anti-oxidantes determina o estresse oxidativo. As óxido nítrico sintases endotelial (eNOS) e indutível (iNOS) geram óxido nítrico (NO), que é importante na promoção de vasodilatação, mas sua metabolização pode resultar em peroxidação lipídica e formação de espécies reativas de oxigênio. Por isso, enzimas como as superóxido dismutases (SOD), a catalase e a glutatona peroxidase (GPx) e algumas outras substâncias como as vitaminas C e E e o selênio atuam como anti-oxidantes(28)

O reparo tecidual após uma lesão renal pode ocorrer de forma incompleta e resultar em fibrose. A produção sustentada de citocinas pró-fibróticas por macrófagos cronicamente ativados, modificações no processo de proliferação, com interrupção do ciclo celular na fase G2/M, e o surgimento de um fenótipo secretório nas células tubulares renais permitem a progressão para DRC, através de um estímulo a fibrogênese. As células epiteliais passam a produzir citocinas como o fator de crescimento transformador β (TGF- β) e o fator de crescimento do tecido conjuntivo, como tentativa de reparo tecidual(29). Durante esse processo, vários tipos celulares sofrem transição fenotípica para fibroblastos produtores de matriz intersticial. Em rins humanos

fibróticos, o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) é uma adaptação das células epiteliais tubulares a agressões crônicas e é regulado por interconexões das vias de sinalização TGF- β /Smad(30, 31), integrina/ILK e Wnt/ β -catenina(32).

Figura 1.2 (adaptada) – Principais vias de sinalização relacionadas a transição epitélio-mesenquimal no tecido renal⁽³²⁾

O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) também exerce papel importante no desenvolvimento de fibrose renal. A angiotensina II (Ang II), através do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), estimula a transcrição e síntese de TGF- β e aumenta a expressão de seus receptores específicos, potencializando a sua ação pró-fibrótica(33).

Figura 1.3(adaptada)– Ativação das vias de fibrose pela ligação da Angiotensina II ao seu receptor tipo 1 (AT1)(33)

1.4 A Nicotina

A nicotina é uma amina terciária, extraída da planta do tabaco. Essa amina é o alcalóide mais abundante do cigarro e a principal substância aditiva da sua composição. O papel da nicotina como causa direta das doenças relacionadas ao tabagismo é controverso, mas estudos sugerem sua participação nos mecanismos relacionados ao surgimento e progressão de doenças neoplásicas, através do estímulo a angiogenese e crescimento tumoral, e na progressão de doenças não neoplásicas, ao estimular o estresse oxidativo, inflamação e fibrogênese em diversos tecidos.

A nicotina é uma base fraca e sua absorção através das membranas é dependente do pH. O pH da maioria dos cigarros é ácido e, nessas condições, a nicotina está primariamente ionizada, resultando em baixa absorção bucal. Quando a fumaça do cigarro atinge as pequenas vias aéreas e os alvéolos pulmonares, a nicotina é rapidamente absorvida. No trato digestivo, a nicotina é pouco absorvida no estômago pelo pH ácido, mas é bem absorvida no intestino delgado, que tem pH alcalino e uma grande superfície de absorção. Após a administração de uma solução de nicotina, as concentrações de pico são atingidas em 1 hora, com uma bioavaliabilidade de 20-45%. Após a absorção, a nicotina entra na corrente sanguínea, onde em um pH de 7,4 encontra-se 69% ionizada. A droga é distribuída extensivamente para os tecidos, com afinidade especialmente por fígado, rim, baço e pulmão. A nicotina é metabolizada no fígado em vários metabólitos, mas 70-80% é convertida em cotinina, o que ocorre em duas etapas. A primeira depende do citocromo P450 no fígado, através da enzima CYP2A6 em humanos(34) e da enzima CYP2A5 em camundongos(35), e a segunda etapa depende de uma aldeído-oxidase citoplasmática(34). A excreção da nicotina ocorre por filtração glomerular e secreção tubular, com reabsorção variável de acordo com o pH urinário, resultando em “clearance” variável de 17 mL/min (pH 7,0) até 600 mL/min (pH 4,4). Estudos “in vitro” sugerem que a nicotina deve ser um substrato para transportadores de cátions orgânicos, com sistemas de transportes distintos nas membranas basolateral e apical nos túbulos renais. A insuficiência renal reduz substancialmente tanto o “clearance” renal quanto o metabólico da

nicotina e da cotinina, por diminuição da filtração e inibição da metabolização hepática(36). Em idosos acima de 65 anos a depuração total de nicotina reduz-se em 23% e a depuração renal de nicotina em 49%, sem que exista um mecanismo comprovado para essas mudanças de metabolização(34).

As concentrações de nicotina no plasma ou sangue em fumantes variam de 10-50 ng/mL. A meia-vida plasmática da nicotina após injeção endovenosa ou inalação por cigarro é de aproximadamente 2 horas, mas como ocorre liberação lenta dos tecidos, ocorre persistência de níveis significantes por 6-8 horas(34).

A cotinina é o principal metabólito da nicotina e está presente no sangue de fumantes em concentrações muito maiores do que a nicotina. Por apresentar uma meia-vida mais longa, de aproximadamente 16h, esse metabólito tem sido usado como um biomarcador da exposição a nicotina, havendo uma boa correlação entre as suas concentrações medidas no plasma, urina e saliva. A depuração renal da cotinina, por sua vez, é muito menor que a filtração glomerular, sugerindo uma reabsorção tubular extensa (34). A cotinina também é metabolizada em humanos pela enzima CYP2A6(37). Os níveis plasmáticos de cotinina são dependentes da taxa de geração a partir da nicotina e da taxa de eliminação(36).

Figura 1.4 – Principais vias do metabolismo da nicotina. O principal metabólito originado da metabolização da nicotina é a cotinina, que é formada após a ação do citocromo P450 e de uma aldeído-oxidase(34)

Acredita-se que a nicotina exerça a maior parte dos seus efeitos através dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) (38). Originalmente descritos nos tecidos muscular e neuronal, esses receptores já foram encontrados em diversos tipos de células de linhagens tumorais, macrófagos, músculo liso vascular e em células epiteliais, inclusive no rim. Ele é um receptor transmembrana, composto por cinco subunidades, homo ou heteropentamérico, que funciona como canal iônico agonista regulado. Os monômeros pertencem a um conjunto de 9 subunidades α ($\alpha 2$ à $\alpha 10$) e 3 subunidades β ($\beta 2$ à $\beta 4$). Cada subunidade tem quatro domínios transmembrana e os sítios de ligação dos agonistas se localizam na interface das subunidades(39). O receptor nicotínico da acetilcolina- $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR), um homopentâmero da subunidade $\alpha 7$, é o principal subtipo e sua ativação permite a entrada de cálcio na célula.

Figura 1.5 (adaptada) - Esquema ilustrativo do corte transversal dos diferentes tipos de receptores nicotínicos, mostrando as diferenças entre as combinações de subunidades que os compõem. Adaptada de <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/neonicot/recepnicot.html>

Uma propriedade específica dos nAChRs é a sua susceptibilidade a desensibilização, com a ocorrência de uma diminuição ou perda da resposta funcional após exposição crônica a nicotina(40). Diante da alta afinidade dos nAChRs por seus ligantes, o tabagismo frequente pode manter permanentemente a desensibilização dos nAChR. O $\alpha 7$ -nAChR neuronal é particularmente sensível a desensibilização após uma exposição prolongada a nicotina, podendo apresentar, inclusive, efeitos semelhante a um antagonista(41). A concentração de cálcio intracelular é capaz de alterar a taxa de recuperação da desensibilização, com níveis intracelulares elevados de cálcio causando retardo na recuperação, no caso dos $\alpha 7$ -nAChR.(40)

No tecido renal, o $\alpha 7$ -nAChR já foi encontrado no endotélio dos capilares peritubulares(42), nos túbulos proximal e distal (43) e em culturas de células

mesangiais(44). Nas células mesangiais, a nicotina é um estímulo importante para a proliferação e produção de fibronectina, efeito prevenido pela administração de alfa-bungarotoxina, que se liga e bloqueia o $\alpha 7$ -nAChR(38). Após a indução de lesão de isquemia-reperfusão, parece haver um aumento da expressão protéica dessa subunidade nos capilares peritubulares, efeito diminuído pelo pré-tratamento com 1mg/kg de nicotina intraperitoneal(42).

A administração aguda de nicotina é capaz de aumentar a frequência cardíaca, a contratilidade miocárdica e a pressão arterial. Esses efeitos cardiovasculares da nicotina são, principalmente, pela estimulação do sistema nervoso simpático. Ao ligar-se aos $\alpha 7$ -nAChR, a nicotina desencadeia uma resposta cardiovascular simpática(45). A nicotina estimula a neurotransmissão simpática, estimulando a liberação de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares periféricas e na medula adrenal(46). Em indivíduos saudáveis e tabagistas o ato de fumar provoca aumento dos níveis plasmáticos de epinefrina e norepinefrina. Existem três possíveis mecanismos de ativação simpática relacionados ao tabagismo: - efeito direto no SNC; - efeito estimulatório na transmissão ganglionar simpática; - efeito direto nas terminações nervosas simpáticas periféricas. Em tabagistas saudáveis, com sensibilidade barorreflexa preservada, ocorre diminuição da ativação simpática periférica com o fumo, enquanto em pacientes com diminuição da atividade barorreflexa o fumo promove aumento da ativação simpática periférica. Desta forma, a sensibilidade barorreflexa foi maior em indivíduos tabagistas saudáveis do que em tabagistas com angina estável(47), sugerindo que os efeitos do tabagismo e da nicotina podem ser diferentes de acordo com a população estudada e com as condições de base. Pacientes mais idosos, hipertensos, diabéticos ou com doença cardíaca tem atenuação do barorreflexo, podendo ser esse um dos mecanismos para o aumento do risco cardíaco associado ao tabagismo nesses grupos(48).

O SRAA também é afetado pelo tabagismo, com aumento de aldosterona e atividade da enzima conversora de angiotensina por provável efeito de elevações do hormônio adrenocorticotrófico induzidas pela nicotina no aumento da liberação de aldosterona. O tabagismo crônico estimula a atividade de renina plasmática e aumenta os níveis plasmáticos de aldosterona(49).

1.5 Nicotina e doença renal

Os efeitos da nicotina já foram investigados em diversos modelos de lesão renal, incluindo lesão renal aguda, DRC, diabetes e doenças glomerulares.

A nicotina é capaz de estimular a EMT e, em células brônquicas, já foi visto que a nicotina atua via Wnt3a/ β -catenina, com consequente regulação da expressão de TGF- β e indução de EMT(50). A nicotina também é capaz de induzir estresse oxidativo em diversos tipos celulares, promovendo a produção de ROS por macrófagos e o aumento da peroxidação lipídica no fígado, além de estar associada a depleção de antioxidantes, com a diminuição da atividade de GSH em fígado e pulmão(44, 51, 52).

Estudos em animais demonstram que a nicotina aumenta o estresse oxidativo renal ao suprimir as respostas antioxidantes no rim e ao afetar adversamente a função mitocondrial e a produção de ROS nas mitocôndrias no túbulo proximal(53). Em modelo de isquemia-reperfusão em ratos, a exposição crônica a nicotina por via oral provocou alterações morfológicas e de função renal, relacionadas ao aumento dos marcadores de estresse oxidativo(54). A exposição crônica a nicotina é capaz de exacerbar a lesão de isquemia-reperfusão renal pelo aumento da expressão de marcadores de estresse oxidativo tanto “in vitro” quanto “in vivo”(53, 55).

A exposição crônica a nicotina também pode aumentar a expressão de citocinas inflamatórias, levando ao aumento de TGF- β , proteína quimiotratora de monócitos (MCP-1), actina α de músculo liso (α -SMA) e fibronectina em animais submetidos a isquemia renal após exposição por 4 semanas a nicotina(56).

Figura 1.6 (adaptada) – Esquema ilustrativo da produção do fator de transformação do crescimento – beta (TGF-β) e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) induzidas pela nicotina(57)

Em modelo de nefrectomia 5/6, animais expostos cronicamente a nicotina tiveram aumento da excreção protéica e piora da lesão glomerular, com aumento da expressão de TGF-β, fibronectina e NADPH oxidase 4. Esses efeitos foram atenuados pela administração de um bloqueador do α7-nAChR, sugerindo um papel importante desses receptores(43).

Em um modelo animal de nefropatia diabética, camundongos *db/db* expostos via oral por 10 semanas a 100 mcg/mL de nicotina também apresentaram aumento da proteinúria, da hipertrofia glomerular e da área mesangial, acompanhados de aumento da NADPH oxidase 4 e de nitrotirosina(51).

Em ratos, a exposição a nicotina por 14 dias após indução de nefrite resultou em maior liberação de mediadores inflamatórios e marcadores de injúria glomerular, o que também foi confirmado “in vitro” (58).

Ao ligar-se ao α7-nAChR a nicotina é capaz de estimular a fibrogênese através do aumento da produção de TGF-β, inibir a apoptose e aumentar a produção de interleucina 8 (IL-8). A nicotina estimula de maneira autócrina a função dos fibroblastos através da ativação de TGF-β, sendo capaz de aumentar a produção de vimentina, fibronectina, alfa-SMA e de colágeno. “In vivo”, a nicotina é capaz de aumentar a produção de colágeno e a ativação de

fibroblastos em diversos tecidos, como coração, pulmão, gengiva, próstata e articulações(57).

Desta forma, quando administrada cronicamente, a nicotina está relacionada a liberação de ROS, fibrose e progressão de doença renal, sendo responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos renais deletérios associados ao tabagismo.

1.6 O gene *klotho* (KI)

Durante um estudo de modelos experimentais de hipertensão sal sensível por aumento da expressão do trocador sódio-próton tipo I, o cruzamento de animais transgênicos resultou em camundongos mutantes que apresentavam um fenótipo semelhante ao envelhecimento humano. Esses mutantes (*kl/kl*) foram denominados *klotho*, deusa grega responsável por tecer o fio da vida, mesmo nome dado ao gene posteriormente identificado. O gene *klotho* teve o seu locus interrompido não intencionalmente, por uma mutação insercional, resultando num alelo fortemente hipomórfico(59, 60).

Os animais *kl/kl* apresentam retardo de crescimento, alterações cognitivas, perda de audição, calcificação vascular, hipertrofia cardíaca, enfisema pulmonar, osteopenia, calcificação ectópica e atrofia do timo, do tecido adiposo, da pele e da musculatura esquelética(59, 60).

Esse fenótipo se apresenta somente em animais homozigotos para esse transgene e sua transmissão segue o padrão de herança mendeliana. O background genético do camundongo *klotho* inicial era uma mistura de C57BL/6J e C3H/J. Esses animais *kl/kl* se desenvolvem normalmente até 3-4 semanas de vida, quando começam a apresentar retardo de crescimento, se tornam gradualmente menos ativos, e morrem prematuramente com aproximadamente 8-9 semanas de vida. Sua sobrevivência média é de 60,7 dias e não sobrevivem mais do que 100 dias. Os órgãos genitais externos, testículos, úteros e ovários desses animais são atrofizados e eles são incapazes de se reproduzir(59).

Figura 1.7 – Animais *kl/kl* apresentam fenótipo semelhante ao envelhecimento humano. Na foto, animal *kl/kl* comparado com “wild-type”, ambos com 6 semanas de vida

O timo desses animais é normal nos estágios iniciais do desenvolvimento, mas se tornam atróficos, um achado também observado durante o envelhecimento normal de humanos e de camundongos. Na aorta é possível identificar calcificação extensa da camada média e espessamento da íntima. As pequenas artérias intrarrenais também sofrem extensa calcificação. Calcificação ectópica também pode ser observada em diversos órgãos dos animais *kl/kl*. Esses animais apresentam ainda osteopenia, com diminuição do número de osteoblastos e osteoclastos, atrofia da pele, enfisema e anormalidades da glândula hipófise(59, 61).

Os animais *kl/kl* tem níveis aumentados de cálcio e fósforo, com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ anormalmente aumentada, por provável aumento da expressão de $1-\alpha$ -hidroxilase. Os níveis de paratormônio (PTH) são mais baixos e de calcitonina discretamente maiores do que os animais selvagens, compatíveis com os níveis de cálcio e fósforo e sugestivos de vias de sinalização independentes do *Klotho* para esses hormônios(62). Acredita-se que a hiperfosfatemia seja a principal alteração responsável pelo envelhecimento nesses animais, visto que a deleção dos canais sódio-fosfato 2a (*NaPi2a*), com redução da reabsorção de fósforo e do seu nível sérico, é capaz de resgatar o fenótipo desses animais, mesmo com o consequente aumento dos níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e cálcio(62, 63). Os animais heterozigotos para esse transgene

($Kl^{+/-}$) tem fenótipo semelhante aos seus correspondentes selvagens, mas apresentam níveis da proteína Klotho diminuídos(64).

O gene murino klotho codifica uma proteína transmembrana tipo 1 que consiste de uma sequência N-terminal, um domínio extracelular composto de 2 repetições internas (mKL1 e mKL2), um domínio transmembrana e um domínio intracelular curto. Homólogos são encontrados em humanos e em ratos. As repetições extracelulares exibem homologias com as beta-glicosidases. O RNA mensageiro (RNAm) do klotho é predominantemente expresso nos túbulos renais distais e no plexo coróide(62). A expressão do gene pode ser detectada na hipófise, placenta, músculo esquelético, bexiga, aorta, pâncreas, testículos, ovários, cólon e glandulati-reóide, mas em menor quantidade do que no cérebro e no rim(59). O DNA complementar (cDNA) do klotho humano codifica uma proteína de 1012 aminoácidos que mostra uma identidade de 86% com a proteína klotho do camundongo e a localização cromossômica é 13q12(59). Essa proteína transmembrana age como um co-receptor, convertendo os receptores de fator de crescimento fibroblástico em receptores específicos para fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), promovendo balanço negativo de fósforo por inibição da síntese da $1,25(OH)_2D_3$ e indução de fosfatúria(60, 65). Sem o Klotho, o FGF-23 não consegue, em concentrações fisiológicas, se ligar e ativar o seu receptor(63).

Figura 1.8 (adaptada) – Ações da proteína klotho em suas formas transmembrana e secretada. A forma transmembrana atua como co-receptor do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), promovendo fosfatúria e diminuição do calcitriol. A forma secretada age a distância, interferindo em vias de sinalização intra-celulares(66)

Outros órgãos, que também apresentam alterações nos mutantes, não apresentam transcritos de klotho detectáveis por “real time-PCR”, como pulmões, pele e osso, sugerindo um efeito hormonal da proteína Klotho(59). A proteína Klotho pode ser localizada na membrana celular, mas o seu domínio extracelular pode ser clivado por uma protease ancorada a membrana ADAM10/17, liberando uma forma secretada na corrente sanguínea, urina e líquido(60).

A forma secretada, chamada também de α -Klotho, funciona como uma enzima semelhante a β -galactosidase, que regula a atividade e o tempo de retenção na superfície celular de canais iônicos e proteínas transportadoras. Dessa forma, o Klotho solúvel modula os canais de cálcio receptor de potencial transiente vanilóide tipo 5 (TRPV5), os co-transportadores NaPi-2a e o canal de potássio (ROM-K)(60, 65). O Klotho secretado atua sobre os canais ROM-K, evitando a sua internalização e promovendo uma maior secreção tubular de K(67).

Figura 1.9 (adaptada) – Ação de β -galactosidase da proteína Klotho na modulação do canal de cálcio receptor de potencial transiente vanilóide tipo 5 (TRPV5)(66)

Além disso, já foi demonstrado que a proteína Klotho secretada é capaz de regular múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo insulina/IGF1 e Wnt(68). A α -klotho é capaz de inibir a cascata de sinalização intracelular via IGF1/insulina. Na ausência da estimulação do receptor de IGF1/Insulina, há uma redução da fosforilação do fator de transcrição “forkhead box O” (FOXO). Dessa forma, a proteína Klotho é capaz de aumentar a resistência ao estresse

oxidativo, pois ao inibir a fosforilação do FOXO permite a sua translocação nuclear e ligação a região promotora dos genes da SOD e da catalase, aumentando a sua expressão e facilitando, assim, a remoção das ROS(68, 69). Animais transgênicos que tem expressão aumentada de klotho são capazes de sobreviver após a injeção de quantidades letais de paraquat, um liberador potente de ROS(69).

Figura 1.10(adaptada) – Regulação dos fatores de transcrição FOXO pela sinalização via IGF1/insulina. A: A ligação da insulina/IGF1 aos seus receptores leva a uma ativação da Akt, que fosforila o FOXO, tornando-o inativo e impedindo a sua entrada no núcleo. B: Na ausência desse estímulo, o FOXO não fosforilado é capaz de entrar no núcleo e promover a transcrição dos genes da catalase e da SOD2(68)

A proteína Klotho também atua na regulação da fibrogênese, através da modulação da sinalização via Wnt por ligação direta, já que a interação Wnt-Klotho suprime a atividade biológica da Wnt. Dessa forma, o Klotho é capaz de normalizar as alterações de ciclo celular e reduzir a produção de TGF- β induzidas por essa via de sinalização, que tem papel importante na estimulação da fibrose em diversos tecidos(68, 70).

1.7 Klotho e rim

Apesar de ser expresso em vários tecidos, o klotho tem a sua expressão particularmente alta no rim, principalmente nas células do túbulo distal(60). Na DRC, a transcrição renal de klotho é marcadamente diminuída em diversas etiologias, como nefropatia obstrutiva, nefropatia diabética e glomerulonefrites crônicas. Em humanos, os níveis séricos de Klotho se correlacionaram em

voluntários sadios com a creatinina sérica, a uréia e o FGF-23, embora a dosagem em estudos com pacientes renais crônicos ainda tenha resultados controversos. Os níveis urinários da proteína Klotho diminuem precocemente em pacientes com DRC(60).

A deficiência transitória de Klotho já foi identificada em diversos modelos experimentais de lesão renal aguda(60), incluindo isquemia-reperfusão(64, 71), obstrução ureteral(72), sepse, hipovolemia e nefrotoxicidade por cisplatina(73).

Na lesão de isquemia-reperfusão, ocorre uma diminuição dos níveis de Klotho, que se reverte em após a recuperação. Além disso, níveis mais baixos de Klotho exacerbam a lesão renal e sua administração exógena permite uma atenuação da lesão renal(64).

A depleção de Klotho é capaz de promover a senescência das células epiteliais renais e a sua suplementação bloqueia o envelhecimento induzido por estresse oxidativo(74). Num modelo de doença glomerular por mutação genética, o aumento da expressão de Klotho promoveu uma redução das células senescentes, da apoptose e do estresse oxidativo no tecido renal(75).

Os camundongos *kl/kl* tem fibrose tubulointersticial, associada a um aumento dos níveis renais de TGF- β . Em modelo de obstrução ureteral, animais *Kl^{+/-}* tiveram piora da fibrose renal e maiores níveis de TGF- β e fibronectina, alterações atenuadas pela administração de Klotho, através da sua atuação como regulador negativo da sinalização via Wnt(70, 72, 73).

Acredita-se que o Klotho, desta forma, exerça uma função de renoproteção por diversos mecanismos, incluindo citoproteção direta, promoção de reparo regenerativo e inibição de fibrose(73).

Figura 1.11 (adaptada) – Mecanismo proposto para os efeitos benéficos do Klotho na lesão renal aguda(73)

O SRAA, que tem um papel importante na progressão da doença renal e em suas complicações, também se correlaciona com o Klotho. A ang-II é capaz de reduzir a expressão renal do gene klotho, via receptor AT1 de maneira independente da pressão arterial(76, 77). Por outro lado, a indução da proteína Klotho em animais foi capaz de atenuar a lesão renal causada por infusão de ang-II(78).

1.8 Nicotina e klotho

O tabagismo é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças relacionadas à idade, presentes nos animais *kl/kl*, como enfisema(79), osteopenia, calcificação vascular e envelhecimento cutâneo(80). Em mulheres, já foi evidenciado que o tabagismo se associa a uma perda de comprimento dos telômeros, sugerindo um efeito de envelhecimento acelerado relacionado ao tabagismo(81).

Além disso, a diminuição da expressão de Klotho parece ter efeitos pró-fibróticos, assim como a exposição crônica a nicotina, sugerindo um possível papel do gene klotho nos efeitos deletérios do tabagismo ou uma potencialização da injúria renal em situações de deficiência de Klotho.

Apesar de não existirem ainda estudos avaliando diretamente a associação entre klotho e tabagismo ou exposição a nicotina, tem surgido na literatura alguns relatos que sugerem essa possibilidade. Em um estudo que avaliou os níveis de Klotho em gestantes, além de evidenciarem uma redução do Klotho em casos de infecção de líquido amniótico, nas pacientes sem infecção, os níveis de Klotho foram menores em mulheres tabagistas. Os autores fazem a hipótese de que os efeitos relacionados ao envelhecimento associado ao cigarro possam estar relacionados a uma diminuição do Klotho(82).

Em outro estudo, utilizando uma população de pacientes com DRC, os níveis de FGF-23 se associaram significativamente com tabagismo e os autores consideram que o tabagismo diminui de alguma forma a sensibilidade

ao FGF-23, pois os pacientes tabagistas mantêm níveis semelhantes de fósforo, mesmo com níveis mais altos de FGF-23(83).

2 Objetivos

1. Avaliar se a exposição crônica a nicotina altera os níveis renais de Klotho
2. Avaliar os efeitos renais e hemodinâmicos da exposição crônica a nicotina
3. Avaliar os efeitos renais e hemodinâmicos da exposição crônica a nicotina associada à deficiência de klotho

3 Métodos

3.1 Animais e genotipagem

Foram utilizados camundongos com 8 a 12 semanas, haploinsuficientes para o gene *klotho* ($KI^{+/-}$) e “wildtype” ($KI^{+/+}$), com “background” genético resultante da mistura de C57BL/6J e C3H/J, cedidos pelo Prof Dr Makoto Kuro-o (University of Texas Southwestern Medical Center, EUA) e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais utilizados no estudo resultaram do cruzamento dos camundongos $KI^{+/-}$ e foram identificados, após desmame, por genotipagem. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com até 5 animais, com livre acesso a água limpa (trocada diariamente) e dieta padrão cedida pelo Biotério Central (Nuvilab®, Curitiba, Brasil). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 09 de fevereiro de 2012, protocolo 368/11.

A genotipagem dos animais foi realizada no Biotério Central por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)(59), através de fragmentos da cauda.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- a. Grupo 1 (SAC++): Animais $KI^{+/+}$ que receberam sacarina 2% por 28 dias
- b. Grupo 2 (SAC+-): Animais $KI^{+/-}$ que receberam sacarina 2% por 28 dias
- c. Grupo 3 (NIC++): Animais $KI^{+/+}$ que receberam nicotina 200 mcg/mL em sacarina 2% por 28 dias
- d. Grupo 4 (NIC+-): Animais $KI^{+/-}$ que receberam nicotina 200 mcg/mL em sacarina 2% por 28 dias

3.2 Exposição crônica a nicotina

Os camundongos dos grupos NIC++ e NIC+- receberam nicotina (*Sigma-Aldrich*, MO, EUA) adicionada a sacarina a 2% (*Labsynth*, SP, Brasil)

diluída em água por 28 dias consecutivos. A concentração de nicotina inicial foi de 50 µg/mL, sendo aumentada a cada 3 dias em 50 µg/mL até uma concentração de 200 µg/mL que foi mantida até o final do experimento(84). A nicotina diluída foi administrada em bebedouros de vidro protegidos da luz e foi trocada a cada 2 dias, de acordo com relatos anteriores de que não há perda significativa de nicotina da solução nesse intervalo de tempo(84). Os grupos SAC++ e SAC+- recebiam pelo mesmo período, e em bebedouros semelhantes, sacarina a 2% diluída em água.

Figura 3.1 – Representação esquemática do protocolo de exposição a nicotina ou sacarina

3.3 Gaiola metabólica

Ao final de 4 semanas, os animais dos 4 grupos (n=8/grupo) foram colocados em gaiolas metabólicas (*Tecniplast*, VA, Itália) por 24 horas, sendo mantidas as administrações de sacarina ou nicotina nesse período. Antes, e após o período de permanência em gaiola, os animais foram pesados. Após 24 horas, foram quantificados o volume de líquido ingerido, o peso da comida

ingerida e o volume urinário dos animais. A urina de 24 horas foi armazenada a -80°C , após centrifugação, para análises descritas posteriormente.

Figura 3.2 – Modelo de gaiola metabólica utilizada para quantificação do volume ingerido, quantificação e coleta da diurese por 24 horas

3.4 **Sacrifício e coleta de plasma**

Ao final do experimento os animais ($n=10/\text{grupo}$) foram sacrificados após anestesia com cetamina 100 mg/kg intraperitoneal associada a xilazina 10 mg/kg intraperitoneal, seguida de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue, coletado em seringas heparinizadas, era mantido em gelo e centrifugado a 4°C por 15 minutos a 1000 g, dentro de até 30 minutos da coleta, para separação do plasma, que foi imediatamente armazenado a -80°C para realização das dosagens descritas a seguir. Os rins foram retirados e armazenados de acordo com as condições específicas para análises, também descritas posteriormente.

3.5 **Medida da taxa de filtração glomerular (TFG)**

Um novo grupo de animais ($n = 5/\text{grupo SAC++}$ e SAC+- e $n=6/\text{grupo NIC++}$ e NIC+-) foi utilizado para mensuração da TFG através da depuração de inulina marcada com fluoresceína isotiocianato (FITC-inulina) (*Sigma-Aldrich*,

MO, EUA), também após 28 dias de exposição à nicotina ou veículo(85). Os animais foram submetidos à anestesia de curta duração, em caixa anestésica com isoflurano a 3% sob fluxo de oxigênio, para injeção retro-orbitária de “bolus” único da solução de FITC-inulina dialisada (2 μ L/g de peso do animal) com uma agulha de 13 x 4,5 mm acoplada a uma seringa de 100 μ L (*Hamilton Company*, NV, EUA). Em seguida, foi realizado corte de 1 mm na cauda do animal, para coleta de sangue nos tempos 3, 5, 7, 10, 15, 35, 56 e 75 min em minicapilares heparinizados (*Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG*, Eberstadt, Alemanha). As amostras eram protegidas da luz durante todo o período de processamento. Após a coleta, o sangue foi transferido do capilar para um tubo de polipropileno de 0,3 mL e centrifugado por 5 min a 4000 rpm. De cada amostra foram retirados 2 μ L de plasma, que foi diluído em 18 μ L de 0,5 mol/L HEPES (pH 7.4), sendo utilizados 2 μ L de cada amostra diluída para leitura da fluorescência com o aparelho Nanodrop 3300 (*ThermoScientific*, DE, EUA), em duplicatas.

Antes do uso, a FITC-inulina foi pesada e diluída em solução de NaCl 0,9% (100 mg FITC-inulina para 2 μ L de NaCl 0,9%) e dialisada através de uma membrana (Spectra/Pro 6, *Spectrum Laboratories*, CA, EUA) por 24 horas contra 1000 mL de solução de NaCl 0,9%, em recipiente protegido da luz, sobre agitador magnético. A concentração final de FITC-inulina foi calculada pela fórmula: $c = n/V$, onde n = volume da solução de FITC-inulina inicial, V = volume final (diferença de peso da membrana de diálise contendo a inulina antes e após da diálise + volume da solução inicial de FITC-inulina).

Para o cálculo da TFG foi analisada a concentração de FITC-inulina em amostras com concentração conhecidas, diluídas em plasma de animais do mesmo “background” e 0,5 mol/L HEPES (pH 7.4) para construção de curva padrão com 7 pontos. A TFG de cada animal, em μ L/min, foi calculada após construção de equações de decaimento exponencial em duas fases, conforme exemplo da Figura 3.1, através do *software Graphpad Prisma 6.0*, utilizando a seguinte fórmula: $TFG = n/(A/K1 + B/K2)$, onde n = quantidade de FITC-inulina injetada ($n = c \times V$, onde c = concentração de FITC-inulina, V = volume injetado), A = Span1, ponto de intersecção de y na fase de eliminação, $K1$ = constante de decaimento para fase de eliminação, B = Span2, ponto de

intersecção de y na fase de distribuição
 K_2 = constante de decaimento para fase de distribuição.

Exemplo de curva de decaimento de FITC-inulina

Figura 3.3 – Exemplo de curva de decaimento exponencial em duas fases utilizada para cálculo da taxa de filtração glomerular após injeção de dose única de FITC-inulina. Span1= ponto de intersecção de y na fase de eliminação, K_1 = constante de decaimento para fase de eliminação, Span2 = ponto de intersecção de y na fase de distribuição, K_2 = constante de decaimento para fase de distribuição, FITC-inulina = inulina ligada a fluoresceína

3.6 Avaliação hemodinâmica

Após o mesmo período de 28 dias, outros 7 animais por grupo foram submetidos a canulação da artéria carótida e da veia jugular interna para a realização de medidas hemodinâmicas diretas. Após anestesia com cetamina 100 mg/kg e xilasina 10 mg/kg intraperitoneal, cateteres de polietileno de 4 cm (tygon PE-08, ClayAdams) conectados a cateteres de 2 cm (tygon PE-50, CLayAdams) e preenchidos com soro fisiológico heparinizado, foram inseridos na artéria carótida e na veia jugular para registro direto da pressão arterial e para administração de drogas, respectivamente, sendo fixados por fio de algodão. As extremidades livres das cânulas, após passagem subcutânea, foram exteriorizadas na região cervical posterior (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Camundongo submetido a canulação da artéria carótida e da veia jugular. Após a canulação as extremidades dos catéteres foram exteriorizadas na região cervical posterior

Um dia após a canulação, as medidas hemodinâmicas foram realizadas. Com o animal acordado, o cateter arterial foi conectado a uma extensão de 20 cm, permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi então conectada a um transdutor eletromagnético (DPT-100, DELTRAN® I) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (*General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.*). Os registros de pressão pulsátil foram realizados com tempo de 60 minutos, dos quais foram aproveitados os 15 minutos mais estáveis, fornecendo valores diretos da pressão arterial em todos os grupos experimentais. O sinal analógico da pressão arterial foi convertido para digital (*Windaq DI720*), registrado em tempo real em microcomputador com sistema *Dataq*, com frequência de amostragem de 2000 Hz por canal. A análise dos sinais de pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca pelo intervalo de pulso (IP) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Os resultados foram apresentados em valores médios e desvios padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As

planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (*Microsoft®Excel®* 2010 - 14.0.6112.500 64 bits), onde se calcularam a média e desvio padrão da pressão arterial média (PAM), PAS, PAD e IP para cada animal.

Após esse registro inicial, foi realizada a infusão das drogas vasoativas fenilefrina e nitroprussiato de sódio. A fenilefrina (*Sigma Chemical Company*, MO, EUA), um potente estimulador α_1 , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos barorreceptores. O nitroprussiato de sódio (*Sigma Chemical Company*, MO, UA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias e cuja ação se dá por meio da ativação da guanilatociclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosinamono-fosfato (GMP) cíclico na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos barorreceptores.

Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelas respostas taquicárdicas e bradicárdicas mensuradas pelas variações da pressão arterial (compreendendo variações de 30 a 40 mmHg), induzidas por doses crescentes de nitroprussiato de sódio (100–250 ng/kg, intravenoso) e fenilefrina (80–250 ng/kg intravenoso), sendo que a fenilefrina e o nitroprussiato de sódio foram infundidos randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco e após recuperação da injeção anterior. O maior valor injetado foi menor que 25 μ l.

Para avaliação dos índices de bradicardia e taquicardia reflexa o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores basais. De maneira análoga, a resposta da FC às variações de PAM foi comparada com os valores de FC do período imediatamente antes da infusão das drogas. Posteriormente os índices de bradicardia e taquicardia reflexa foram obtidos pela razão entre o delta de variação da FC pelo delta de variação da PAM.

3.7 Análise da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial – análise espectral

Cada batimento cardíaco foi identificado através da utilização de algoritmo implementado no Windaq, que automaticamente realiza a detecção dos intervalos de pulso (R-R da onda do eletrocardiograma ou do evento sistólico da onda do sinal de pressão arterial). Após esta leitura automática foi realizada uma verificação por inspeção visual, para identificar e/ou corrigir alguma marcação não correta. Em seguida gerada a série temporal de cada sinal a ser estudado, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Os dados foram armazenados em arquivos e utilizados posteriormente na análise espectral via transformada rápida de Fourier (FFT), realizada por rotina padrão no programa MATLAB®, o qual detecta a frequência central, número e potência de cada componente. A faixa de frequência de interesse para análise espectral no camundongo encontra-se no intervalo que vai de 00 até 03 Hz.

A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse: alta frequência (HF) entre 0,75 e 3,0 Hz, representando modulação parassimpática, baixa frequência (LF) entre 0,20 e 0,75 Hz, indicadoras de modulação simpática, e muito baixa frequência (VLF) menores que 0,20 Hz. Devido ao nosso tempo de coleta dos sinais de interesse para a análise espectral, esse estudo não abordará as VLF. Também foi calculada, como indicador da modulação vagal no domínio do tempo, a raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos R-R adjacentes (RMSSD) e, como marcador do barorreflexo espontâneo, o índice alfa, calculado como raiz quadrada da relação entre os componentes LF do intervalo de pulso e da pressão arterial.

3.8 Análises bioquímicas

As dosagens plasmáticas e urinárias de uréia, creatinina, sódio, potássio, cálcio ionizado, fósforo e magnésio foram realizadas no aparelho Cobas C111 (*Roche -Diagnostics*, IN, EUA).

Os valores obtidos também foram utilizados para cálculos de frações de excreção de sódio, potássio, magnésio, cálcio e fósforo. As frações de excreção (FE) de cada eletrólito e de uréia foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula: $FE_{eletrólito} = ((U_{eletrólito} / P_{eletrólito})) / (UCr / PCr) \times 100$, onde: $U_{eletrólito}$ = concentração urinária do eletrólito, $P_{eletrólito}$ = concentração plasmática do eletrólito, na mesma unidade em que foi mensurada a concentração urinária deste eletrólito, UCr = concentração urinária de creatinina em mg/dL, PCr = concentração plasmática de creatinina em mg/dL

A osmolalidade urinária foi mensurada pela medida da depressão do ponto de congelamento, através do Osmômetro 3W2 (*Advanced Instruments*, MA, EUA).

3.9 Dosagem de cotinina plasmática e urinária

As concentrações de cotinina foram medidas no plasma e na urina por ELISA, conforme instruções do fabricante (CO096D-100; *Calbiotech Inc*, CA, EUA).

3.10 Extração, quantificação de proteínas e “Western blotting”

Dois terços do rim esquerdo foram colocados em criotubos, acondicionados imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados, a seguir, em freezer a -80°C. Posteriormente, os rins armazenados a -80°C foram homogeneizados em solução de K-Hepes (200 mM/L Manitol, 80 mM Hepes, 41mM/L KOH; pH 7,5) contendo inibidor de proteases (*Cocktail*

Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, MO, EUA). As amostras foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. O homogenato foi centrifugado a 2000g por 15 min a 4°C para remoção das células e resíduos celulares, com utilização do sobrenadante. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (Reagente de Bradford, Bioagency, Hamburgo, Alemanha) com espectrofotômetro.

As amostras de proteínas renais (50 µg) foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida de 8-12% de concentração. Após transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose, as amostras foram tratadas com leite em pó desnatado a 5% diluído em tampão TBS-T (2,42g/L Tris base, 2,92g/L NaCl, 0,336g/L EDTA; pH = 7,5, com 1mL de Tween-20) por 1 hora, e posteriormente incubadas com os anticorpos primários específicos “overnight”, a 4°C (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para "western blotting".

Anticorpos	Referências	Fabricantes
α- ENaC	SPC-403D	Stressmarq, BC, Canadá
α7-nAChR	ab10096	Abcam Inc., MA, EUA
Actina	SC-1615	Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, EUA
AQP2	SC - 9882	Santa Cruz Biotechnology Inc, TX, EUA
AT1	SC - 1173	Santa Cruz Biotechnology Inc, TX, EUA
e-NOS	610296	BD Transduction Laboratories, NJ, EUA
Klotho	KO603	COSMO BIO CO., LTD, Tóquio, JP
NHE3	SPC-400D	Stressmarq, BC, Canadá
NKCC2	SPC-401D	Stressmarq, BC, Canadá
Renina	IN-2	AnaSpec Inc., CA, EUA
ROM-K	ab92285	Abcam Inc., Cambridge, UK
VEGF	SC-7269	Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, EUA

α- ENaC - canal de sódio epitelial α; α7-nAChR - receptor nicotínico da acetilcolina α7; AQP2 - aquaporina 2; AT1 - receptor da angiotensina II tipo 1; e-NOS - óxido nítrico sintetase endotelial; NHE3 - trocador sódio-hidrogênio tipo 3; NKCC2 - cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻; ROM-K - canal de potássio da medula externa renal; VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

No dia seguinte foi realizada a incubação com anticorpo secundário específico, anti-coelho 1:2000, anti-cabra 1:10.000, anti-camundongo 1:2.000 (*Sigma-Aldrich*, MO, EUA) ou anti-rat 1:2000 (*DAKO*, Tóquio, Japão) em temperatura ambiente, por 1 hora. A marcação foi feita através da peroxidase ligada ao anticorpo conjugado secundário, usando sistema de

quimioluminescência (ECL, GE Healthcare Limited, Little Chalfont, UK). As imagens foram geradas por exposição ao aparelho Alliance 4.2 (UVITEC, Cambridge, UK). As bandas obtidas foram analisadas (Image J, NIH Image, EUA), com realização das densitometrias. As bandas foram normalizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina e os resultados apresentados como porcentagem em relação ao grupo controle.

3.11 Reação em cadeia da polimerase quantitativa – qPCR

As amostras de tecido renal correspondentes a 1/3 do rim esquerdo foram armazenada a -80°C e posteriormente submetidas a extração de RNA, adicionando-se 1 mL do reagente TRIzol® (*Life Technologies*, CA, EUA) para cada 50 mg de tecido com homogeneização em Polytron, adição de 200 µL de clorofórmio ao homogenato e centrifugação e separação de fases. O RNA foi transferido para tubos plásticos de 2 ml para precipitação, lavagem e ressuspensão. As concentrações de RNA de cada amostra foram dosadas no Nanodrop 2000 (*ThermoScientific*, DE, EUA).

Fitos únicas de c-DNA foram sintetizadas a partir das amostras de RNA isolado utilizando-se o reagente SuperScript® VILO™ MasterMix (*Invitrogen, Life Technologies*, CA, EUA) na proporção de 4 µL do reagente para até 2,5 µg de RNA. A reação em cadeia da polimerase (qPCR) foi realizada por ensaio de TaqMan® (*Applied Biosystems, Life Technologies*, CA, EUA), utilizando-se sonda específica para *klotho* (Mm00502002_m1), com controle por sonda para GAPDH (Mm99999915_g1). Todas as reações foram realizadas em duplicata e com controles negativos para cada sonda, utilizando-se o equipamento StepOne Plus® (*Applied Biosystems, Life Technologies*, CA, EUA) e com ciclagem em 4 etapas: 2 min a 50°, 10 min a 95°, 40 ciclos de 15 segundos a 95° e 1 min a 60°. Os valores de Ct (ciclo limiar) do gene alvo foram normalizados pelos valores de Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct_{alvo} - Ct_{referência}$). Como o Ct do gene referência permanece constante, a alteração no valor do ΔCt corresponde a uma variação na expressão do gene alvo. O valor de $\Delta\Delta Ct$ foi obtido pela comparação do valor de ΔCt de amostras

desconhecidas com o ΔCt de uma amostra controle, sendo a expressão gênica quantificada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados foram apresentados como porcentagem do grupo controle (SAC++).

3.12 Imunohistoquímica

O rim D após ser retirado foi fixado em formalina a 10% por 24h, colocado em álcool a 70% e posteriormente emblocado em parafina. Foram realizados cortes histológicos e confecção de lâminas em branco para imunohistoquímica. As lâminas em branco cortadas a partir dos blocos em parafina foram desparafinizadas e submetidas à reação de imunohistoquímica. Os cortes de tecido renal foram incubados com anticorpos anti-fibronectina FN1 (*Sigma-Aldrich*, MO, EUA) na diluição 1:500 por um período de 18 horas à temperatura de 4° C (“overnight”). O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA) e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primário e secundário em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz.

Para avaliação da imunorreação, as proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, determinadas pelo limite de cor, foram obtidas pela análise de imagem usando o software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (*Media Cybernetics*, Silver Spring, MD, EUA) em um computador compatível ligado a uma câmera digital acoplada a um microscópio (Carl ZeissAxioskop 40, Eching, Alemanha). A proporção de volume é expressa como a área positiva (μm^2) dividida pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagens(86).

3.13 Marcadores de estresse oxidativo

Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): Após a dosagem de proteínas no tecido renal pelo método de Bradford, foram adicionados 1 mL do homogeinato com 1,0 a 1,8 mg de proteínas a 1 mL de TCA 17,5% e deixada a mistura no gelo. A seguir foi adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0.6%), pH 2,0 e o homogeinato foi colocado em banho de água fervendo por 15 minutos, sendo, a seguir, colocado novamente no gelo. Adicionou-se 1 mL de TCA 70% e a mistura foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi, então, centrifugada por 15 minutos a 2000 rpm, com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 534 nm. A quantidade de TBARS, foi expressa em nanomoles e foi calculada usando coeficiente de extinção molar equivalente ao do MDA, ou seja, $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A quantidade de TBARS renal foi expressa em nmol por mg de proteína (nmol/mg).

Determinação da glutathiona reduzida (GSH): Para avaliar as concentrações de GSH, os homogeinatos (0,2 g tecido em 5 mL de KCl 1,15% gelado) foram diluídos em água (1:4) e precipitados com TCA 50% e, em seguida, centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Um volume de 2 mL de tampão Tris 400 mM e 0,1 mL de DTNB foram adicionados a uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 15 min e, então, lidas em 412 nm com uma curva padrão de cisteína nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 nmol/mL. Os resultados foram expressos em nmol GSH/g de proteína. A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford.

3.14 Dosagem de paratormônio (PTH)

Para dosagem de PTH intacto, os plasmas, obtidos conforme descrito anteriormente, foram analisados em duplicata por ELISA através do Kit CEA866Mu (*Life Science Inc.*, FL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.15 Dosagem de fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23)

O FGF-23 intacto plasmático foi dosado por ELISA em duplicata de acordo com as instruções do kit 60-6800 (*ImmunotopicsInternational*, CA, EUA).

3.16 Dosagem de hormônio antidiurético (ADH)

Para dosagem de ADH, os plasmas foram analisados em duplicata por ELISA através do Kit CEB139Mu (Life Science Inc., FL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.17 Dosagens de citocinas no tecido renal

Foram estudadas as seguintes citocinas no tecido renal: interleucina 12 (IL-12(p70)), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), MCP-1, interleucina 10 (IL-10) e interleucina 6 (IL-6), utilizando o kit *Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay* (Biorad, CA, EUA), com o equipamento *Bio-plex 200 Systems* (Biorad, CA, EUA), conforme descrito pelo fabricante.

3.18 Dosagem de aldosterona plasmática

Os níveis plasmáticos de aldosterona foram medidos por radioimunoensaio em duplicatas, utilizando-se o kit *RIA Aldosterone* (*Immunotech*, Marselha, França), de acordo com instruções do fabricante.

4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *GraphPad Prism 6.0* (*GraphPad Software Inc*, CA, EUA) com cálculo de média e erro-padrão médio para as diversas variáveis estudadas, e comparações entre os 4 grupos por análise de variância (ANOVA), com Tukey como pós-teste. Comparações entre 2 grupos foram realizadas utilizando o teste t de Student. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Genotipagem

A genotipagem dos animais foi realizada no Biotério Central da FMUSP por PCR, através de fragmentos da cauda. Os alelos “wild-type” (WT) e mutante foram detectados respectivamente em 458 bp e 920 bp (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Exemplo de genotipagem evidenciando os alelos mutante e “wild-type”(WT). Os camundongos $KI^{+/+}$ apresentam os dois alelos, enquanto os kI/kI apresentam somente o alelo mutante

5.2 Exposição à nicotina

Os animais expostos a nicotina apresentaram níveis plasmáticos e urinários de cotinina semelhantes aos relatados em estudos prévios e dentro da faixa encontrada em tabagistas (102.90 ± 5.56 ng/mL)(43, 51, 55). Os animais do grupo NIC+/- apresentaram níveis plasmáticos de cotinina maiores do que os animais do grupo NIC++, e níveis de cotinina urinária em 24 horas discretamente menores (Tabela 2).

Tabela 2 - Dosagens de cotinina.

	SAC ++	SAC +/-	NIC ++	NIC +/-
Cotinina plasmática (ng/mL)	-	-	90,98 ± 7,9	115,3 ± 5,7*
Cotinina urinária (ng/24h)	-	-	14100 ± 1996	11320 ± 1619

Resultados apresentados como média ± erro padrão médio. n = 6/grupo.

* $P < 0,05$ vs NIC ++

Os pesos inicial e final dos animais foram semelhantes entre os 4 grupos. O consumo de dieta em 24 horas também foi igual entre os grupos. O consumo de líquidos em 24 horas foi semelhante entre os grupos e a variação de peso no período de 24 horas na gaiola metabólica também não foi diferente entre os animais. A diurese em 24 horas foi menor no grupo NIC++ quando comparado ao seu controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados da gaiola metabólica.

	SAC ++	SAC +/-	NIC ++	NIC +/-
Peso				
inicial (g)	23 ± 0,91	23,8 ± 0,95	22,55 ± 0,74	23,8 ± 0,67
final (g)	25,15 ± 1,08	25,65 ± 0,69	23,3 ± 0,71	25,45 ± 0,93
Consumo de dieta por peso em 24h (g/g peso)	0,12 ± 0,006	0,11 ± 0,007	0,11 ± 0,008	0,11 ± 0,008
Diurese em 24h (mL/g)	0,05 ± 0,005	0,04 ± 0,003	0,03 ± 0,003*	0,04 ± 0,005
Consumo líquido por peso em 24h (mL/g)	0,14 ± 0,009	0,16 ± 0,005	0,14 ± 0,024	0,14 ± 0,014

Resultados apresentados como média ± erro padrão médio. n = 10/grupo.

* $P < 0,05$ vs SAC++.

5.3 Função renal e eletrólitos

Assim como o volume urinário, a TFG ($\mu\text{L}/\text{min}$) dos animais $\text{KI}^{+/+}$ diminuiu no grupo exposto a nicotina (SAC++ 191,7 ± 6,8 vs NIC++ 161,5 ± 5,4, $P < 0,01$). Nos animais $\text{KI}^{+/-}$, a TFG não se alterou nos animais expostos a nicotina (NIC+- 177,2 ± 5,6) em relação aos não expostos (SAC+- 175,2 ± 8,5). A comparação entre os 2 grupos expostos a nicotina mostrou uma maior TFG no grupo NIC+- (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Taxa de filtração glomerular (TFG) medida por depuração de inulina marcada com FITC. A – A TFG não foi diferente entre os animais não expostos a nicotina; $P = 0,2$. B – A TFG reduziu-se nos animais $KI^{+/-}$ expostos a nicotina (NIC++); $P < 0,01$. C – Nos animais $KI^{+/-}$ expostos a nicotina a TFG se manteve; $P = 0,86$. D – Comparação dos animais expostos a nicotina evidencia tendência a menor TFG no grupo NIC++; $P = 0,07$

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de creatinina (Cr, mg/dL) entre os grupos (SAC++ $0,13 \pm 0,01$; SAC+- $0,1 \pm 0$; NIC++ $0,1 \pm 0$; NIC+- $0,1 \pm 0$; $P = 0,08$) e a depuração de Cr (mL/min/100g peso animal) foi de $1,17 \pm 0,10$ para o grupo SAC++, de $1,16 \pm 0,13$ para o grupo SAC+-, de $1,11 \pm 0,07$ para o grupo NIC++ e de $1,33 \pm 0,10$ para o grupo NIC+- ($P = 0,45$). Os níveis plasmáticos de ureia (mg/dL) foram maiores no grupo NIC+- quando comparado ao grupo SAC+- (SAC+- $48,3 \pm 8,25$ vs NIC+- $60,0 \pm 8,62$; $P < 0,05$). Não houve diferença na comparação dos demais grupos (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Níveis plasmáticos de ureia. A – A ureia plasmática foi semelhante entre os dois grupos não expostos a nicotina. B – A ureia plasmática foi semelhante entre os grupos SAC++ e NIC++; $P = 0,18$. C – Nos animais KI^{+/-} os níveis de ureia foram maiores no grupo exposto a nicotina, $*P < 0,05$ vs SAC+-. D – Não houve diferença significativa na ureia plasmática quando comparados os dois grupos expostos a nicotina, $P = 0,5$

A proteinúria de 24 horas (mg/24h) foi maior no grupo NIC+- ($0,19 \pm 0,03$) comparado ao grupo NIC++ ($0,10 \pm 0,01$), e não apresentou diferenças nos grupos SAC+- ($0,13 \pm 0,01$), NIC++ ($0,10 \pm 0,01$) e NIC+- quando comparados ao grupo SAC++ ($0,15 \pm 0,02$), como pode ser visto na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Os camundongos deficientes em klotho excretam mais proteína quando expostos a nicotina do que os camundongos $Kl^{+/+}$. Proteinúria de 24 h em gramas = Proteína urinária (g/dL) x Volume urinário 24h (dL). A - Proteinúria de 24h semelhante entre os grupos não expostos a nicotina. $P = 0,7$. B - Proteinúria de 24h apresenta uma tendência a redução no grupo NIC++ quando comparado ao seu grupo controle (SAC++), $P = 0,06$. C – A proteinúria de 24 h não se altera quando camundongos $Kl^{+/-}$ expostos a nicotina são comparados com os respectivos controles, $P = 0,31$ respectivamente. D - Animais deficientes em klotho (NIC+-) tem proteinúria de 24h maior que animais $Kl^{+/+}$ (NIC++) quando expostos a nicotina, * $P < 0,05$ vs NIC++

Os eletrólitos plasmáticos apresentaram valores semelhantes entre todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Eletrólitos plasmáticos.

	SAC ++	SAC +/-	NIC ++	NIC +/-	ANOVA
Na+ (mEq/L)	153,6 ± 1,61	158,5 ± 0,68	152,3 ± 3,8	154,9 ± 1,16	$P = 0,2$
K+(mEq/L)	4,24 ± 0,53	3,82 ± 0,23	4,01 ± 0,31	4,42 ± 0,49	$P = 0,7$
Cl-2 (mEq/L)	120,5 ± 1,5	120,3 ± 0,97	120,4 ± 0,78	120,5 ± 1,21	$P = 0,99$
Ca+2 (mg/dL)	8,81 ± 0,51	8,46 ± 0,38	8,65 ± 0,31	9,41 ± 0,57	$P = 0,5$
Mg+2 (mg/dL)	1,85 ± 0,11	1,74 ± 0,06	1,68 ± 0,06	1,76 ± 0,17	$P = 0,8$
PO4- (mg/dL)	8,76 ± 0,71	8,89 ± 0,42	8,38 ± 0,67	8,31 ± 0,65	$P = 0,9$

Resultados apresentados como média ± erro padrão médio. n = 8/grupo.

5.4 Função tubular – Eletrólitos urinários, osmolalidade e transportadores de sódio, água e potássio

Como pode ser visto na Tabela 5, as frações de excreção de sódio (FENa), potássio (FEK) e de fósforo (FEP) foram menores nos animais KI^{+/+} expostos a nicotina (NIC++) (Tabela 5). A fração de excreção de magnésio (FEMg) também não se mostrou diferente entre os grupos (Tabela 4). A fração de excreção de cálcio (FECa) foi semelhante entre os grupos (Tabela 5), assim como os níveis plasmáticos de PTH (Tabela 6). Houve uma tendência de níveis plasmáticos maiores de FGF-23 no grupo NIC++ em relação ao grupo SAC++, e estes níveis foram maiores nos grupos SAC+- e NIC+- quando comparados ao grupo SAC++ (Tabela 6).

Tabela 5 - Fração de excreção dos eletrólitos (%)

	SAC ++	SAC +-	NIC ++	NIC +-
FENa	0,48 ± 0,08	0,37 ± 0,01	0,26 ± 0,04*	0,28 ± 0,03*
FEK	29,7 ± 3,5	27,9 ± 1,9	19,4 ± 3,1*	26,3 ± 7,4
FECa	0,59 ± 0,07	0,50 ± 0,06	0,46 ± 0,07	0,49 ± 0,07
FEMg	14,0 ± 1,4	10,6 ± 0,9	10,1 ± 1,2	12,1 ± 1,0
FEP	9,9 ± 1,0	8,0 ± 0,6	6,1 ± 0,9*	9,1 ± 0,9

Resultados apresentados como média ± erro padrão médio. n = 8/grupo.

* $P < 0,05$ vs SAC ++

Tabela 6 - Níveis plasmáticos de FGF-23 e PTH intactos

	SAC ++	SAC +-	NIC ++	NIC +-	ANOVA
PTH plasmático (pg/mL)	6,049 ± 0,9	5,588 ± 0,4	6,223 ± 0,8	5,685 ± 0,6	$P = 0,92$
FGF-23 plasmático (pg/mL)	182,0 ± 16,4	292,0 ± 23,7	255,9 ± 45,4	286,9 ± 32,9	$P = 0,06$

Resultados apresentados como média ± erro padrão médio. n = 10/grupo

A osmolalidade urinária foi semelhante entre os grupos (SAC++ 2899 ± 54,4; SAC+- 2802 ± 119,8; NIC++ 2925 ± 13,6; NIC+- 2937 ± 3,15), como está demonstrado na Figura 5.5.

Figura 5.5 – A osmolalidade urinária foi semelhante entre os grupos, $P = 0,47$

Os níveis plasmáticos de ADH também não variaram entre os grupos (SAC++ $202,8 \pm 12,9$; SAC+- $197,4 \pm 7,6$; NIC++ $202,8 \pm 4,4$; NIC+- $200,7 \pm 7,4$), (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Níveis plasmáticos de hormônio antidiurético (ADH) foram semelhantes entre os 4 grupos. $P = 0.96$

As expressões renais de aquaporina 2 (AQP2) (Figura 5.7) e do canal de sódio epitelial α (α ENaC) (Figura 5.8) não foram diferentes entre os grupos.

Figura 5.7 – Expressão renal da proteína aquaporina 2 (AQP2) foi semelhante em todos os grupos, $P = 0,5$

Figura 5.8 – A expressão renal do canal de sódio epitelial α (α ENaC) foi semelhante em todas as comparações. A - Expressão renal de α ENaC nos animais KI $^{+/+}$, $P = 0,6$. B - Expressão renal de α ENaC nos animais KI $^{+/-}$, $P = 0,7$. C – Expressão renal de α ENaC em animais KI $^{+/+}$ e KI $^{+/-}$ expostos a nicotina, $P = 0,35$

As expressões do co-transportador NaK2Cl (NKCC2) e do trocador sódio-hidrogênio tipo 3 (NHE3) foram reduzidas nos animais $KI^{+/+}$ expostos a nicotina (NIC++), o que não ocorreu nos animais $KI^{+/-}$ (NIC+-) (Figura 5.9 e Figura 5.10)

Figura 5.9 – A expressão no tecido renal do co-transportador NaK2Cl (NKCC2) foi menor nos animais $KI^{+/+}$ expostos a nicotina (NIC++). A – Expressão renal de NKCC2 menor nos animais NIC++, * $P < 0,05$ vs SAC++. B – Nos animais $KI^{+/-}$ a expressão renal de NKCC2 não foi modificada pela exposição a nicotina, $P = 0,6$. C – Comparando os grupos expostos a nicotina, a expressão renal de NKCC2 foi maior nos animais $KI^{+/-}$ expostos a nicotina (NIC+-), * $P < 0,0001$ vs NIC++

Figura 5.10 –A expressão em tecido renal do trocador sódio-hidrogênio tipo 3 (NHE3) diminuiu somente nos animais KI^{+/+} expostos a nicotina. A - Expressão em tecido renal de NHE₃ reduzida nos animais KI^{+/+} expostos a nicotina, * $P < 0,0001$ vs SAC++. B - Expressão em tecido renal de NHE₃ mantida nos animais KI^{+/-} mesmo após exposição a nicotina, $P = 0,7$. C - Expressão em tecido renal de NHE₃ menor nos animais NIC++ do que nos animais NIC+-, * $P < 0,0001$ vs NIC++

A expressão do canal de potássio da medula externa renal (ROM-K) no tecido renal foi maior no grupo NIC+- do que nos grupos SAC+- e NIC++ (Figura 5.11).

5.5 Receptores nicotínicos

A expressão do $\alpha 7$ -nAChR foi diminuída no tecido renal pela exposição crônica a nicotina somente nos animais KI^{+/+} (Figura 5.12).

Figura 5.11 – A expressão do canal de potássio da medula externa renal (ROM-K) em tecido renal aumentou nos animais KI^{+/-} expostos a nicotina. A – A expressão renal de ROM-K não se modificou nos animais KI^{+/+} expostos a nicotina (NIC++), $P = 0,09$. B – A expressão renal de ROM-K aumentou nos animais KI^{+/-} expostos a nicotina (NIC+-), $* P < 0,05$ vs SAC+-. C – A expressão renal de ROMK foi maior no grupo NIC+- do que no grupo NIC++, $* P < 0,05$ vs NIC++

Figura 5.12 – A expressão do receptor colinérgico nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) por “western blotting”. A – Os animais KI $+/+$ quando expostos a nicotina apresentaram redução da expressão de $\alpha 7$ nAChR, * $P < 0,05$ vs SAC++. B – Os animais KI $+/-$ não reduziram a expressão de $\alpha 7$ nAChR quando expostos a nicotina, $P = 0,9$. C – Comparando os dois grupos expostos a nicotina, a expressão renal de $\alpha 7$ nAChR é maior no grupo NIC+-, * $P < 0,001$ vs NIC++

5.6 Klotho renal – Expressão protéica e RNAm

A expressão da proteína Klotho diminuiu no rim de animais $KI^{+/+}$ (NIC++ 25,1 ± 4,7%) após a exposição por 4 semanas a nicotina (Figura 5.13), em relação aos seus controles não expostos (SAC++ 100 ± 24,8%), com $P < 0,01$. Nos animais $KI^{+/-}$ (NIC+- 71,6 ± 6,8%) houve uma tendência a uma redução adicional da expressão protéica de Klotho em relação aos animais não-expostos (SAC+- 100 ± 12,2%), como poder ser visto na Figura 5.14. Comparando os dois grupos expostos a nicotina, os animais NIC+- (56,7 ± 5,6%) tiveram níveis menores de Klotho do que os animais NIC++ (100 ± 14,3%, $P < 0,05$) (Figura 5.15).

Figura 5.13 – Expressão renal da proteína Klotho foi reduzida nos animais $KI^{+/+}$ expostos a nicotina (NIC++) quando comparados aos seus controles (SAC++). * $P < 0,01$

Figura 5.14 – Expressão renal da proteína Klotho foi mantida nos animais KI^{+/-} expostos a nicotina (NIC⁺) quando comparados com os seus controles (SAC⁺). $P = 0,06$

Figura 5.15 – Expressão renal da proteína Klotho foi menor nos animais KI^{+/-} (NIC⁺) expostos a nicotina do que nos animais KI⁺⁺(NIC⁺⁺) também expostos. $P < 0,05$

A expressão gênica de klotho (% SAC++) foi menor nos grupos SAC+- ($31,3 \pm 7,6$) e NIC+- ($20,9 \pm 3,13$) do que no grupo SAC++ ($100 \pm 25,7$), com $P < 0,05$. Nos animais NIC++ ($67,43 \pm 21,2\%$) também ocorreu diminuição do RNAm de klotho, porém sem diferença estatisticamente significativa (Figura 5.16).

Figura 5.16 – Expressão gênica de klotho por q-PCR. RNAm corrigido por GAPDH, expresso em % do grupo SAC++. Houve redução do RNAm do klotho em todos os grupos, $P < 0,01$. $n=8$ /grupo SAC++ e NIC++ e $n=10$ /grupo SAC+- e NIC+-. * $P < 0,05$ vs SAC++

5.7 Interleucinas e estresse oxidativo

Não foi possível identificar níveis de IL12, INF-gama, TNF-alfa e MCP-1 no tecido renal de nenhum dos grupos. Os níveis de IL-10 e IL-6 foram semelhantes entre os grupos SAC++ e NIC++, mas os níveis de IL-6 foram maiores no grupo com deficiência de klotho e exposição crônica a nicotina (NIC+-) em relação ao grupo SAC+-, conforme visto na Figura 5.17.

Figura 5.17 – Níveis de interleucinas (IL) detectáveis no tecido renal. A – Os níveis de IL-6 não foram diferentes entre os grupos não expostos a nicotina, $P = 0,82$. B – Os níveis de IL-6 foram semelhantes nos dois grupos de animais $KI^{+/+}$, independente da exposição a nicotina, $P = 0,5$. C – Os níveis renais de IL-6 aumentaram no grupo de animais $KI^{+/-}$ expostos a nicotina (NIC+), * $P < 0,05$ vs SAC+-. D – Os níveis de IL-6 foram maiores no grupo NIC+- do que no grupo NIC++, * $P < 0,01$ vs NIC++. E, F, G e H – Os níveis de IL-10 foram semelhantes em todas as comparações, $P > 0,05$.

Os níveis de GSH e TBARS no tecido renal não se alteraram com a exposição a nicotina no grupo NIC++ e os níveis de TBARS se elevaram nos animais com deficiência de klotho expostos cronicamente a nicotina (NIC+-), enquanto os níveis de GSH se mantiveram semelhantes ao grupo SAC+- (Figura 5.18).

Figura 5.18– Marcadores de estresse oxidativo no tecido renal – substâncias derivadas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona total reduzida (GSH). A e B: Nos animais KI^{+/+}, a exposição crônica a nicotina não alterou os níveis de TBARS ($P = 0,7$), nem de GSH ($P = 0,9$). C e D: Nos animais com deficiência de klotho os níveis de TBARS se elevaram com a exposição a nicotina ($P < 0,05$), enquanto que os níveis de GSH não se alteraram ($P = 0,7$). E e F – Os níveis de TBARS e de GSH não tiveram diferença na comparação entre os dois grupos expostos a nicotina ($P = 0,5$ e $P = 0,4$, respectivamente)

5.8 Resposta hemodinâmica, eNOS e VEGF

As PAS, PAD, PAM e FC basais foram semelhantes em todos os grupos (Tabela 7). A sensibilidade barorreflexa (bpm/mmHg) em resposta a infusão de 150 ng/kg de fenilefrina não apresentou diferença entre os grupos (SAC++ $-2,1 \pm 0,57$, NIC++ $-1,8 \pm 0,41$, SAC+- $-1,6 \pm 0$, NIC+- $-2,5 \pm 0,49$), mas após o bolus de 150 ng/kg de nitroprussiato de sódio o grupo NIC++ ($5,5 \pm 1,3$) apresentou maior sensibilidade barorreflexa que o grupo SAC++ ($2,0 \pm 0,62$, $P < 0,05$), o que não ocorreu quando comparados os grupos SAC+- ($2,8 \pm 1,0$) e NIC+- ($3,9 \pm 0,7$), conforme Figuras 5.19 e 5.20.

Tabela 7 - Medidas diretas de pressão arterial e frequência cardíaca antes da infusão de drogas

	SAC ++	SAC +-	NIC ++	NIC +-	ANOVA
FC (bpm)	497,4 $\pm$ 17,33	496,9 $\pm$ 39,54	477,6 $\pm$ 34,68	451,1 $\pm$ 22,92	P = 0,67
PAS (mmHg)	148,6 $\pm$ 5,43	154,0 $\pm$ 7,89	158,2 $\pm$ 3,50	167,2 $\pm$ 4,05	P = 0,13
PAD (mmHg)	108,9 $\pm$ 5,14	113,5 $\pm$ 5,73	116,0 $\pm$ 2,76	121,6 $\pm$ 1,60	P = 0,21
PAM (mmHg)	128,6 $\pm$ 4,88	133,7 $\pm$ 6,56	136,5 $\pm$ 2,55	142,3 $\pm$ 2,26	P = 0,20

Frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM). Média $\pm$ Erro padrão . n = 7/grupo

Figura 5.19 - Índices de sensibilidade barorreflexa após a infusão de 150 ng de fenilefrina foram semelhantes entre os grupos. A – Comparação do índice de bradicardia reflexa entre os animais não expostos a nicotina, $P = 0,43$. B - Comparação do índice de bradicardia reflexa entre os animais sem deficiência de klotho ($KI^{+/+}$), $P = 0,64$. C - Comparação do índice de bradicardia reflexa entre os animais com deficiência de klotho ($KI^{+/-}$), $P = 0,17$. D - Comparação do índice de bradicardia reflexa entre os animais expostos a nicotina, $P = 0,33$.

Figura 5.20—Índices de sensibilidade barorreflexa medidos após a infusão de 150 ng de nitroprussiato de sódio. A – Comparação do índice de taquicardia reflexa entre os animais não expostos a nicotina, $P = 0,53$. B - Comparação do índice de taquicardia reflexa entre os animais sem deficiência de klotho ($KI^{+/+}$), * $P < 0,05$ vs SAC++. C - Comparação do índice de taquicardia reflexa entre os animais com deficiência de klotho ($KI^{+/-}$), $P = 0,38$. D - Comparação do índice de taquicardia reflexa entre os animais expostos a nicotina, $P = 0,29$.

A variância do intervalo de pulso cardíaco (IP) foi igual entre os grupos SAC++ ($122,8 \pm 5,25 \text{ ms}^2$), SAC+- ($141,3 \pm 8,83 \text{ ms}^2$), NIC++ ($124,5 \pm 8,03 \text{ ms}^2$) e NIC+- ($140,8 \pm 10,76 \text{ ms}^2$), com $P = 0,25$. O desvio padrão do intervalo de pulso (DP-IP), por sua vez, foi maior nos grupos SAC+- ($16,33 \pm 3,65 \text{ ms}$) e NIC++ ($13,1 \pm 2,24 \text{ ms}$) quando comparado ao grupo SAC++ ($7,4 \pm 0,54 \text{ ms}$), o

que não ocorreu na comparação entre os grupos SAC+- ($16,3 \pm 3,65$ ms) e NIC+- ($19,4 \pm 3,12$ ms), como pode ser observado na Figura 5.21.

Figura 5.21 – Desvio padrão do intervalo de pulso (DP-IP). A – Comparação do DP-IP entre os grupos que não foram expostos a nicotina, * $P < 0,05$ vs SAC++. B – Comparação do DP-IP entre os grupos sem deficiência de klotho, * $P < 0,05$ vs SAC++. C – Comparação do DP-IP entre os grupos com deficiência de klotho, $P = 0,54$. D – Comparação do DP-IP entre os grupos expostos a nicotina, $P = 0,12$

A RMSSD foi diferente na comparação dos grupos, com $P < 0,05$ na comparação entre os grupos SAC++ e NIC+- . Comparando os dois grupos que não receberam nicotina (SAC++ e SAC+-) já ocorre um aumento de 1,5 vezes no valor do RMSSD ($4,95 \pm 0,53$ vs $12,44 \pm 3,72$ ms, respectivamente, $P = 0,06$), enquanto que na comparação entre os dois grupos que receberam nicotina (NIC++ e NIC+-) a diferença é de 1,2 vezes ($7,85 \pm 2,19$ vs $17,29 \pm 3,48$, respectivamente, $P < 0,05$). Não ocorre diferença na RMSSD quando

comparamos os grupos SAC++ com NIC++ ($P = 0,23$), nem quando comparamos SAC+- com NIC+- ($P = 0,37$). A modulação da resposta vagal, avaliada pelo RMSSD, parece ser maior nos animais com deficiência de klotho, atingindo maior valor no grupo também exposto a nicotina (NIC+-) (Figura 5.22).

Figura 5.22 - Raiz quadrada da média das diferenças dos intervalos R-R sucessivos (RMSSD). A – Comparação da RMSSD entre os grupos que não foram expostos a nicotina, $P = 0,06$. B – Comparação da RMSSD entre os grupos sem deficiência de klotho, $P = 0,23$. C – Comparação da RMSSD entre os grupos com deficiência de klotho, $P = 0,37$. D – Comparação da RMSSD entre os grupos expostos a nicotina, * $P < 0,05$ vs NIC++

No domínio da FC, o LF absoluto (ms^2) foi maior nos grupos SAC+- ($36,7 \pm 15,48$), NIC++ ($22,6 \pm 8,53$) e NIC+- ($91 \pm 33,25$) quando comparados ao

grupo SAC++ ($4,39 \pm 1,4$), com $P < 0,05$, $P = 0,06$ e $P < 0,05$, respectivamente. A comparação do LF absoluto entre os grupos SAC+- e NIC+- não mostrou diferença. Ainda no domínio da FC, o HF absoluto foi maior em todos os grupos em relação ao grupo SAC++, mas com diferença estatística apenas na comparação com o grupo NIC+- . O LF FC % e o HF FC % foram similares entre os grupos (Tabela 8). Avaliando a relação LF/HF, há uma tendência a aumento do predomínio de LF no grupo NIC++ quando comparado ao grupo SAC++, o que não ocorre entre os grupos NIC+- e SAC+- (Tabela 8 e Figura 5.23).

Tabela 8 - Análise espectral das bandas de baixa (LF) e de alta (HF) frequências e relação LF/HF

	SAC ++	SAC +-	NIC ++	NIC +-
LF (ms ²)	$4,4 \pm 1,4$	$36,7 \pm 15,5 *$	$22,6 \pm 8,5$	$91,0 \pm 33,3 *$
HF (ms ²)	$8,5 \pm 2,0$	$55,12 \pm 27,4$	$27,75 \pm 15,7$	$104,2 \pm 34,0 *$
%LF	$19,3 \pm 3,3$	$23,8 \pm 5,2$	$29,3 \pm 5,0$	$33,6 \pm 2,3$
%HF	$48,3 \pm 9,6$	$44,6 \pm 11,4$	$30,17 \pm 4,8$	$38,20 \pm 5,7$
LF/HF	$0,58 \pm 0,1$	$0,83 \pm 0,3$	$1,56 \pm 0,5$	$1,16 \pm 0,2$

Média $\pm$ Erro padrão médio. * $P < 0,05$ vs SAC ++

Figura 5.23 – Relação entre as bandas de baixa (LF) e alta (HF) frequências (LF/HF). A – Comparação da LF/HF entre os grupos que não foram expostos a nicotina, $P = 0,41$. B – Comparação da LF/HF entre os grupos sem deficiência de klotho, $P = 0,09$. C – Comparação da LF/HF entre os grupos com deficiência de klotho, $P = 0,40$. D – Comparação da LF/HF entre os grupos expostos a nicotina, $P = 0,51$

Na análise da PAS, que reflete a modulação autonômica nos vasos periféricos, não houve diferença significativa entre os grupos no que se refere ao LF absoluto (Tabela 9). O índice alfa foi maior nos animais SAC+/- e NIC+/- quando comparados aos animais SAC++, sem diferenças nas comparações entre os demais grupos (Figura 5.24 e Tabela 9).

Tabela 9 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e índice alfa.

	SAC ++	SAC +/-	NIC ++	NIC +/-
PAS (mmHg)	149,2 ± 6,4	152,4 ± 10,5	158,4 ± 4,1	165,9 ± 3,9
DP PAS (mmHg)	6,5 ± 0,6	6,6 ± 0,7	7,0 ± 0,6	7,28 ± 1,2
LF (mmHg ²)	7,47 ± 1,8	8,9 ± 2,6	12,6 ± 3,5	17,1 ± 5,6
Alfa (ms/mmHg)	0,76 ± 0,1	1,68 ± 0,3 *	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,7 *

Média ± Erro padrão médio. * P < 0,05 vs SAC ++

Figura 5.24 -Índice alfa. A – Comparação do índice alfa entre os grupos que não foram expostos a nicotina, * $P < 0,05$ vs SAC++. B – Comparação do índice alfa entre os grupos sem deficiência de klotho, $P = 0,13$. C – Comparação do índice alfa entre os grupos com deficiência de klotho, $P = 0,28$. D – Comparação do índice alfa entre os grupos expostos a nicotina, $P = 0,14$

A exposição a nicotina promove redução significativa da expressão renal de e-NOS somente nos animais deficientes em klotho, não havendo diferença na comparação entre os grupos SAC+- e NIC+-, nem entre os grupos NIC++ e

NIC+- (Figuras 5.25, 5.26 e 5.27). A expressão renal de VEGF foi semelhante entre os grupos (Figuras 5.28, 5.29 e 5.30).

Figura 5.25 – Expressão protéica de óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) no tecido renal foi reduzida em animais KI^{+/+} expostos a nicotina (NIC++). * $P < 0,05$ vs SAC++

Figura 5.26 - Expressão protéica de óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) no tecido renal foi reduzida em animais KI^{+/-} expostos a nicotina (NIC+-). $P < 0,001$ vs SAC+-

Figura 5.27 - Figura 5.25 - Expressão protéica de óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) no tecido renal teve maior redução em animais KI+/- expostos a nicotina (NIC+-). $P < 0,001$ vs NIC++

Figura 5.28 - Expressão protéica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no tecido renal não foi diferente entre os animais SAC++ e NIC++. $P = 0,11$

Figura 5.29 - Expressão protéica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no tecido renal não foi diferente entre os animais SAC+/- e NIC+/- . $P = 0,56$

Figura 5.30 - Expressão protéica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no tecido renal não foi diferente entre os animais NIC++ e NIC+/- . $P = 0,17$

5.9 SRAA –aldosterona plasmática, expressão de renina e AT1 renais

Os níveis plasmáticos de aldosterona foram diferentes entre os grupos, com valores maiores nos animais NIC+- (521,9 ± 81) quando comparados com os grupos SAC+- (202,3 ± 29) , SAC++ (195,1 ± 40) ($P < 0,05$). O grupo NIC++ (342 ± 50) não apresentou diferença com relação aos demais grupos, como pode ser visto na Figura 5.31.

Figura 5.31 – Níveis plasmáticos de aldosterona foram diferentes entre os grupos, $P < 0,001$. O grupo NIC+- apresentou os maiores níveis de aldosterona quando comparados aos controles. * $P < 0,05$ vs SAC+-. # $P < 0,05$ vs SAC++

A expressão renal de renina foi semelhante entre os grupos (Figura 5.32). O receptor AT1 apresentou maior expressão no tecido renal nos grupos NIC++ e NIC+- em comparação com os respectivos controles, grupos SAC++ e SAC+-, respectivamente. Comparando os dois grupos expostos a nicotina, o grupo NIC+- apresentou expressão maior de AT1 no tecido renal do que o grupo NIC++ (Figura 5.33).

Figura 5.32 – A expressão renal da proteína renina foi semelhante entre os grupos. A – Expressão de renina no tecido renal dos animais KI +/+, $P = 0,18$. B – Expressão renal da proteína renina nos animais KI +/-, $P = 0,06$. C – Expressão renal de renina nos grupos expostos a nicotina, $P = 0,7$.

Figura 5.33 – A expressão renal do receptor de angiotensina II subtipo 1 (AT1) foi maior nos animais expostos a nicotina. A – Receptor AT1 tem expressão aumentada no tecido renal de animais KI ++ expostos a nicotina (NIC++), $P < 0,001$ vs SAC++. B – Nos animais KI +/- também houve aumento da expressão renal de AT1, $P < 0,01$ vs SAC+-. C – Os animais KI +/- tiveram expressão de AT1 maior do que os animais KI +/- expostos a nicotina, $P < 0,05$ vs NIC++

6 Discussão

O modelo de exposição a nicotina foi escolhido pela semelhança com o padrão de exposição a nicotina que ocorre com os humanos (exposição intermitente ao longo do dia), com níveis de cotinina alcançados em outros estudos semelhantes aos de fumantes crônicos(55).A possibilidade de utilizar a exposição à fumaça de cigarro foi considerada, no entanto, a exposição a nicotina isolada nos permitiu uma análise com menos fatores de confusão, já que o cigarro contém mais de 4000 substâncias potencialmente nocivas(87).

A dificuldade neste método está no gosto desagradável para os camundongos, sendo amenizada pela adição de sacarina a 2% a solução. Mesmo assim, estudos sugerem o emprego de doses crescentes para adaptação dos animais, evitando diferenças no consumo de líquidos entre os grupos. No presente estudo, os animais tiveram uma ingesta hídrica semelhante entre os grupos e com médias semelhantes a trabalhos anteriores em camundongos. Apesar disso, consideramos importante a realização da dosagem dos níveis de cotinina, que foram semelhantes aos atingidos em outros estudos(43, 51, 56). Os animais com deficiência de klotho parecem ter uma metabolização alterada da cotinina, já que apresentam níveis plasmáticos maiores do que os animais $Kl^{+/+}$, sem uma redução correspondente da excreção urinária. Existe a possibilidade de que a redução da metabolização extra-renal da nicotina e da cotinina, registrada em pacientes com DRC, possua alguma relação com os níveis de Klotho, que também se reduzem nessa população, sendo necessária uma investigação mais detalhada sobre esse aspecto.

Apesar da mesma ingesta hídrica, observamos uma diminuição do volume urinário nos animais do grupo NIC++. Estudos sugerem que a nicotina pode promover um estímulo a liberação de ADH pela neurohipófise(88, 89), o que poderia justificar essa alteração. Todavia, os níveis plasmáticos de ADH e a expressão renal da AQP 2 não foram diferentes nos animais que receberam nicotina. Provavelmente isso se justifica pela exposição prolongada e intermitente a nicotina, já que o aumento da ação antidiurética do hormônio, provocada por injeção de nicotina ou pelo fumo, é menor e mais tardia em indivíduos fumantes, que tem padrão de exposição prévia a nicotina, semelhante aos animais do nosso estudo(88). Todavia, além da redução da

diurese, observamos que a nicotina provocou uma redução da TFG nesse mesmo grupo (NIC++). A exposição crônica a nicotina provoca uma diminuição da TFG em ratos(90, 91), medida por “clearance” de inulina(90), assim como em humanos(15), provavelmente pelos efeitos de estimulação do sistema adrenérgico pela nicotina, de forma semelhante ao que ocorreu nos animais KI⁺⁺ expostos a nicotina no presente estudo. No entanto, a diminuição da diurese e a redução da TFG não foram observadas nos animais deficientes em klotho expostos a nicotina (NIC+-). Apesar de indivíduos saudáveis expostos à nicotina apresentarem queda da filtração glomerular, da fração de filtração e aumento da resistência vascular renal, por ativação do sistema nervoso simpático, em pacientes com nefropatia da IgA a exposição tabágica não é capaz de promover queda da filtração glomerular, nem da fração de filtração, apesar de resultar em aumento da frequência cardíaca(92). Da mesma forma, a exposição a nicotina não altera a TFG em animais hipercolesterolêmicos, nem submetidos a denervação(90), e, em fumantes crônicos, a exposição aguda a nicotina não reduz TFG nem o fluxo plasmático renal(93). Esses resultados prévios sugerem que os animais deficientes em klotho apresentaram uma resposta renal semelhante à de indivíduos não-saudáveis diante da exposição a nicotina. Apesar da TFG ter reduzido no grupo NIC++, essa redução encontra-se dentro da faixa de normalidade. De maneira aparentemente contraditória, a ureia elevou-se somente no grupo NIC+-, que não teve redução da TFG. Contudo, além de refletir a TFG, a ureia pode elevar-se de maneira independente da TFG ou da creatinina, como resultado do aumento da reabsorção tubular proximal por ativação do sistema nervoso simpático e do SRAA(94).

Uma aumento da atividade simpática, associada a uma possível vasoconstricção e diminuição do fluxo plasmático renal, também poderia justificar uma diminuição na FENa grupo NIC++, visto que a nicotina é capaz de diminuir a resposta natriurética a expansão de volume, também por efeito de ativação do sistema nervoso simpático, e que rins denervados mantêm natriurese em resposta a expansão com salina(95). Nossos resultados, demonstraram que a FENa também se reduziu nos animais deficientes em klotho, mesmo sem uma redução da TFG. Contudo, já foi documentado que

mesmo intensidades de ativação simpática renal que não provocam queda da TFG e do fluxo plasmático renal são capazes de produzir anti-natriurese por ação direta no túbulo renal, independente de alterações hemodinâmicas. Essa diminuição da excreção de sódio ocorre por liberação de norepinefrina pelas terminações nervosas simpáticas com estimulação de adrenoreceptores α -1 localizados na membrana basolateral das células epiteliais tubulares, que desencadeiam um aumento da atividade da NaK-ATPase com aumento do transporte de sódio transepitelial(96). Nos animais $KI^{+/-}$ pode haver, portanto, uma ativação de menor intensidade do sistema adrenérgico, manifestando-se somente pela queda da FENa, sem interferência na TFG e na diurese. Já foi demonstrado que a deficiência de Klotho prejudica o aumento da liberação de catecolaminas durante o estresse(97). Ocorreu uma diminuição da expressão dos transportadores de sódio (NHE3 e NKCC2) nos animais KI^{++} expostos a nicotina (NIC++), provavelmente relacionada à queda da filtração glomerular, na tentativa de manter o balanço glomérulo-tubular. Como não houve queda da filtração glomerular nos animais $KI^{+/-}$ expostos a nicotina, não houve redução da expressão desses transportadores de sódio. O balanço glomérulo-tubular é fundamental para a manutenção do equilíbrio de sal no organismo. Mudanças na filtração glomerular, são acompanhadas por alterações na reabsorção tubular, mantendo assim constante a fração de reabsorção de fluidos e NaCl. Embora saibamos que os segmentos distais são fundamentais para a regulação de sódio frente as mudanças no fluido tubular, o impacto da filtração glomerular é bem pronunciado no túbulo proximal. No túbulo proximal, o aumento da perfusão leva a um aumento da reabsorção de sódio e bicarbonato, por um aumento da expressão do transportador NHE3. Da mesma forma, com a queda da filtração glomerular, há diminuição da carga filtrada de solutos e portanto diminuição da reabsorção dos segmentos proximais, mantendo assim a fração de filtração(98). O que é interessante notar é que, mesmo com elevado nível plasmático de aldosterona, a expressão do α ENaC nos animais do grupo NIC+- não está elevada, embora não tenham sido avaliadas as expressões das demais subunidades.

Os animais $KI^{+/+}$ expostos a nicotina tiveram uma redução na expressão do α 7-nAChR, conforme visto em outros estudos(42, 43), por um provável

mecanismo de “feedback” negativo da nicotina sobre o seu receptor. No grupo NIC+- não ocorreu a inibição da expressão proteica desse receptor, sugerindo que ocorre alguma alteração na ativação desse receptor na deficiência de klotho, que pode justificar a aparente redução da atividade simpática nesses animais, discutida anteriormente.

Na avaliação hemodinâmica, confirmamos um predomínio da modulação simpática sobre o coração nos animais $Kl^{+/+}$ expostos a nicotina (NIC++), de maneira contrária ao que acontece nos animais $Kl^{+/-}$ (NIC+-). Os animais NIC++ apresentaram maior sensibilidade baroreflexa durante a resposta taquicárdica, maior relação LF/HF e maior DP-IP, sugerindo uma maior modulação simpática cardíaca. Enquanto isso, os animais NIC+-, mesmo com maior LF que os do grupo NIC++, tiveram aumento importante do componente HF e do RMSSD, sugerindo uma maior compensação vagal.

Avaliando o sistema nervoso autônomo periférico, através da análise da variabilidade da PAS, podemos perceber que os animais do grupo NIC+- apresentavam maior modulação simpática da PAS, associada a uma maior sensibilidade baroreflexa espontânea, expressa pelo índice alfa. Até o presente momento, não existem outros estudos na literatura que tenham avaliado a modulação autonômica periférica em animais com deficiência de klotho.

A função autonômica é um importante marcador de morbidade e mortalidade cardiovasculares(99). Tanto na avaliação dos barorreflexos quanto na análise espectral, os animais parecem responder a exposição a nicotina com uma predominância da ativação simpática cardíaca, talvez justificada por um maior tônus parassimpático cardíaco verificado nos animais haploinsuficientes para o gene klotho neste estudo. Apesar da nicotina reduzir a expressão de Klotho, as respostas hemodinâmicas cardíacas não são semelhantes entre os grupos NIC++ e NIC+-, sugerindo uma variação na resposta entre a redução de klotho por um tempo mais prolongado entre os animais com a alteração genética e os animais com redução de klotho provocada pela nicotina fornecida somente por 4 semanas.

Os animais $Kl^{+/+}$ tiveram aumento da sensibilidade baroreflexa após estímulo com nitroprussiato, o que não ocorreu nos camundongos do grupo NIC+- . A injeção intraventricular de klotho é capaz de restaurar a sensibilidade

barorreflexa em ratos com diabetes induzida por estretozocina, assim como acontece com o uso de rosiglitazona(100). Além disso, o silenciamento do gene *klotho* no cérebro de ratos provoca uma diminuição da sensibilidade barorreflexa, que pode ser restaurada em ratos espontaneamente hipertensos através da infusão intraventricular de *Klotho*(101). Essas evidências sugerem um papel dos níveis de *Klotho* no SNC na resposta barorreflexa, que podem refletir nas diferentes respostas a exposição crônica a nicotina.

A modulação da resposta vagal, avaliada pela RMSSD, foi maior nos animais com deficiência de *klotho* (SAC+- e NIC+-) do que nos animais $Kl^{+/+}$ (SAC++ e NIC++). Apesar da diminuição da variação da FC estar relacionada a pior prognóstico após infarto agudo do miocárdio, no nosso caso os grupos $Kl^{+/+}$ apresentaram valores dentro da normalidade, sendo verificada uma variação aumentada nos grupos com deficiência de *klotho*. Em pacientes com doença de Chagas já foi documentado aumento do tônus vagal, refletido por uma maior RMSSD (102). Nos animais *kl/kl* ocorre uma menor resposta cronotrópica ao isoproterenol e ao estresse por contenção, com elevação dos níveis de noradrenalina menores do que os animais $Kl^{+/+}$ e maior frequência de morte súbita desencadeada por bradiarritimias(97), o que corrobora o achado desse estudo de predomínio vagal na modulação autonômica cardíaca nos animais $Kl^{+/-}$.

A expressão de e-NOS reduziu-se em todos os animais expostos a nicotina, sugerindo uma disfunção endotelial nestes animais, já descrita previamente(103). Já foi demonstrada uma dependência do óxido nítrico para o controle baroreflexo(104), sendo que a administração crônica de um inibidor da liberação de óxido nítrico promove diminuição da sensibilidade barorreflexa em ratos(105). No presente estudo, os animais $Kl^{+/-}$ expostos a nicotina tiveram menor sensibilidade barorreflexa do que os animais $Kl^{+/+}$ quando comparados aos seus controles não expostos e, entre os dois grupos expostos a nicotina, o grupo NIC+/- apresentou níveis menores de e-NOS.

A FEK reduziu-se nos animais do grupo NIC++, o que não ocorreu nos animais NIC+-. No grupo de animais NIC+- houve um aumento do canal ROMK, provavelmente refletindo um aumento da aldosterona plasmática, também encontrado somente neste grupo, colaborando para manter a FEK.

Apesar dos níveis séricos normais de cálcio e fósforo, os animais NIC++ também apresentaram uma redução na FEP. Isso pode estar relacionado a uma resistência a ação do FGF-23 associada a exposição a nicotina, por diminuição dos níveis de klotho(106), o que é ratificado pelo aumento dos níveis plasmáticos de FGF-23, sem um aumento correspondente na excreção de fósforo, podendo ser explicado pela redução da TFG evidenciada nesse grupo. Em todos os grupos, exceto o SAC++, a expressão renal de Klotho era menor, o que também se refletiu em níveis maiores de FGF-23. No presente estudo, a diminuição da expressão gênica de klotho foi estatisticamente significativa somente nos grupos SAC+- e NIC+-, sugerindo algum possível mecanismo pós-transcricional para a redução da expressão protéica de Klotho no rim dos animais NIC++.

Ainda não foi possível esclarecer se a diminuição da expressão renal de klotho pela nicotina é causa ou consequência de uma agressão renal e se ocorre por efeito direto ou indireto por sua ação de ativação do sistema adrenérgico, com consequente ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Em homens tabagistas, verificou-se uma maior atividade de renina plasmática(107), que é um dos fatores capazes de induzir uma redução do klotho. Em cultura de células renais, a angiotensina II induz uma diminuição do Klotho dependente dos receptores AT1. Outros modelos experimentais que cursam com ativação do SRAA também resultam em redução de Klotho. No entanto, a lesão renal pode cursar com redução de klotho relacionada a outras vias, já que no modelo de hipertensão DOCA-sal, mesmo sem ativação do SRAA, ocorre redução dos níveis de klotho(77). Além disso, a infusão de norepinefrina em ratos não provocou redução da expressão renal de klotho(78).

O aumento do estresse oxidativo provocado pela exposição crônica a nicotina também pode ser responsável pela diminuição do Klotho observada no grupo NIC++. Além de ser importante para minimizar o estresse oxidativo, a expressão de Klotho diminui após exposição a peróxido de hidrogênio “in vitro”(108) e diversas situações associadas a diminuição de Klotho também cursam com aumento do estresse oxidativo, como a nefropatia diabética(109) e a ativação do SRAA(78).

Um aumento dos níveis de IL-6 no tecido renal e de aldosterona no plasma dos animais deficientes em klotho e expostos a nicotina sugere que, em animais com níveis mais baixos de klotho, os efeitos deletérios da nicotina possam ser acentuados. Em animais deficientes em klotho a perda da autorregulação renal pode permitir que os efeitos hemodinâmicos da nicotina causem piora da lesão renal. O fumo, quando associado a um aumento da filtração glomerular, resultou em aumento da proteinúria(110), resultado também observado apenas no grupo NIC+- no presente estudo. Além do mecanismo hemodinâmico, com a ativação simpática nos animais KI +/- evitando possíveis aumentos da pressão intra-glomerular, talvez em situações normais o klotho seja capaz de impedir a ativação do TGF beta 1 e de outras citocinas inflamatórias, como a IL-6, e de evitar uma ativação do SRAA. A IL-6 é produzida por macrófagos e o aumento da sua expressão no rim está associada a proliferação mesangial e lesão intersticial(111). Já foi descrito um aumento da expressão de IL-6 associado ao envelhecimento em ratos(111) e em humanos(112). No nosso estudo a expressão renal de fibronectina por imuno-histoquímica foi maior nos dois grupos expostos a nicotina. Isso pode ter ocorrido por termos observado os animais apenas por 4 semanas, período curto para a observação de consequências renais a longo prazo, como o estabelecimento de fibrose nesse tipo de modelo.

Os animais com níveis mais baixos de Klotho também parecem ser mais susceptíveis aos efeitos do estresse oxidativo. O Klotho inibe a sinalização via insulina/IGF1 e desta forma consegue facilitar a remoção de ROS(69). Isso pode explicar o fato dos animais com menos klotho (NIC+-) terem aumento do marcador renal de estresse oxidativo, de IL-6 e aumento da proteinúria quando expostos a nicotina, fato que não acontece nos animais KI^{+/+} (NIC++).

Ainda será necessário estudar com mais detalhes as vias relacionadas ao Klotho e a exposição a nicotina para melhor compreensão dos efeitos da nicotina na lesão renal.

7 Conclusões

1. A exposição crônica a nicotina reduz a expressão renal de Klotho.
2. A exposição crônica a nicotina associada a níveis baixos de klotho está associada a aumento de IL-6 renal, aldosterona plasmática e de proteinúria
3. A exposição crônica a nicotina tem efeitos renais e hemodinâmicos diferentes de acordo com os níveis basais de klotho
4. A ação da nicotina no agravamento e na progressão das diversas formas de lesão renal pode estar relacionada a falta de respostas adaptativas adequadas em vigência de níveis mais baixos de klotho

8 Referências bibliográficas

1. Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, et al. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet*. 2012 Aug;380(9842):668-79. PubMed PMID: 22901888. eng.
2. Estatística. IBdGe. Pesquisa Especial de Tabagismo (PETab). . 2009.
3. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco. Geneva: World Health Organization; 2011. 152 p. p.
4. Samet J, Yang G. Passive smoking, women and children. 2001. In: World Health Organization Women and The Tobacco Epidemic [Internet]. Geneva: World Health Organization.
5. Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostron B, Thun M, Anderson RN, et al. 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *N Engl J Med*. 2013 Jan;368(4):341-50. PubMed PMID: 23343063. eng.
6. Kandel ER, Kandel DB. A Molecular Basis for Nicotine as a Gateway Drug. *New England Journal of Medicine*. 2014 2014/09/04;371(10):932-43.
7. Flouris AD, Chorti MS, Poulianiti KP, Jamurtas AZ, Kostikas K, Tzatzarakis MN, et al. Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhalation Toxicology*. 2013 2013/02/01;25(2):91-101.
8. Orth SR, Hallan SI. Smoking: a risk factor for progression of chronic kidney disease and for cardiovascular morbidity and mortality in renal patients--absence of evidence or evidence of absence? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Jan;3(1):226-36. PubMed PMID: 18003763. eng.
9. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med*. 1996 Jan;334(1):13-8. PubMed PMID: 7494564. eng.
10. Hallan SI, Orth SR. Smoking is a risk factor in the progression to kidney failure. *Kidney Int*. 2011 Sep;80(5):516-23. PubMed PMID: 21677635. eng.
11. Haroun MK, Jaar BG, Hoffman SC, Comstock GW, Klag MJ, Coresh J. Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Nov;14(11):2934-41. PubMed PMID: 14569104. eng.
12. Yamagata K, Ishida K, Sairenchi T, Takahashi H, Ohba S, Shiigai T, et al. Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. *Kidney Int*. 2007 Jan;71(2):159-66. PubMed PMID: 17136030. eng.
13. Baggio B, Budakovic A, Perissinotto E, Maggi S, Cantaro S, Enzi G, et al. Atherosclerotic risk factors and renal function in the elderly: the role of hyperfibrinogenaemia and smoking. Results from the Italian Longitudinal Study on Ageing (ILSA). *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jan;20(1):114-23. PubMed PMID: 15572387. eng.
14. Joshi VD, Mooppil N, Lim J. Prevalence and risk factors of undetected proteinuria in an elderly South-East Asian population. *Nephrology (Carlton)*. 2006 Aug;11(4):347-54. PubMed PMID: 16889576. eng.
15. García-Esquinas E, Loeffler LF, Weaver VM, Fadrowski JJ, Navas-Acien A. Kidney function and tobacco smoke exposure in US adolescents. *Pediatrics*. 2013 May;131(5):e1415-23. PubMed PMID: 23569089. eng.
16. de Boer IH, Sibley SD, Kestenbaum B, Sampson JN, Young B, Cleary PA, et al. Central obesity, incident microalbuminuria, and change in creatinine clearance in the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):235-43. PubMed PMID: 17151331. PMCID: PMC2622719. eng.
17. Orth SR, Schroeder T, Ritz E, Ferrari P. Effects of smoking on renal function in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Nov;20(11):2414-9. PubMed PMID: 16046507. eng.
18. Ward MM, Studenski S. Clinical prognostic factors in lupus nephritis. The importance of hypertension and smoking. *Arch Intern Med*. 1992 Oct;152(10):2082-8. PubMed PMID: 1417382. eng.

19. Orth SR, Stöckmann A, Conradt C, Ritz E, Ferro M, Kreuzer W, et al. Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int.* 1998 Sep;54(3):926-31. PubMed PMID: 9734618. eng.
20. Stengel B, Couchoud C, Cénée S, Hémon D. Age, blood pressure and smoking effects on chronic renal failure in primary glomerular nephropathies. *Kidney Int.* 2000 Jun;57(6):2519-26. PubMed PMID: 10844621. eng.
21. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schumouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997 Apr;63(7):968-74. PubMed PMID: 9112349. eng.
22. Nourbala MH, Nemati E, Rostami Z, Einollahi B. Impact of cigarette smoking on kidney transplant recipients: a systematic review. *Iran J Kidney Dis.* 2011 Jul;5(3):141-8. PubMed PMID: 21525572. eng.
23. Sung RS, Althoen M, Howell TA, Ojo AO, Merion RM. Excess risk of renal allograft loss associated with cigarette smoking. *Transplantation.* 2001 Jun;71(12):1752-7. PubMed PMID: 11455254. eng.
24. Cosio FG, Falkenhain ME, Pesavento TE, Yim S, Alamir A, Henry ML, et al. Patient survival after renal transplantation: II. The impact of smoking. *Clin Transplant.* 1999 Aug;13(4):336-41. PubMed PMID: 10485376. eng.
25. Lin SJ, Koford JK, Baird BC, Hurdle JF, Krikov S, Habib AN, et al. Effect of donors' intravenous drug use, cigarette smoking, and alcohol dependence on kidney transplant outcome. *Transplantation.* 2005 Aug;80(4):482-6. PubMed PMID: 16123722. eng.
26. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation.* 2004;114(1):5-14.
27. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol.* 2012;2012:465897. PubMed PMID: 22577546. PMCID: PMC3345218. eng.
28. Djamali A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Aug;293(2):F445-55. PubMed PMID: 17459952. eng.
29. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation.* 2011;121(11):4210-21.
30. Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Oct;13(10):2600-10. PubMed PMID: 12239251. eng.
31. Lan HY, Chung ACK. TGF- β /Smad Signaling in Kidney Disease. *Seminars in Nephrology.* 2012 5//;32(3):236-43.
32. Kim MK, Maeng YI, Sung WJ, Oh HK, Park JB, Yoon GS, et al. The differential expression of TGF- β 1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis: an immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(9):1747-58. PubMed PMID: 24040439. PMCID: PMC3759481. eng.
33. Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a Morphogenic Cytokine Stimulating Renal Fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2011;22(7):1189-99.
34. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005 Mar;57(1):79-115. PubMed PMID: 15734728. eng.
35. Murphy SE, Raulinaitis V, Brown KM. NICOTINE 5'-OXIDATION AND METHYL OXIDATION BY P450 2A ENZYMES. *Drug Metabolism and Disposition.* 2005;33(8):1166-73.
36. Molander L, Hansson A, Lunell E, Alainentalo L, Hoffmann M, Larsson R. Pharmacokinetics of nicotine in kidney failure. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Sep;68(3):250-60. PubMed PMID: 11014406. eng.
37. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, et al. Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1996;277(2):1010-5.

38. Jain G, Jaimes EA. Nicotine signaling and progression of chronic kidney disease in smokers. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jul. PubMed PMID: 23892062. ENG.
39. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 2009 Jan;89(1):73-120. PubMed PMID: 19126755. PMCID: PMC2713585. eng.
40. Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci*. 2005 Jul;28(7):371-8. PubMed PMID: 15979501. eng.
41. Zia S, Ndoye A, Nguyen VT, Grando SA. Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997 Sep;97(3):243-62. PubMed PMID: 9387186. eng.
42. Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Sep;295(3):F654-61. PubMed PMID: 18614620. PMCID: PMC2536882. eng.
43. Rezonzew G, Chumley P, Feng W, Hua P, Siegal GP, Jaimes EA. Nicotine exposure and the progression of chronic kidney disease: role of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jul;303(2):F304-12. PubMed PMID: 22552933. PMCID: PMC3404588. eng.
44. Jaimes EA, Tian RX, Raj L. Nicotine: the link between cigarette smoking and the progression of renal injury? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H76-82. PubMed PMID: 16920799. eng.
45. Li Y-F, LaCroix C, Freeling J. Specific subtypes of nicotinic cholinergic receptors involved in sympathetic and parasympathetic cardiovascular responses. *Neuroscience Letters*. 2009 9/18/;462(1):20-3.
46. Haass M, Kübler W. Nicotine and sympathetic neurotransmission. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 1997 1997/01/01;10(6):657-65. English.
47. Shinozaki N, Yuasa T, Takata S. **Cigarette Smoking Augments Sympathetic Nerve Activity in Patients With Coronary Heart Disease**. *International Heart Journal*. 2008;49(3):261-72.
48. Middlekauff HR, Park J, Moheimani RS. Adverse Effects of Cigarette and Noncigarette Smoke Exposure on the Autonomic Nervous System: Mechanisms and Implications for Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014 10/21/;64(16):1740-50.
49. Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*. 2005;152(4):491-9.
50. Zou W, Zou Y, Zhao Z, Li B, Ran P. Nicotine-induced epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Feb;304(4):L199-209. PubMed PMID: 23204070. eng.
51. Hua P, Feng W, Ji S, Raj L, Jaimes EA. Nicotine worsens the severity of nephropathy in diabetic mice: implications for the progression of kidney disease in smokers. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Oct;299(4):F732-9. PubMed PMID: 20685820. eng.
52. Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L. Antenatal Nicotine Induces Heightened Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in Rat Offspring. *Br J Pharmacol*. 2011 Jul. PubMed PMID: 21777225. ENG.
53. Arany I, Clark J, Reed DK, Juncos LA. Chronic nicotine exposure augments renal oxidative stress and injury through transcriptional activation of p66shc. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Jun;28(6):1417-25. PubMed PMID: 23328708. PMCID: PMC3685305. eng.
54. Arany I, Grifoni S, Clark JS, Csongradi E, Maric C, Juncos LA. Chronic nicotine exposure exacerbates acute renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Jul;301(1):F125-33. PubMed PMID: 21511693. PMCID: PMC3129886. eng.

55. Arany I, Grifoni S, Clark JS, Csongradi E, Maric C, Juncos LA. Chronic nicotine exposure exacerbates acute renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Jul;301(1):F125-33. PubMed PMID: 21511693. PMCID: PMC3129886. eng.
56. Arany I, Reed DK, Grifoni SC, Chandrashekar K, Booz GW, Juncos LA. A novel U-STAT3-dependent mechanism mediates the deleterious effects of chronic nicotine exposure on renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Mar;302(6):F722-9. PubMed PMID: 22169004. PMCID: PMC3311312. eng.
57. Jensen K, Nizamutdinov D, Guerrier M, Afroze S, Dostal D, Glaser S. General mechanisms of nicotine-induced fibrogenesis. *FASEB J*. 2012 Dec;26(12):4778-87. PubMed PMID: 22906950. PMCID: PMC3509054. eng.
58. Jaimes EA, Tian RX, Joshi MS, Raij L. Nicotine augments glomerular injury in a rat model of acute nephritis. *Am J Nephrol*. 2009;29(4):319-26. PubMed PMID: 18849602. eng.
59. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997 Nov;390(6655):45-51. PubMed PMID: 9363890. eng.
60. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of *Klotho* in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Jul;27(7):2650-7. PubMed PMID: 22802580. PMCID: PMC3398064. eng.
61. Nabeshima Y. *Klotho*: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res Rev*. 2002 Sep;1(4):627-38. PubMed PMID: 12362891. eng.
62. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol*. 2003 Dec;17(12):2393-403. PubMed PMID: 14528024. eng.
63. Kuro-O M. *Klotho*, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Jun. PubMed PMID: 23774819. ENG.
64. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW. *Klotho* deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int*. 2010 Dec;78(12):1240-51. PubMed PMID: 20861825. eng.
65. Chen TH, Kuro-O M, Chen CH, Sue YM, Chen YC, Wu HH, et al. The secreted *Klotho* protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in *Klotho* mutant mice. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan;698(1-3):67-73. PubMed PMID: 23041151. eng.
66. Kuro-o M. *Klotho* and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009 10//;1790(10):1049-58.
67. Cha SK, Hu MC, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang CL. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by *Klotho*. *Mol Pharmacol*. 2009 Jul;76(1):38-46. PubMed PMID: 19349416. PMCID: PMC2701452. eng.
68. Kuro-o M. *Klotho* as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem*. 2008 Mar;389(3):233-41. PubMed PMID: 18177265. eng.
69. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone *klotho*. *J Biol Chem*. 2005 Nov;280(45):38029-34. PubMed PMID: 16186101. PMCID: PMC2515369. eng.
70. Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. *Klotho* protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Dec;303(12):F1641-51. PubMed PMID: 23034937. PMCID: PMC3532475. eng.
71. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, Mitobe M, Nishimura S, Shiota S, et al. *Klotho* reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Dec;20(12):2636-45. PubMed PMID: 16204278. eng.
72. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. *Klotho* inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis

- in mice. *J Biol Chem*. 2011 Mar;286(10):8655-65. PubMed PMID: 21209102. PMCID: PMC3048747. eng.
73. Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Jul;8(7):423-9. PubMed PMID: 22664739. PMCID: PMC3752896. eng.
 74. de Oliveira RM. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett*. 2006 Oct;580(24):5753-8. PubMed PMID: 17014852. eng.
 75. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb;104(7):2331-6. PubMed PMID: 17287345. PMCID: PMC1892974. eng.
 76. Tang R, Zhou QL, Ao X, Peng WS, Veeraragoo P, Tang TF. Fosinopril and Losartan Regulate Klotho Gene and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Expression in Kidneys of Spontaneously Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press Res*. 2011 Jun;34(5):350-7. PubMed PMID: 21646815. ENG.
 77. de Borst MH, Vervloet MG, ter Wee PM, Navis G. Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Sep;22(9):1603-9. PubMed PMID: 21852584. PMCID: PMC3171931. eng.
 78. Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, et al. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002 Apr;39(4):838-43. PubMed PMID: 11967236. eng.
 79. Papaioannou AI, Rossios C, Kostikas K, Ito K. Can we delay the accelerated lung aging in COPD? Anti-aging molecules and interventions. *Curr Drug Targets*. 2013; 14(2): 149-57. PubMed PMID: 23256715. eng.
 80. Ortiz A, Grando SA. Smoking and the skin. *Int J Dermatol*. 2012 Mar;51(3):250-62. PubMed PMID: 22348557. eng.
 81. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*. 2005 2005 Aug 20-26;366(9486):662-4. PubMed PMID: 16112303. eng.
 82. Lam-Rachlin J, Romero R, Korzeniewski SJ, Schwartz AG, Chaemsaitong P, Hernandez-Andrade E, et al. Infection and smoking are associated with decreased plasma concentration of the anti-aging protein, α -klotho. *J Perinat Med*. 2013 Sep;41(5):581-94. PubMed PMID: 23770558. eng.
 83. Vervloet MG, van Zuilen AD, Heijboer AC, ter Wee PM, Bots ML, Blankestijn PJ, et al. Fibroblast growth factor 23 is associated with proteinuria and smoking in chronic kidney disease: an analysis of the MASTERPLAN cohort. *BMC Nephrol*. 2012;13:20. PubMed PMID: 22530966. PMCID: PMC3366907. eng.
 84. Pekonen K, Karlsson C, Laakso I, Ahtee L. Plasma nicotine and cotinine concentrations in mice after chronic oral nicotine administration and challenge doses. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1993 3//;1(1):13-8.
 85. Rieg T. A High-throughput method for measurement of glomerular filtration rate in conscious mice. (1940-087X (Electronic)). eng.
 86. Lanças T, Kasahara DI, Gross JL, Pires-Neto RC, Deheinzelin D, Mauad T, et al. Cholinergic Hyperresponsiveness of Peripheral Lung Parenchyma in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration*. 2011;82(2):177-84.
 87. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001 10//;158(2):257-67.
 88. JH B, LH T, I. B. Antidiuretic Action of Nicotine. *British Medical Journal*. 1945;1(4394):403-6. Epub 1945 Mar 24.
 89. Finch CK, Andrus MR, Curry WA. Nicotine replacement therapy-associated syndrome of inappropriate antidiuretic hormone. *South Med J*. 2004 Mar;97(3):322-4. PubMed PMID: 15043349. eng.

90. Tamaoki L, Oshiro-Monreal FM, Helou CM. Effects of nicotine exposure on renal function of normal and hypercholesterolemic rats. *Am J Nephrol*. 2009;30(4):377-82. PubMed PMID: 19684386. eng.
91. Heyman SN, Goldfarb M, Rosenberger C, Shina A, Rosen S. Effect of nicotine on the renal microcirculation in anesthetized rats: a potential for medullary hypoxic injury? *Am J Nephrol*. 2005 May-Jun;25(3):226-32. PubMed PMID: 15908742. eng.
92. Ritz E, Benck U, Franek E, Keller C, Seyfarth M, Clorius J. Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1998;9(10):1798-804.
93. Halimi JM, Philippon C, Mimran A. Contrasting renal effects of nicotine in smokers and non-smokers. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1998;13(4):940-4.
94. Kirtane AJ, Leder DM, Waikar SS, Chertow GM, Ray KK, Pinto DS, et al. Serum Blood Urea Nitrogen as an Independent Marker of Subsequent Mortality Among Patients With Acute Coronary Syndromes and Normal to Mildly Reduced Glomerular Filtration Rates. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 6/7/;45(11):1781-6.
95. Patel KP, Zhang PL, Mayhan WG. Blunting of renal excretory responses to acute volume expansion by nicotine: role of renal nerves. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Sep;274(3):1174-81. PubMed PMID: 7562485. eng.
96. DiBona GF. Neural Control of the Kidney: Past, Present, and Future. *Hypertension*. 2003;41(3):621-4.
97. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of *klotho* gene expression. *Circulation*. 2004 Apr;109(14):1776-82. PubMed PMID: 15037532. eng.
98. Thomson SC, Blantz RC. Glomerulotubular Balance, Tubuloglomerular Feedback, and Salt Homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(12):2272-5.
99. La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*. 1998;351(9101):478-84.
100. Chen LJ, Cheng MF, Ku PM, Lin JW. Rosiglitazone increases cerebral *klotho* expression to reverse baroreflex in type 1-like diabetic rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:309151. PubMed PMID: 24683546. PMCID: PMC3943406. eng.
101. Chen LJ, Cheng MF, Ku PM, Cheng JT. Cerebral *klotho* protein as a humoral factor for maintenance of baroreflex. *Horm Metab Res*. 2015 Feb;47(2):125-32. PubMed PMID: 24867139. eng.
102. Cunha AB, Pedrosa RC, Cunha DM, Saad EA, Flammini F. Norepinefrina e variabilidade da frequência cardíaca: marcadores de disautonomia na cardiopatia chagásica crônica. *Rev Port Cardiol*. 2003;1:29-52.
103. Chakkarwar VA. Fenofibrate attenuates nicotine-induced vascular endothelial dysfunction in the rat. *Vascular Pharmacology*. 2011 11/;55(5-6):163-8.
104. Gmitrov J. Baroreceptor stimulation enhanced nitric oxide vasodilator responsiveness, a new aspect of baroreflex physiology. *Microvascular Research*. 2015 3/;98(0):139-44.
105. Chaswal M, Das S, Prasad J, Katyal A, Fahim M. Chemical sympathectomy restores baroreceptor-heart rate reflex and heart rate variability in rats with chronic nitric oxide deficiency. *Physiol Res*. 2014 Dec 3. PubMed PMID: 25470513. Epub 2014/12/04. Eng.
106. Vervloet MG, van Ittersum FJ, Büttler RM, Heijboer AC, Blankenstein MA, ter Wee PM. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Feb;6(2):383-9. PubMed PMID: 21030580. PMCID: PMC3052230. eng.
107. Abiko H, Konta T, Hao Z, Takasaki S, Suzuki K, Ichikawa K, et al. Factors correlated with plasma renin activity in general Japanese population. *Clin Exp Nephrol*. 2009 Apr;13(2):130-7. PubMed PMID: 19085043. eng.

108. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;101(2):e67-74. PubMed PMID: 15976510. eng.
109. Cheng MF, Chen LJ, Cheng JT. Decrease of Klotho in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:513853. PubMed PMID: 20625492. PMCID: PMC2896693. eng.
110. Maeda I, Hayashi T, Sato KK, Koh H, Harita N, Nakamura Y, et al. Cigarette Smoking and the Association with Glomerular Hyperfiltration and Proteinuria in Healthy Middle-Aged Men. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2011;6(10):2462-9.
111. Zuo Z, Lei H, Wang X, Wang Y, Sonntag W, Sun Z. Aging-related kidney damage is associated with a decrease in klotho expression and an increase in superoxide production. *Age (Dordr).* 2011 Sep;33(3):261-74. PubMed PMID: 20830528. PMCID: PMC3168600. eng.
112. Friedman EM, Hayney M, Love GD, Singer BH, Ryff CD. Plasma interleukin-6 and soluble IL-6 receptors are associated with psychological well-being in aging women. *Health Psychol.* 2007 May;26(3):305-13. PubMed PMID: 17500617. eng.