Lectícia Barbosa Jorge

**Deficiência de Klotho em disfunção de múltiplos órgãos relacionada
à sepse em camundongos**

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade

São Paulo

2017

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

©reprodução autorizada pelo autor

Jorge, Lectícia Barbosa

Deficiência de Klotho em disfunção de múltiplos órgãos relacionada à sepse
em camundongos / Lectícia Barbosa Jorge -- São Paulo, 2017.

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

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Sepse 2.Proteína klotho 3.Lesão renal aguda 4.Citocinas
5.Estresse oxidativo 6.Barorreflexo 7.Camundongos

USP/FM/DBD-212/17

Este trabalho foi 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 (141496/2014-2) 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).

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus pais, Solange e Heleno, meus primeiros mestres. Vocês, sem títulos acadêmicos, foram os responsáveis pelos ensinamentos mais sólidos da minha vida. Vocês me ensinaram valores, me ensinaram amor.

Agradecimentos

Uma tese não se faz sozinha, muito menos uma vida.

Aliás “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”. E eu tenho muita certeza que estive muito bem acompanhada em todo meu caminho para chegar até aqui. E só posso agradecer a cada uma dessas companhias.

Aos meus pais, Solange e Heleno, por terem me oferecido um amor puro e infinito. Também por terem sempre me ensinado o valor do aprendizado. Meu pai sempre falava algo muito parecido com que Einstein também já falou “Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”. Demorei muitos anos para entender, mas meus pais sempre foram gênios. Gratidão eterna a vocês.

Ao meu marido, o melhor que poderia escolher, por toda paciência, amor, companheirismo digo que “podia estar tudo agora dando errado pra mim, mas com VOCÊ... Dá certo!”

À minha irmã, Layla, minha versão melhorada, mais doce, mais meiga e sempre presente. Obrigada também ao meu cunhadinho Lucas por cuidar dela e de toda família.

À toda minha família, meus tios, meus primos, minhas primas e a minha madrinha Tania, obrigada pelo incentivo em todas as horas, pelas companhias e por fazerem eu ter certeza que sempre estarão comigo em todos os momentos.

À Crika minha “babá” que cuida de mim, da minha casa com tanta dedicação e amor.

Agradeço imensamente a cada um dos professores que tive até aqui nessa longa jornada. Cada um me inspirou e me encantou fazendo eu tentar trilhar esse caminho na difícil vida acadêmica. Sem tantos bons exemplos não teria escolhido estar aqui. Obrigada Professoras Tania e Bernadete, Prof. Jocemir, Prof. Rui Toledo, Profª Vik e tantos outros por dividirem o conhecimento de maneira generosa.

À minha orientadora, Profª Dra Lúcia Andrade, por termos concluído juntamente esse trabalho apesar das dificuldades. Obrigada pelos ensinamentos que me fizeram crescer e amadurecer enormemente na vida acadêmica.

Aos meus amigos, que não são muitos, mas são os melhores, porque me aturaram todo o tempo e ainda me aturam nos meus melhores e também nos meus piores dias, vocês foram fundamentais. Destaques para a Fe minha grande companheira no laboratório, acho que não seria possível se eu não tivesse tido uma amiga tão próxima no dia a dia da bancada, aprendendo e sofrendo juntas. À Sassa pelo jeito descontraído, fraterno sempre presente. À Lillian pela maturidade e exemplo de como levar a vida adulta.

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

A todos os funcionários atuais e prévios do LIM 12, à Denise, à Eloá, ao Nivaldo muito obrigada pela receptividade, presteza e simpatia em todos os momentos.

Ao Prof Niels, À Profª Dra Maria Cláudia Irigoyen, Ao Prof Cristóforo Scavone, por terem colaborado tanto com meu trabalho dividindo o conhecimento de técnicas e discussões.

À Profª Dra Denise Malheiros por me ajudar na patologia renal e no dia a dia com enorme carinho.

À toda equipe do Biotério central, à Luci, à Jacque, à Milena, à Cintia, ao Fabio e tantos outros que me ajudaram com a criação e genotipagem dos camundongos.

Ao Leandro, ao Fernando e à Larissa pelas parcerias que tanto ajudaram no meu trabalho.

À FAPESP e CNPQ pelo voto de confiança e o apoio financeiro.

Ao Prof Dr Makoto Kuro-o pela disponibilidade e gentileza em ceder os animais e em compartilhar conosco seu imenso conhecimento.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os residentes da nefrologia, atuais e prévios, pela confiança, pelo carinho e pelo aprendizado. Diariamente, vocês me lembram porque escolhi esse caminho.

Epígrafe

“Vem andar e voa, vem andar e voa, vem andar e voa”

(Marisa Monte)

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	
Lista de Símbolos	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas e Quadros	
Resumo	
Summary	

1. Introdução	1
1.1. Sepses	2
1.2. Epidemiologia da Sepses	6
1.3. Sepses e lesão renal aguda	8
1.4. Sepses no idoso	21
1.5. Gene Klotho	21
1.6. Klotho e rim	29
1.7. Racional do estudo	31
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo Primário	34
2.2 Objetivos secundários	34
3. Métodos	35
3.1. Animais e genotipagem	36
3.2. Modelo de indução de sepses: ligadura e punção do ceco	37
3.3 Curva de sobrevivência	37
3.4. Gaiola metabólica	39
3.5. Análise Bioquímica	39
3.6. Extração, quantificação de proteínas e <i>Western Blotting</i>	39
3.7. Análise Histológica	41
3.8. Marcadores de stress oxidativo	41
3.9. Dosagens de citocinas no tecido renal e plasma	42
3.10. Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	42
3.11. Avaliação hemodinâmica	44
3.12. Análise espectral	48
3.13. Análise estatística	50
4. Resultados	51
4.1. Genotipagem	52
4.2. Avaliação da sobrevivência	53
4.3. Peso, ingestão hídrica e alimentar	54
4.4. Avaliação da lesão renal	56
4.5. Outras disfunções orgânicas	58
4.6. Estresse oxidativo	59
4.7. Resposta inflamatória	60
4.8. Expressão renal do Klotho	63
4.9. Parâmetros hemodinâmicos	64
4.10. Expressão de Óxido Nítrico Sintetase (eNOS)	78
5. Discussão	79
6. Conclusões	88
7. Referências Bibliográficas	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT = alanina aminotransferase

ATP = adenosina trifosfato

bpm = batimentos por minuto

DP = desvio padrão

DMOS = disfunção de múltiplos órgãos e sistemas

DOPA = dopamina

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EMSA = *electrophoretic mobility shift assay*

FC = frequência cardíaca

FGF = *fibroblast growth factor*

FIO₂ = fração inspirado de O₂

FMUSP = Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FOXO = *forkhead box O*

FPR = fluxo plasmático renal

GAPDH = gliceraldeído-trifosfato desidrogenase

GM-CSF = *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

GSH = glutathiona

HF = alta frequência

IGF = *insulin growth factor*

IL = interleucina

INF = interferon

iNOS = óxido nítrico sintetase induzível

IP = intervalo de pulso

IRI = injúria por isquemia e reperfusão

lrpm = incursões respiratórias por minuto

KI^{+/+} = animal knockout para o gene Klotho

KI^{+/-} = animal haploinsuficiente para o gene Klotho

LF = baixa frequência

LPC = ligadura e punção do ceco

LPS = lipopolissacáride

LRA = lesão renal aguda

MCP-1 = *monocyte chemoattractant protein-1*

MgCl = cloreto de magnésio
My88 = fator de diferenciação mielóide-88
NaCl = cloreto de sódio
NADPH oxidase = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NF-kB = *nuclear factor kB*
NORA = noradrenalina
NO = óxido nítrico
eNOS = óxido nítrico sintetase endotelial
PaCO₂ = pressão arterial de gás carbônico
PaO₂ = pressão arterial de oxigênio
PA = pressão arterial
PAD = pressão arterial diastólica
PAM = pressão arterial média
PAMPs = padrões associados a patógenos
PAS = pressão arterial sistólica
PRR = receptores de reconhecimento padrão
PTH = paratormônio
qSOFA = *quick SOFA*
RMSSD = raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos
RR normais adjacentes
RNAm = RNA mensageiro
RNS = espécies reativas de nitrogênio
ROMK = *renal outer medullary potassium channel*
ROS = espécies reativas de oxigênio
RVP = resistência vascular periférica
RT-PCR = *real time polymerase chain reaction*
SARA = Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto
SIRS = síndrome da reação inflamatória sistêmica
SOFA = *The sequential organ failure assesment*
SRAA = sistema renina angiotensina aldosterona
SOD = superóxido dismutase
TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA = ácido tricloroacético
TFG = taxa de filtração glomerular

TGF- β = *tumoral growth factor- β*

TLR = *toll like receptor*

TNF = *tumoral necrosis factor*

TRPV5 = *transient receptor potential cation channel subfamily V member 5*

UF = ultrafiltração

UTI = unidade de terapia intensiva

VFC = variabilidade da frequência cardíaca

VPA = variabilidade da pressão arterial

VLF = frequência muito baixa

WT = *wild type*

LISTA DE SÍMBOLOS

abs	valor absoluto
dL	decilitro
Δ	<i>Delta</i>
g	Grama
°C	Graus centígrados
kg	Kilograma
L	Litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
M	Molar
nM	nanoMolar
%	Porcentagem
Un	unidade normalizada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Operacionalização da avaliação clínica de pacientes com suspeita de sepse e choque séptico.....	5
Figura 2: Participação das alterações macro hemodinâmicas na fisiopatologia da sepse levando a lesão renal aguda.....	10
Figura 3: Mecanismos propostos para a injúria microvascular e o dano tubular renal na sepse.....	15
Figura 4: Ilustração das vias envolvidas na ativação NFkB na sepse.....	17
Figura 5: Teoria Unificadora da Fisiopatologia da LRA na sepse.....	18
Figura 6: Modelo de punção e ligadura do ceco.....	20
Figura 7: Fenótipo dos animais WT comparado com os animais knockout para o gene Klotho.....	23
Figura 8: Representação esquemática dos domínios da proteína klotho transmembrana e secretada.....	25
Figura 9: Ação do Klotho na modulação do canal iônico TRPV5.....	26
Figura 10: Função da proteína Klotho transmembrana e secretada.....	26
Figura 11: Regulação dos fatores de transcrição FOXO pela sinalização via IGF1/insulina.....	27
Figura 12: Efeitos benéficos do Klotho na lesão renal aguda.....	30
Figura 13: Protocolo para avaliação de sobrevida nos animais.....	38
Figura 14: Protocolo experimental para análise de plasma, urina e tecidos.	39
Figura 15: Animais submetidos à canulação da carótida e da veia jugular .	45
Figura 16: Protocolo experimental para avaliação hemodinâmica e barorreflexa.....	47
Figura 17: Genotipagem dos camundongos Klotho por reação em cadeia de polimerase (PCR).....	51
Figura 18: Curva de sobrevida dos animais submetidos à LPC.....	52

Figura 19: Gráfico com Ingestão comida, Ingestão de água e Variação de peso.....	54
Figura 20: Gráficos comparando função renal entre os grupos.....	55
Figura 21: Dano tubular na histologia renal.....	56
Figura 22: Gráficos com avaliação estresse oxidativo.....	58
Figura 23: Análise das citocinas no tecido renal.....	60
Figura 24: Efeitos da deficiência de Klotho na ativação do NF-kB no tecido renal.....	61
Figura 25: Expressão renal do Klotho	62
Figura 26: Medidas da PAM e FC dos grupos antes da realização da cirurgia.....	63
Figura 27: Medidas da PAM e FC antes e após LPC nos grupos $Kl^{+/-}$ e WT	64
Figura 28: Medidas da PAM e FC entre os 4 grupos estudados.....	65
Figura 29: Avaliação barorreflexa pelo índice de bradicardia reflexa.....	67
Figura 30: Avaliação barorreflexa pelo índice de taquicardia reflexa.....	69
Figura 31: Intervalo de pulso e variabilidade da frequência cardíaca dos animais antes experimentos e após LPC.....	71
Figura 32: Análise Espectral antes da realização dos experimentos mostrando uma maior atividade simpática nos animais $Kl^{+/-}$	72
Figura 33: Avaliação da relação LF/HF (simpática/parassimpática) entre os grupos.....	75
Figura 34: Análise Espectral da variabilidade da PA, avaliação do índice alpha e da atividade simpática periférica.....	76
Figura 35: Expressão renal do eNOS.....	77
Figura 36: Potenciais mecanismos de participação do Klotho na sepse.....	87

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Definições para a compreensão da sepse.....	3
Tabela 1: Dados de idade, peso, ingestão hídrica e alimentar nos grupos experimentais.....	53
Tabela 2: Dados referentes à função renal.....	55
Tabela 3: Avaliação da perfusão com lactatemia e função hepática com ALT.....	57
Tabela 4: Avaliação do estresse oxidativo através das dosagens de TBARS e GSH plasmáticos.....	58
Tabela 5: Análise das citocinas plasmáticas.....	59
Tabela 6: Medidas hemodinâmicas dos animais $K^{fl/-}$ e WT antes da realização das cirurgias LPC ou Sham.....	63
Tabela 7: Medidas hemodinâmicas e análise espectral da variabilidade da FC e da PA 24h após a realização LPC ou Sham.....	73

Resumo

Jorge LC. **Deficiência de Klotho em disfunção de múltiplos órgãos relacionada à sepse em camundongos** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A sepse relacionada à disfunção de múltiplos órgãos é caracterizada por uma intensa resposta inflamatória e um aumento do estresse oxidativo. A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação grave e ocorre em aproximadamente metade dos pacientes com choque séptico. Apesar dos avanços no entendimento e tratamento da sepse, as taxas de mortalidade da LRA séptica chegam a 75%, valores ainda inaceitáveis. Mais de 60% dos casos de sepse ocorrem em idosos. A sepse, a lesão renal aguda e a idade avançada são em conjunto uma condição altamente fatal. O Klotho é uma proteína supressora do envelhecimento, com propriedades antioxidantes e que já demonstrou ser nefro-protetora no modelo de lesão renal aguda por isquemia e reperfusão. O papel do Klotho na sepse e na LRA da sepse permanece ainda desconhecido. O objetivo desse estudo foi avaliar se a redução da expressão de Klotho poderia piorar a evolução da sepse e das suas disfunções orgânicas, em especial a LRA. Para isso utilizamos camundongos heterozigotos haploinsuficientes para gene Klotho ($K^{+/-}$) e seus irmãos de linhagem *wild type* (WT) divididos em 4 grupos: 1. Grupo Sham-WT: animais WT submetidos à cirurgia com apenas localização ceco; 2. Grupo LPC-WT: animais WT submetidos à cirurgia com ligação e punção do ceco (LPC); 3. Sham- $K^{+/-}$: animais haploinsuficientes para o gene Klotho submetidos à cirurgia com apenas localização ceco; 4. LPC- $K^{+/-}$: animais haploinsuficientes para o gene Klotho submetidos à cirurgia LPC. Inicialmente foi demonstrado que a sepse é um estado de deficiência de Klotho, já que a expressão renal de Klotho diminuiu após a realização da LPC tanto nos animais WT quanto nos $K^{+/-}$ comparados com seus respectivos grupos Sham. Os animais LPC- $K^{+/-}$ apresentaram uma significativa menor sobrevida quando comparados aos LPC-WT. O grupo LPC- $K^{+/-}$ evoluiu com uma LRA mais severa demonstrada por redução do débito urinário, aumento da ureia plasmática e um pior escore de dano tubular renal. Os animais LPC- $K^{+/-}$ apresentavam ainda uma piora da

perfusão tecidual, evidenciada por um aumento mais significativo do lactato, e também uma maior lesão hepática. A deficiência de Klotho também esteve associada a um aumento do estresse oxidativo, um aumento das citocinas inflamatórias sistêmicas e no tecido renal, bem como a uma maior ativação do NF- κ B. Na avaliação hemodinâmica, curiosamente, os camundongos LPC- $K^{+/-}$ também apresentaram uma menor variabilidade da frequência cardíaca com menor atividade simpática, um prejuízo na resposta barorreflexa e uma resposta deficiente da pressão arterial à droga vasopressora. Podemos concluir, com os achados desse estudo, que a baixa expressão de Klotho reduz a sobrevida, agrava a sepse e suas disfunções orgânicas por aumentar o estresse oxidativo e a resposta inflamatória. A utilização da proteína Klotho no tratamento da sepse e da lesão renal aguda pode constituir-se uma nova perspectiva terapêutica a ser tentada na prática clínica.

Descritores: sepse; proteína Klotho; lesão renal aguda; citocinas; estresse oxidativo; barorreflexo; camundongos

Abstract

Jorge LC. **Klotho deficiency aggravates sepsis-related multiple organ dysfunction** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Sepsis-related multiple organ dysfunction is characterized by an intense inflammatory response and increased oxidative stress. Acute renal injury (AKI) is a serious complication that occurs in approximately half of all patients with septic shock. Despite advances in treatment, sepsis mortality can still be unacceptably high ($\leq 75\%$). More than 60% of all cases of sepsis occur in the elderly. Sepsis, AKI, and advanced age appear to be closely related, making for a highly lethal combination. Klotho is an antioxidant-suppressing protein that is known to protect the kidneys in experimental ischemia. The role of Klotho in sepsis and sepsis-induced AKI remains unknown. The aim of this study was to determine whether reduced Klotho expression could worsen the evolution of sepsis and the associated organic dysfunction, especially AKI. To that end, we used Klotho gene ($K^{+/-}$) haploinsufficient heterozygous mice and their wild-type (WT) littermates, divided into 4 groups: CLP-WT, WT mice submitted to cecal ligation and puncture (CLP) to induce sepsis; Sham-WT, WT mice submitted to surgery with cecum localization only (sham-operated); CLP- $K^{+/-}$, Klotho haploinsufficient mice submitted to CLP; and Sham- $K^{+/-}$, sham-operated Klotho haploinsufficient mice. Initially, sepsis was shown to be a Klotho deficient state, because post-procedure renal expression of Klotho was lower in the CLP-WT and CLP- $K^{+/-}$ groups than in the respective control groups. The CLP- $K^{+/-}$ group showed significantly lower survival than did the CLP-WT group. Sepsis-induced AKI was more severe in the CLP- $K^{+/-}$ group than in the CLP-WT group, the former showing lower urine output, higher plasma urea, and higher renal tubular damage scores. The CLP- $K^{+/-}$ mice also showed decreased tissue perfusion, as evidenced by a more significant increase in lactate, together with greater hepatic injury. Klotho deficiency was also associated with increased oxidative stress, increased systemic/renal tissue inflammatory cytokine production, and greater NF- κ B activation. We find it curious that, in the hemodynamic evaluation, the CLP- $K^{+/-}$ mice had lower heart rate variability with lower

sympathetic activity, a poorer baroreflex response, and a lower blood pressure response to vasopressor agents than did the CLP-WT mice. Our findings suggest that low Klotho expression reduces survival and aggravates sepsis, as well as the associated organic dysfunction, by increasing oxidative stress and the inflammatory response. The use of Klotho protein in the treatment of sepsis and sepsis-induced AKI might constitute a new therapeutic strategy to be evaluated in clinical practice.

Descriptors: sepsis; Klotho protein; acute kidney injury; cytokines; oxidative stress; baroreflex; mice

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sepses

Em todo mundo a sepsis é uma das mais comuns doenças fatais. A primeira descrição dos achados clínicos da sepsis ocorreu ainda na Grécia antiga por Hipócrates (460-377 AC), quem a denominou com termo “σῆψις”, que significa putrefação ou decomposição de material orgânico^{1,2}. Porém, a descrição de que uma infecção disseminada para o sangue associada à liberação de toxinas produzidas pelos patógenos seria o mecanismo fundamental da doença, foi realizada por Hugo Schottmüller (1867-1936) apenas no século XX. No entanto, com advento dos antibióticos modernos, muitos pacientes continuavam morrendo apesar da erradicação bem-sucedida do patógeno incitante¹. Até que finalmente, Lewis Thomas (1913-1993), criou a teoria de que “a sepsis está mais relacionada à resposta do hospedeiro ao microrganismo do que relacionada às características do microrganismo”³. Finalmente, em 1989, Roger C. Bone (1941-1997), descreveu a sepsis como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer durante uma infecção, um conceito que entrou na prática clínica^{4,5}. Em 2003, após o consenso da Conferência internacional de definição da sepsis, pela primeira vez se uniformizou a classificação diagnóstica e os espectros de gravidade da doença como resumido na Quadro 1^{6,7}. Já se via uma clara valorização das disfunções orgânicas como o grande marcador de gravidade na classificação, isso porque as disfunções orgânicas são diretamente relacionadas com aumento da mortalidade.

Quadro 1 - Definições para a compreensão da sepse.

Termo	Definição conceitual
Síndrome de resposta Inflamatória sistêmica (SIRS)	Para sua detecção, são necessárias duas das seguintes condições: - Temperatura > 38,0 °C ou < 36,0 ° - Frequência cardíaca > 90 bpm - Frequência respiratória > 20 irpm ou PaCO ₂ < 32 mmHg - Leucócitos > 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ ou > 10% de bastões
Sepse	SIRS desencadeada por infecção bacteriana, viral, fúngica ou parasitária
Sepse Grave	Presença de sepse acompanhada de um ou mais sinais e/ou sintomas de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica como: livedo reticular, tempo de enchimento capilar maior que 3 segundos, oligúria (débito urinário < 0,5ml/Kg/hora por pelo menos 2 horas); lactato arterial > 2mmol/L; coagulação intravascular disseminada, lesão pulmonar aguda ou SARA; disfunção cardíaca entre outros.
Choque séptico	Presença de sepse grave mais uma das seguintes condições: PAS < 60 mmHg (ou < 80 se o paciente tem histórico prévio de hipertensão) após infusão de 40 a 60 ml/Kg de cristaloides ou 20 a 30 ml/Kg de coloides ou necessidade de drogas vasoativas (dopamina > 5ug/Kg/min ou noradrenalina > 0,25 ug/Kg/min) para manter PAM > 60 mmHg (ou > 80 mmHg se tem histórico de hipertensão)
Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS)	Alterações da função de órgãos de um paciente grave, de modo que a homeostase não pode ser mantida sem intervenção terapêutica; primária se é consequente da própria injúria e secundária, se é oriunda da resposta orgânica do hospedeiro à injúria e a condição mórbida.

Abreviações: SARA, Síndrome da angústia respiratória do adulto; PAS, pressão arterial sistólica; PAM, pressão arterial média, PaCO₂, Pressão parcial de dióxido de carbono. Fonte: SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference⁶.

Em 2016, uma força tarefa, foi responsável por revisar e modificar as definições utilizadas desde a conferência em 2001. Ficou então estabelecido que a sepse deve ser definida como uma disfunção orgânica ameaçadora à vida ocasionada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. A operacionalização clínica atualmente proposta está resumida na Figura 1⁸. Um aumento sequencial de 2 pontos ou mais no SOFA score (*The Sequential Organ Failure Assessment*) se associa com uma mortalidade intra-hospitalar maior que 10%, e o choque séptico possui uma mortalidade ainda maior que a sepse isolada, em torno de 40%. Para uma triagem rápida extra-hospitalar ou nos departamentos de emergência a proposta atual é a utilização do qSOFA (*quickSOFA*) como descrito na Figura 1⁸.

É importante notar que o reconhecimento de disfunções orgânicas passou a ser fator fundamental no estabelecimento do diagnóstico da sepse. A terminologia SIRS e sepse grave foram excluídas para simplificar a classificação. Os autores justificaram que as limitações da classificação anterior seriam um foco excessivo na inflamação com uma inadequada especificidade e sensibilidade da SIRS e um modelo enganoso no qual a sepse segue um contínuo através da sepse grave ao choque séptico, sendo a sepse grave um termo redundante⁸.

Figura 1 – Operacionalização da avaliação clínica de pacientes com suspeita de sepse e choque séptico. Abreviações: PAM, pressão arterial média; Dopa, dopamina; Nora, noraepinefrina; SOFA, The Sequential Organ Failure Assessment; qSOFA, quick SOFA

1.2 Epidemiologia da sepse

A sepse continua a ser um fardo significativo para a sociedade, recentemente citada como a principal causa de morte intra-hospitalar nos Estados Unidos⁹ e consumindo quase metade dos recursos das unidades de terapia intensivas (UTI)¹⁰. Um estudo recente revisou detalhadamente a epidemiologia da sepse nos Estados Unidos entre os anos de 2008 à 2012 e encontrou uma incidência anual crescente de sepse de 346/100.000 a 436/100000 pessoas/ano. A incidência de indivíduos com 3 ou mais disfunções orgânicas também vem aumentando de 31.6% para 35.5% e eles representam cerca de 57.2 a 66.7% do número total de mortes. Apesar disso a mortalidade vem diminuindo de 22.2% para 17.3%. Interessantemente, esse estudo demonstrou ainda que pacientes com sepse possuem uma idade 69 anos em média e que a disfunção orgânica mais comumente associada à sepse é a renal, acontecendo em mais de 50% dos casos¹¹.

No Brasil, temos poucos dados epidemiológicos, mas segundo um estudo realizado por Silva E e cols ¹² em 5 unidades de terapia intensiva (UTI) nos estados de São Paulo e Santa Catarina, foi identificado uma incidência de 57,9 por 1000 pacientes-dia (95% IC 51,5 – 65,3) e uma taxa de mortalidade da sepse, da sepse grave e do choque séptico de 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente.

Outros estudos como COSTS I e Sepse Brasil apresentaram resultados com taxas muito similares^{13,14}. Neste último se evidenciou que a taxa de mortalidade do choque séptico no Brasil é uma das mais elevadas no mundo e também identificou que as principais fontes de infecção nas UTI brasileiras,

foram o trato respiratório (69%) e o abdômen (23,1%), sendo os bacilos gram-negativos os mais prevalentes (40,1%), seguidos pelos cocos gram-positivos (32,8%) e as infecções fúngicas (5%). O estudo COSTS I demonstrou também que a sepse gera um custo médio de 9632,00 dólares americanos por paciente (95% IC 8657 – 10672) ^{13,14}.

Com base nos dados epidemiológicos apresentados, fica claro que estudos para o entendimento da fisiopatologia da sepse e suas disfunções orgânicas são necessários e urgentes, visando um melhor entendimento para uma elaboração de propostas terapêuticas mais eficientes nesse contexto.

1.3 Seps e lesão renal aguda

A lesão renal aguda (LRA) é a disfunção orgânica mais frequente da seps¹¹, e a seps é também a causa mais frequente de LRA. Essa associação possui uma alta predileção por idosos¹⁵. A LRA séptica tem alta mortalidade intra-hospitalar (30–70 %), e ainda aumenta mais que duas vezes o risco de desenvolver desfechos negativos em até 5 anos após a alta hospitalar, incluindo um aumento na incidência de doença renal crônica estágio final, quando comparados a pacientes sem LRA¹⁶.

O tratamento da LRA séptica permanece um grande desafio em todo mundo e apesar de um imensurável esforço da comunidade científica poucos avanços em relação aos tratamentos e marcadores específicos aconteceram. A escassez de informação histopatológica é sem dúvida um fator limitante. Hoje a compreensão da patogênese é ainda limitada, mas está claro que a LRA séptica é profundamente diferente LRA isquêmica tanto no ambiente experimental como clínico. Descobertas recentes têm desafiado o dogma de que, no curso da seps e do choque séptico, a IRA é meramente uma consequência do dano isquêmico devido à hipoperfusão tecidual¹⁷.

A fisiopatologia da LRA séptica é complexa e multifatorial e inclui alterações hemodinâmicas, resposta inflamatória e disfunção endotelial. Devido à complexidade, deve-se notar que nenhuma via única pode explicar todas as características encontradas na LRA séptica. Cada paciente com LRA séptica se move ao longo de uma trajetória de doença individual. Portanto, os alvos terapêuticos variam com as condições subjacentes pré-existentes, o curso do tempo e a trajetória da doença. Embora muitos potenciais alvos de fármacos

tenham sido identificados em modelos animais de sepse e LRA, a translação da bancada para a prática clínica tem sido extremamente difícil. Isso vem sendo atribuído às características da doença (sua complexidade e heterogeneidade), aos ensaios clínicos inadequados e à modelos animais que não mimetizam completamente à sepse humana¹⁸.

Os mecanismos fisiopatológicos principais da LRA séptica estão detalhados a seguir:

✓ ***Fatores Hemodinâmicos – Macro e Microcirculatórios***

Por definição a LRA é a queda abrupta da taxa de filtração glomerular (TFG), o questionamento que fica é por que a TFG diminui na sepse? Em 2004, Wang W e cols¹⁹, defendiam que a LRA na sepse inicialmente ocorreria por uma vasoconstrição renal com uma função tubular intacta. Após uma bacteremia ou uma endotoxemia, citocinas seriam liberadas causando um aumento na liberação de óxido nítrico que por sua vez levaria a uma queda na resistência arterial periférica e isso ativaria uma vasoconstrição renal secundária com consequente queda da TFG. O mecanismo fisiopatológico proposto é simplista, focado apenas na macro hemodinâmica e está esquematizado na Figura 2.

Ainda nesse mesmo artigo temos a afirmação que “a *marca hemodinâmica da sepse é a vasodilatação generalizada*”¹⁹. Então, qual é o comportamento do fluxo plasmático renal (FPR) na sepse e no choque séptico? O mecanismo que leva à LRA seria mesmo uma vasoconstrição? Ou uma vasodilatação poderia reduzir a TFG? Para iniciar essa discussão alguns conceitos sobre auto-regulação renal são importantes.

Figura 2 (adaptada) – Participação das alterações macro hemodinâmicas na fisiopatologia da sepsis levando à lesão renal aguda¹⁹. Abreviações SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona.

A TFG pode ser reduzida por diferentes comportamentos das arteríolas aferentes e eferente como exemplificado nas situações abaixo:²⁰

- TFG pode reduzir se arteríola aferente contrai.
- TFG pode reduzir se arteríola eferente dilata e a aferente permanece do mesmo tamanho.
- TFG pode diminuir se arteríola aferente dilata, mas a eferente dilata ainda mais.

O comportamento do FPR em modelos experimentais de sepse como infusão de LPS ou bactérias vivas, apresenta uma grande heterogeneidade, porém a tendência majoritária é encontrar um FPR normal ou aumentado²¹. Em 2003, estudos com avaliação hemodinâmica em ovelhas sépticas já demonstravam que esses animais apresentavam um aumento do FPR associados a uma diminuição da resistência vascular periférica (RVP) além de uma redução da TFG e do débito urinário. Demonstraram ainda que drogas vasopressoras como a noradrenalina eram capazes de melhorar o fluxo urinário. Esse trabalho trouxe a ideia de que a lesão renal aguda da sepse é um estado de hiperemia e não isquemia e, se isso fosse verdade, drogas vasoconstritoras deveriam melhorar a lesão renal aguda da sepse²². Em contraste, Benes e cols. demonstraram em dois diferentes modelos de choque séptico que a RVP renal aumentou em animais com disfunção renal²³. Essa resposta vasoconstritora renal ocorreu na presença de vasodilatação em outras partes do corpo, sugerindo a redistribuição do fluxo sanguíneo, conforme proposta na teoria da Figura 2.

A medição do FPR à beira leito é desafiadora e os dados disponíveis na sepse humana são limitados e não confiáveis. A grande maioria dos estudos utilizando diversas técnicas para essa medida (termodiluição, termodiluição retrógrada, doppler renal, ressonância magnética com contraste de fase) demonstraram uma redução do FPR. No entanto, o FPR absoluto não se correlacionou com a TFG e se as alterações no índice resistividade renal ou FPR são a causa ou consequência da LRA, ou mesmo apenas um epifenômeno, permanece obscuro²¹. Inversamente a mensuração do FPR em estudos experimentais, os estudos clínicos fazem uma mensuração mais

tardia, em geral com a LRA já instalada, o que pode justificar em parte a ocorrência de dados tão conflitantes.

Estudos clínicos observacionais relataram associações significativas entre instabilidade hemodinâmica sistêmica e a disfunção renal no choque séptico, e estabeleceram uma relação de quanto maior o tempo decorrido para a correção da pressão arterial média (PAM) menor o débito urinário e maior a creatinina. No entanto, o grau de hipotensão pode simplesmente ser um marcador de gravidade da doença e alguns estudos não conseguiram estabelecer uma associação independente da PAM ou da pressão média de perfusão renal com LRA. Além disso, a LRA também é comum em sepse sem instabilidade hemodinâmica²¹. Por exemplo, em pacientes hospitalizados por pneumonia adquirida na comunidade, Murugan e cols encontraram LRA em mais de um terço dos pacientes, apesar de que apenas 16% estavam internados na UTI e menos de 10% utilizando de drogas vasopressoras²⁴.

A maioria dos estudos experimentais e clínicos sugerem uma atenuação da disfunção renal com a administração de vasopressores no choque séptico. Em pacientes com choque séptico tratados com norepinefrina, Martin e cols mostraram que a restauração adequada da PAM foi associada à uma melhora do débito urinário e da depuração da creatinina²⁵. No entanto, o benefício dos efeitos do aumento da PAM para níveis superiores a 65 mm Hg são muito duvidosos. Deruddre e cols observaram que o aumento da PAM de 65 para 75 mmHg melhorou o débito urinário, mas o aumento da PAM para níveis superiores a 85 mm Hg não proporcionou nenhum benefício adicional²⁶. Ainda acreditando-se que a vasodilatação da arteríola eferente contribua para a LRA séptica, seria razoável que drogas que ocasionem vasoconstrição da arteríola

eferente fossem eficientes em melhorar a TFG na sepse. Nesse sentido, os usos de diversos vasoconstrictores já foram testados na sepse. A angiotensina II é um vasoconstritor de arteríola eferente e em estudos experimentais foi capaz de diminuir o FPR e aumentar a TFG e volume urinário²⁷. A vasopressina, uma droga agonista dos receptores V1, também é capaz de fazer uma vasoconstrição de arteríola eferente. Em modelos experimentais foi capaz de reduzir o FPR e aumentar o débito urinário²⁸. Em humanos já foi demonstrado um aumento do FPR²⁹ e o uso de vasopressina foi capaz de reduzir a creatinina e melhorar a sobrevida como demonstrado no *VAST study*³⁰.

O benefício do uso de vasoconstrictores na LRA da sepse é um dado mais consistente, ocorre tanto em estudos clínicos quanto experimentais e estão descritos mesmo na sepse normotensiva. Até o momento, o que sabemos é que o FPR está dissociado da função renal na LRA da sepse, mas os mecanismos envolvidos nessa dissociação permanecem controversos. As tentativas de concentrar seletivamente o tratamento da LRA séptica no FPR em grande parte não possuem êxito, uma vez que alterações do fluxo intra-renal e microcirculatórias parecem ser dominantes no quadro²¹.

Vários importantes processos ocorrem no ambiente microcirculatório, incluindo a difusão do O₂ e nutrientes para os tecidos bem como a regulação do movimento de fluidos no interstício. As alterações microcirculatórias durante a sepse são generalizadas e podem estar presentes em praticamente todos os órgãos incluindo o coração, o intestino, o fígado, o cérebro e o rim. Essas alterações consistem em redução do fluxo microcirculatório geral e uma maior heterogeneidade de distribuição desse fluxo, resultando em distâncias de

difusão de oxigênio aumentadas (áreas de hipoxia tecidual). Além disso, as alterações microcirculatórias podem levar ao aumento no tempo de trânsito dos leucócitos através dos capilares, possivelmente potencializando a inflamação²¹. É razoável a hipótese que essa alteração microcirculatória generalizada possa contribuir sobremaneira para a disfunção de múltiplos órgãos, incluindo a LRA. Um corpo sólido de evidências experimentais sustenta que o fluxo microcirculatório renal na sepse é reduzido, e essas alterações podem permanecer mesmo após uma expansão volêmica adequada³¹. As causas que justificam a lentificação do fluxo microcirculatório na sepse não estão totalmente elucidadas. Abaixo alguns dos mecanismos propostos (Figura 3)²¹:

- a) Citocinas inflamatórias causam aumento na expressão de moléculas de adesão³², aumento no tráfico de leucócitos³³ resultando na formação de microtrombos e obstrução capilar.
- b) Um aumento ou uma diminuição na regulação de diversos componentes vasoativos podem causar uma distribuição heterogênea do fluxo sanguíneo com áreas de vasodilatação e vasoconstrição criando regiões de hipóxia. Por exemplo, na sepse ocorre uma “*up-regulation*” da óxido nítrico sintetase induzível (Inos) que aumenta a produção do óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). A expressão renal de iNOS ocorre tanto no endotélio, quanto nos macrófagos e neutrófilos³⁴ e ainda em células tubulares renais³⁵.
- c) Mecanismos adicionais incluem ativação da NADPH oxidase³⁶ (mais importante precursora de espécies reativas de oxigênio), desacoplamento do eNOS³⁷ com redução formação NO e aumento formação espécies reativas de oxigênio.

d) A sepse causa dano do glicocálice³⁸ e uma alteração da barreira endotelial³⁹ permitindo o vazamento e acúmulo de fluido intersticial. O edema ainda contribui para aumentar o espaço para a difusão do oxigênio e diminuir fluxo microvascular.

Figura 3 (adaptada) – Mecanismos propostos para a injúria microvascular e o dano tubular renal na sepse²¹. Abreviações: ROS, espécies reativas de oxigênio; RNS, espécies reativas de nitrogênio; iNOS, óxido nítrico sintetase-induzida; eNOS, óxido nítrico sintetase endotelial

✓ Fatores imunológicos e inflamatórios

A sepse desenvolve-se quando a resposta inicial apropriada do hospedeiro a uma infecção torna-se amplificada e desregulada. No momento,

fortes evidências sugerem que a sepse induz uma resposta imunológica com a ativação de maneira sequencial de mecanismos pró e anti-inflamatórios¹⁷.

Após uma interação inicial entre hospedeiro e o microrganismo infectante ocorre uma forte ativação da imunidade inata, que é a responsável por coordenar a defesa do organismo através de componentes celulares e humorais. Isso conduz a liberação de várias citocinas, como as interleucinas (IL) 1 e 6 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Por fim, ocorre a progressão o estágio conhecido como “tempestade de citocinas”, associado à instabilidade hemodinâmica, disfunções orgânicas e choque séptico. Compensatoriamente a esse processo, acontece uma resposta anti-inflamatória que ocasiona um estado de imunossupressão gerado pela alteração na produção de citocinas e na apresentação de antígenos por monócitos, uma redução na proliferação de linfócitos e um aumento da apoptose. É muito importante notar que esses estágios de resposta do hospedeiro à infecção podem acontecer simultaneamente no decorrer da sepse¹⁷.

Como descrito acima, o estado inflamatório da sepse é iniciado com a ativação do sistema imunológico inato. Uma revisão recente⁴⁰, apoia a teoria que a LRA séptica é uma resposta adaptativa das células tubulares a um sinal inflamatório prejudicial. Os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e os chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelo sistema imune para combater a infecção, mas, simultaneamente, causam lesão da célula hospedeira. Células tubulares podem reconhecer esses PRRs e PAMPs por vários receptores, incluindo receptor *Toll-like* 4 (TLR 4), levando a sobre-expressão do fator nuclear-kB (NF-kB) e do TNF- α através de uma molécula mensageira, o fator

de diferenciação mielóide 88 (My88). Essa ativação pode causar uma lesão celular tubular. O TNF- α pode induzir lesão renal direta e é um preditor independente da LRA na sepse, o que apoia sua relevância na patogênese⁴¹. A Figura 4 apresenta um esquema simplificado com exemplos de PRRs (como a proteína de grupo de alta mobilidade B1), PAMPs (como lipopolissacarídeos bacterianos) e a sepse polimicrobiana levando a ativação de vias intracelulares, principalmente a ativação do NFkB e consequente aumento das citocinas inflamatórias que levarão a dano celular.

Figura 4 (adaptada) – Ilustração das vias envolvidas na ativação NFkB na sepse⁴². Abreviações: TLR4, “*toll like receptor 4*”; LBP, proteína ligadora de LPS circulante; LPS, lipopolissacarídeos bacterianos; TNF- α , fator de necrose tumoral- α ; My88, fator de diferenciação mielóide 88; IRAK, receptor de interleucina associado a quinase; TRAF, receptor associado ao TNF; MAPK, proteína-quinases ativadas por mitógenos, p38; NF-Kb, fator nuclear-Kb.

Em 2014, grandes estudiosos tentaram unir várias das teorias hoje propostas para explicar a LRA em uma “teoria unificadora” que focasse na complexidade e na etiologia multifatorial. A Figura 5, apresenta um resumo dos mecanismos discutidos^{40,41}.

Figura 5 (adaptada) – Teoria unificadora da fisiopatologia da LRA na sepse⁴¹. NO, óxido nítrico; FPR, Fluxo plasmático renal; iNOS, óxido nítrico sintetase induzida; TFG, taxa de filtração glomerular; UF, ultrafiltração; PRRs, receptores de reconhecimento de padrões; PAMPs, padrões moleculares associados a patógenos.

✓ **Modelos experimentais de LRA na sepse**

Os modelos experimentais de LRA na sepse são muito importantes para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos e para o teste de possíveis alvos terapêuticos. Não existe um modelo que mimetize completamente a sepse e suas disfunções, devido à complexidade da doença, e comumente existe uma dissociação clínico-experimental. Apesar disso, avanços no conhecimento científico dependem de modelos animais e seus aprimoramentos. No momento, três modelos experimentais são utilizados para o estudo da sepse e suas disfunções, principalmente a LRA séptica. São eles: o modelo da endotoxemia (com administração intravenosa de LPS); o modelo de ligadura e punção do ceco (LPC); e finalmente, a peritonite com stent no cólon ascendente. Os dois últimos têm em comum a exposição do abdome aos fatores polimicrobianos (comumente fezes). Os três modelos podem ter taxas de mortalidade semelhantes, entretanto, os picos de citocinas e o curso fisiopatológico são distintos⁴³.

Na prática, o modelo LPC é o mais amplamente utilizado e está representado na Figura 6. Não existe uma padronização da cirurgia na literatura e a severidade da doença pode variar dependendo do comprimento do ceco ligado, do número e tamanho de punções. A vantagem desse modelo é que, assim como na sepse humana, ele apresenta uma fase inflamatória, com uma resposta de citocinas muito similar, seguida de uma fase anti-inflamatória compensatória. Usualmente os animais ficam hipotensos e não possuem a fase hiperdinâmica, como na sepse humana, mas uma expansão volêmica adequada nos animais pode gerar essa situação. Hoje, a maioria dos trabalhos utiliza expansão volêmica e tratamento com antibiótico visando

aproximar as respostas do modelo às encontradas na sepse humana. Alguns estudos nesse modelo também falham em encontrar uma disfunção renal e pulmonar importante como vista na sepse. Essa variação em encontrar disfunções utilizando esse modelo pode estar relacionada com as diferenças da gravidade ao se escolher local da ligadura e número de punções. Mas, hoje também se discute um outro aspecto fundamental aos modelos experimentais. Para tentar replicar a sepse humana é importante atentar para características epidemiológicas altamente prevalentes nos pacientes com sepse, como a idade avançada e a presença de comorbidades (por exemplo, a doença renal crônica). Por exemplo, é possível que ao tentarmos utilizar um modelo com animais mais velhos, ou animais com lesão renal prévia consigamos uma aproximação no comportamento encontrado na sepse em humanos⁴³.

Figura 6 (adaptada) - Modelo de punção e ligadura do ceco

1.4 Sepses no idoso

Aproximadamente 60% dos casos de sepsis e 80% dos casos de óbitos por sepsis acontecem em pacientes com mais de 65 anos, podendo então ser considerada uma doença de idosos⁴⁴. A idade aumenta exponencialmente a incidência de sepsis e é ainda um fator independente para mortalidade em adultos hospitalizados por sepsis⁴⁵. A população vem envelhecendo mundialmente e estima-se que até 2030 a população com mais de 60 anos terá dobrado no mundo chegando a incríveis 1,4 bilhões de pessoas⁴⁶. Com isso é esperado um aumento da incidência e da mortalidade por sepsis.

A razão para um maior risco de sepsis, uma maior mortalidade e gravidade nesse grupo específico de doentes ainda permanece indeterminada⁴⁷. A idade avançada tem sido caracterizada como um estado pró-inflamatório, porém pouco se sabe sobre a resposta inflamatória do idoso mediante um insulto agudo⁴⁸. Modelos experimentais de infecção suportam que animais mais velhos apresentam níveis mais elevados de marcadores inflamatórios, mais apoptose esplênica e maior mortalidade^{49,50,51}.

1.5 Gene Klotho

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 foram denominados Klotho, deusa grega responsável por tecer o fio da vida, mesmo nome dado ao gene que teve o *locus* interrompido não intencionalmente, por uma mutação insercional, resultando num alelo fortemente hipomórfico^{52,53}.

Os animais *kl/kl* (*knockout* para o gene Klotho) eram indistinguíveis dos animais selvagens (WT) ou heterozigotos haploinsuficientes (*Kl^{+/−}*) até a terceira ou quarta semana de vida. A partir de então, passavam a apresentar retardo do crescimento (Figura 7), 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^{52,53}. Gradualmente eles vão se tornando menos ativos, e morrem prematuramente com aproximadamente 8-9 semanas de vida. Sua sobrevivência média é de 60 dias, e não sobrevivem mais do que 100 dias. Esses animais são incapazes de se reproduzir, porque seus órgãos genitais, testículos, úteros e ovários são atróficos⁵². Esse fenótipo se apresenta somente em animais homozigotos para esse transgene e a transmissão segue o padrão de herança mendeliana. O background genético do camundongo Klotho inicial era uma mistura de C57BL/6J e C3H/J.

Figura 7 - Fenótipo dos animais WT comparado com os animais knockout para o gene Klotho (*kl/kl*). Na foto, animal *kl/kl* comparado com WT, 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 intra-renais 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^{52,54}.

Os animais *kl/kl* possuem 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 hormônios⁵⁵. Acredita-se que a

hiperfosfatemia seja a principal alteração responsável pelo envelhecimento nesses animais, visto que a deleção dos canais co-transportadores sódio-fosfato 2a, 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^{55,56}. Os camundongos $Kl^{+/-}$ tem fenótipo semelhante aos seus correspondentes selvagens, mas apresentam níveis da proteína Klotho diminuídos⁵⁷.

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, a proteína está representada na Figura 8. Homólogos são encontrados em humanos e em ratos. As repetições extracelulares exibem homologias com as beta-glicosidases. Klotho RNAm é predominantemente expresso nos túbulos renais distais e no plexo coróide⁵⁵. A expressão do gene pode ser detectada na hipófise, placenta, músculo esquelético, bexiga, aorta, pâncreas, testículos, ovários, cólon e glandula tireóide, mas em menor quantidade que no cérebro e no rim⁵². O RNA mensageiro Klotho humano codifica uma proteína de 1012 aminoácidos que mostra uma identidade de 86% com a proteína Klotho do camundongo e a sua localização cromossomal é 13q12⁵². Essa proteína transmembrana age como um cofator, convertendo os receptores do fator de crescimento fibroblástico em receptores específicos para fator de crescimento fibroblástico-23 (FGF-23), promovendo balanço negativo de fósforo por inibição da síntese da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e indução de fosfatúria^{53,58}. Sem o Klotho, o FGF23 não consegue, em concentrações fisiológicas, se ligar e ativar o seu receptor⁵⁶.

Figura 8 - Representação esquemática dos domínios da proteína klotho transmembrana e secretada. Abreviações: TM, transmembrana; mKL1 domínio extracelular

Outros órgãos, que também apresentam alterações nos mutantes, não apresentam transcritos de klotho detectáveis por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), como pulmões, pele e osso, sugerindo um efeito hormonal da proteína Klotho⁵². 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 líquido⁵³.

A forma secretada, chamada 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 (Figura 9). Dessa forma o Klotho solúvel modula os canais de cálcio (TRPV5), os co-transportadores sódio-fosfato 2a e o canal de potássio da medula externa (ROMK)^{53,58}. O Klotho secretado atua sobre os canais ROMK1, evitando a sua internalização e promovendo uma maior secreção tubular de potássio⁵⁹.

Além disso, já foi demonstrado que a proteína Klotho secretada regula múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo insulina/IGF1 e Wnt (Figura 10)⁶¹.

Figura 9 (adaptada) – Ação do Klotho na modulação do canal iônico TRPV5⁶⁰. Abreviações: TRPV5, *transient receptor potential cation channel subfamily V member 5* (canais de cálcio).

Figura 10 (adaptada) – Função da proteína Klotho transmembrana e secretada. Sua forma transmembrana aumenta a afinidade do receptor de FGF (FGFR) ao fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23). A sua forma secretada é clivada pelas enzimas ADAM 10 ou 17 que possuem ações nos canais de cálcio aumentando o influxo de cálcio (TRPV5/6), na inibição via wnt e no receptor de fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1⁶⁰.

O α -Klotho inibe a cascata de sinalização intracelular via IGF1/insulina (Figura 11). Na ausência da estimulação do receptor de IGF1/Insulina, há uma redução da fosforilação do fator de transcrição *forkhead box O* (FOXO). Dessa forma, o 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 superóxido dismutase (SOD) e da catalase, aumentando a sua expressão e facilitando, assim, a remoção das ROS^{61,62}. Animais transgênicos que tem expressão aumentada da proteína Klotho são capazes de sobreviver após a injeção de quantidades letais de paraquat, um liberador potente de ROS⁶².

Figura 11 (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 SOD2⁶¹. Abreviações: FOXO, fator de transcrição forkhead box O; SOD2, superóxido dismutase.

A proteína Klotho secretada também modula a sinalização via Wnt por ligação direta e 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 fatores de crescimento tumoral beta (TGF- β) induzidas por essa via de sinalização, que tem papel importante na fibrogênese em diversos tecidos^{61,62}.

Outro importante papel do Klotho solúvel é a modulação da atividade inflamatória através da inibição do NF- κ B por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos⁶³. Acredita-se que essa inibição seja secundária a uma redução na expressão do TNF- α causada pelo Klotho. Porém, muitos são os pontos reguladores da ativação do NF- κ B induzida pelo TNF- α . Um estudo prévio realizado com cultura de células epiteliais renais demonstrou que a via envolvida não seria a via clássica da inibição da fosforilação do IKK, mas também não determinou o exato mecanismo da inibição do NF- κ B pelo Klotho⁶⁴.

1.6 Klotho e rim

Apesar de ser expresso em tecidos diversos, o Klotho tem uma expressão particularmente alta nas células do túbulo distal no rim⁵³. A transcrição renal do klotho é marcadamente diminuída na doença renal crônica e em diversas outras situações como nefropatia obstrutiva, nefropatia diabética e glomerulonefrites crônicas. Em voluntários saudáveis, os níveis séricos de Klotho se correlacionaram com a creatinina sérica, a uréia e o FGF23. Os níveis urinários de Klotho diminuem precocemente em pacientes com doença renal crônica⁵³, embora a dosagem sérica em estudos com pacientes renais crônicos ainda tenha resultados conflitantes.

A deficiência transitória de Klotho já foi identificada em diversos modelos experimentais de LRA⁵³, incluindo isquemia-reperfusão^{61,66}, obstrução ureteral⁶⁷, sepse induzida por lipopolissacáride, hipovolemia e nefrotoxicidade por cisplatina⁶⁸. O papel do Klotho na sepse e na LRA ainda não foi determinado. Na lesão de isquemia-reperfusão, ocorre uma diminuição dos níveis de Klotho, que se reverte após a recuperação. Além disso, níveis mais baixos de Klotho exacerbam a lesão renal e sua administração da proteína Klotho permite uma atenuação do dano renal⁵⁷.

A diminuição do Klotho é capaz de levar à senescência das células epiteliais renais e a sua suplementação bloqueia o envelhecimento induzido por estresse oxidativo⁶⁹. Num modelo de doença glomerular por mutação genética, o aumento da expressão de Klotho promoveu uma redução da apoptose, das células senescentes e do estresse oxidativo no tecido renal⁷⁰.

Os camundongos *kl/kl* tem fibrose túbulo-intersticial, 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 que foram atenuadas pela administração de Klotho, através da sua atuação como regulador negativo da sinalização via Wnt^{65,67,68}.

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 (Figura 12)⁶⁸.

Figura 12 (adaptada) – Mecanismo proposto para os efeitos benéficos do Klotho na lesão renal aguda⁶⁶.

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), que tem um papel importante na progressão da doença renal e em suas complicações, também se correlaciona com o Klotho. A angiotensina II é capaz de reduzir a expressão renal do gene Klotho via receptor AT1 de maneira independente da pressão arterial^{71,72}. A indução da proteína Klotho em animais foi capaz de atenuar a lesão renal causada por infusão de angiotensina II⁷³.

1.7 Racional do estudo

Como já dito, a sepse é mais grave e prevalente em idosos, e esse grupo apresenta uma menor expressão de Klotho. Como já descrito, o Klotho é um gene implicado na longevidade com papel anti-envelhecimento (por inibição do estresse oxidativo e controle do metabolismo do fósforo) e anti-fibrótico (como regulador negativo da via Wnt). Além disso, a expressão de Klotho também foi capaz de suprimir o TNF- α e a ativação do NF- κ B⁷⁴, dois mediadores importantes, envolvidos na fisiopatologia da LRA na sepse. Com base nesses conhecimentos formulamos o questionamento que foi a base racional para realização do nosso trabalho. Qual o papel do Klotho na sepse e nas suas disfunções orgânicas, em especial na LRA?

Em 2013, após nossos estudos já terem se iniciado, Inokuchi e cols publicaram um estudo onde estudaram a sepse em animais *kl/kl* comparados com animais WT. Eles mostraram uma diferença importante na mortalidade e resposta inflamatória entre os grupos⁷⁵. Os animais *Kl^{+/+}* não foram avaliados nesse estudo e esse é justamente o grupo que estamos estudando e motivou nossa pesquisa desde início. Isso porque os camundongos *Kl^{+/+}* são fenotipicamente idênticos aos WT, enquanto os *kl/kl* são tão mais frágeis que isso isoladamente justificaria a incrível mortalidade encontrada por Inokuchi e cols. Além disso, realizar um estudo em animais fenotipicamente similares, distintos apenas na quantidade de expressão do Klotho, parece ter uma maior relevância clínica. Isso tendo em vista que correspondências com situações como a senescência e a doença renal crônica, que se apresentam com deficiência parcial de Klotho, podem ser sugeridas. A ausência de expressão

de Klotho com fenótipo de envelhecimento precoce, como o que acontece nos animais *kl/kl* não é ainda descrita em humanos afastando ainda mais esse modelo de uma aplicação na prática clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

- Estudar a participação da deficiência de klotho na sepse e suas disfunções orgânicas e quais vias poderiam estar implicadas.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar se a deficiência da Klotho pode alterar a sobrevida na sepse.
- Avaliar se a deficiência de Klotho acentua a lesão renal aguda e outras disfunções orgânicas relacionadas à sepse.
- Avaliar se a deficiência de Klotho altera a resposta inflamatória e o estresse oxidativo.
- Avaliar se a deficiência de expressão de Klotho altera a resposta hemodinâmica na sepse.
- Avaliar se a sepse é um estado de deficiência de Klotho.

3 MÉTODOS

3.1 Animais e genotipagem

Foram utilizados camundongos com 8-12 semanas heterozigotos haploinsuficientes no gene Klotho ($Kl^{+/-}$) e selvagens (*Wild-type*, WT), com background genético 129 S1/SvImJ, cedidos pelo Prof Dr Makoto Kuro-O (University of Texas Southwestern Medical Center, EUA) e mantidos no Biotério Central da FMUSP. Os animais utilizados no estudo resultaram do cruzamento dos camundongos $Kl^{+/-}$ 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 FMUSP (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 11 de maio de 2011 (protocolo número 395/10).

A genotipagem dos animais foi realizada no Biotério Central por técnica de PCR, através de fragmentos da cauda⁵².

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- a. **Grupo 1 (Sham-WT):** Animais WT submetidos à cirurgia com apenas localização ceco
- b. **Grupo 2 (LPC-WT):** Animais WT submetidos à cirurgia com ligação e punção do ceco (LPC)
- c. **Grupo 3 (Sham- $Kl^{+/-}$):** Animais haploinsuficientes para o gene Klotho submetidos à cirurgia com apenas localização ceco
- d. **Grupo 4 (LPC- $Kl^{+/-}$):** Animais haploinsuficientes para o gene klotho submetidos à cirurgia com ligação e punção do ceco (LPC)

3.2 Modelo de indução da sepse: ligadura e punção do ceco

Nos Grupos Sham 1 e 3, sob anestesia com cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/kg), os animais foram submetidos à laparotomia abdominal com incisão longitudinal mediana de cerca de 1 cm e o ceco foi localizado e exposto. Nos animais em que a sepse foi induzida (Grupos 2 e 4), após localização, foi realizada ligadura do ceco com fio nylon 5.0 cerca de 15 mm da ponta do ceco, abaixo da válvula íleo-cecal. O ceco então foi puncionado duas vezes com agulha 21 e pressionado levemente para vazamento de pequena quantidade de fezes (coluna fecal de 1 mm) para dentro da cavidade abdominal. Todos os animais foram expandidos com 1 mL de soro fisiológico 0,9% aquecido intra-abdominal ao final da cirurgia. Em todos os grupos a cavidade abdominal foi fechada em 2 planos com fio 6.0. Os animais ainda receberam expansão com 1.5 mL de soro fisiológico 0,9% e antibioticoterapia com imipenem (25 mg/Kg) iniciada na sexta hora após cirurgia e subsequentemente mantida de 12 em 12 horas até a eutanásia.

Primeiro conjunto de experimentos

3.3 Curva de Sobrevida

Realizamos curva de sobrevida nos 4 grupos de animais com protocolo conforme ilustrado na Figura 13. Os animais foram avaliados 6 horas após o procedimento cirúrgico e a cada 12 horas até 360 horas. Ao término do tempo, todos os animais que continuavam vivos foram eutanaziados com dose

excessiva de anestésico; $n = 8$ animais nos grupos 1 e 3 (Sham) e $n = 15$ animais nos grupos 2 e 4 (LPC).

Figura 13 –Protocolo para avaliação de sobrevida nos animais

Segundo conjunto de experimentos

Após a cirurgia Sham ou LPC, outro conjunto com os 4 grupos foram colocados em gaiolas metabólicas (Figura 14). Após 24 horas, os animais foram eutanaziados por anestesia com cetamina e xilazina, seguida de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue coletado em seringas heparinizadas foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 1000g, dentro de até 30 minutos da coleta, para separação do plasma, sendo armazenado posteriormente a -70°C para realização das dosagens descritas a seguir. Os órgãos como rim, pulmão, baço, fígado e coração foram retirados e armazenados de acordo com as condições específicas para análises descritas posteriormente; $n = 8$ animais para cada grupo.

Figura 14 – Protocolo experimental para análise de plasma, urina e tecidos.

3.4 Gaiola metabólica

Ao final da cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast, VA, Itália) por 24 horas, sendo mantidas a oferta de água e comida nesse período. Antes e após o período de permanência na 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 -70°C para análises bioquímicas.

3.5 Análises bioquímicas

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

3.6 Extração, quantificação de proteínas e Western blotting

Dois terços do rim esquerdo foram colocados em criotubos e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados, a

seguir, em freezer a -70°C. Posteriormente, os rins armazenados a -70°C foram homogeneizados em solução de K-Hepes (200mM/l Manitol, 80mM/l Hepes, 41mM/l KOH; pH 7,5) contendo inibidor de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Todo o procedimento foi feito sob gelo. 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.

As amostras de proteínas renais foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. 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 1 ml de Tween20) por 1 hora e, posteriormente, incubadas com os anticorpos primários específicos por cerca de 12 horas a 4°C. Após, a incubação com anticorpo secundário (anti-rabbit 1:2000, anti-goat 1:10000, anti-mouse 1:2000, Sigma) se fez em temperatura ambiente, por 1 hora. A marcação foi feita através da peroxidase ligada ao anticorpo conjugado secundário, usando sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham). As bandas obtidas foram analisadas (Image J, NIH), com realização das densitometrias. As bandas foram normatizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- Klotho KO603 COSMO BIO CO., LTD, Tóquio, JP
- eNOS – SC- Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA
- GAPDH –SC- Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA

3.7 Análise histológica

O rim direito 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 e coradas com hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff para análise histomorfométrica.

As lâminas com coloração em ácido periódico de Schiff foram analisadas para realização de um escore de lesão tubular. O dano foi definido como edema de células tubulares epiteliais, perda da borda em escova, degeneração vacuolar, túbulos necróticos, formação de cilindros e ou descamação. O dano foi estimado utilizando 5 campos corticais escolhidos randomicamente no aumento 400x para cada animal utilizando o seguinte escore de lesão: Áreas normais – 0; Áreas com danos <25% - 1; Áreas com danos de 25-50% - 2; Áreas com danos de 50-75% - 3; Áreas com mais de 75% danos – 4⁷⁶.

3.8 Marcadores de estresse oxidativo

Dosagem de TBARS: O nível plasmático de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), um marcador de peroxidação lipídica, foram determinados utilizando o ensaio do ácido tiobarbitúrico. Às amostras de plasma foram adicionados 1mL de ácido tricloroacético (TCA) a 17,5% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2). Essa solução foi levada a banho-maria por 20 min a 100°. C. Após o resfriamento em gelo, a mistura foi incubada por 20 minutos com 1mL de TCA a 70% e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. A

densidade óptica do sobrenadante foi avaliada por meio da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 534 nm. A quantidade de TBARS foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os níveis plasmáticos foram expressos em nmol/ml.

Dosagem Glutationa: A glutathiona reduzida (GSH), o principal oxidante endógeno, foi determinada no sangue total pelo método descrito por Sedlak e Lindsay (1968)⁷⁷. O sangue total foi processado com a adição de ácido metafosfórico 5% e centrifugado a 14000g por minutos. O ensaio consiste na reação do sobrenadante do sangue total com o reagente de Ellman, formando um pigmento amarelo que é mensurado no espectrofotômetro em 412 nm. O nível de GSH foi quantificado pela média da curva padrão e expresso em $\mu\text{mol/ml}$.

3.9 Dosagens de citocinas no tecido renal e plasma

Foram estudadas utilizando o método de Multiplex as seguintes citocinas no tecido renal: IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6. E, também utilizando o método multiplex, foram estudadas a IL-1a, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e MCP-1 no plasma dos animais.

3.10 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

Marcação da sonda

Os oligonucleotídeos do NF- κB contendo a sequência 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C – 3' foram marcados com a adição de γ -32P ATP numa solução contendo Tampão T4 quinase (em mM: Tris-HCl 700, pH 7,6; MgCl_2 100 e DTT 50), T4 quinase e água ultra-pura; nas seguintes

concentrações: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T4 quinase, 1 μ L de γ -³²P ATP (3 Ci/mmol), 1 μ L de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação à 37^o C por 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Colunas (Microspin G-25) foram posicionadas em um tubo de microcentrífuga, centrifugando-se por 1 minuto a 3.000 rpm, e em seguida foram transferidas para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/ μ L.

Reação de Ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20 %), extrato nuclear (10 μ g de proteína) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final. O tubo foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μ L) e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μ L de azul de bromofenol ao controle (-). O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5 % (acrilamida/bisacrilamida [37,5:1]). Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida que consiste em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). A corrida durou 2 horas a 150-160 V. Ao final desta, o gel foi seco e ficou fixado em um papel filtro especial. Para revelar os resultados, um filme de raios-X foi exposto mediante ao papel filtro contendo a corrida, em cassete a -80^o C. Além do ensaio de EMSA, foi realizado também o ensaio de competição, adicionando-se quantidades de

oligonucleotídeos não-marcados 10 vezes em excesso e um oligonucleotídeo não-específico (TFIID) (Promega, Madison, WI, USA) não-marcado 20 vezes em excesso para o NF- κ B.

Os dados decorrentes do ensaio de EMSA foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

Terceiro conjunto de experimentos

3.11 Avaliação Hemodinâmica

Os 4 grupos de animais foram submetidos a canulação da artéria carótida e da veia jugular interna para a realização de medidas hemodinâmicas diretas. Após anestesia com isoflurano, 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 conforme demonstrado na Figura 15.

Figura 15 – Animais submetidos à canulação da carótida e da veia jugular

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 (FC) 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 pressão arterial (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. Vinte e quatro horas após essa primeira medida os animais foram submetidos à cirurgia Sham ou LPC e, após 24h dessa nova cirurgia, todo o protocolo descrito acima para medidas de pressão arterial, frequência cardíaca e estudo do barorreflexo foi repetido para avaliarmos a influência da sepse nesses parâmetros (Figura 16).

Figura 16 – Protocolo experimental para avaliação hemodinâmica e barorreflexa

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

Para complementar a avaliação hemodinâmica um estudo da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial (análise espectral) foi realizado. 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.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Graphprism 5.0, com cálculo de média e desvio-padrão para as diversas variáveis estudadas, e cálculo de diferença entre os 4 grupos por análise de variância (ANOVA) com *Newman-Keuls* como pós-teste. Comparações entre 2 grupos foram realizadas utilizando o *Student t-test*. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Para a avaliação da curva de sobrevida foi utilizado o *Log-rank (mantel-cox) test* e foi considerado significativo se $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Genotipagem

A genotipagem dos animais foi realizada no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por reação em cadeia de polimerase (PCR) através de fragmentos da cauda. Os alelos WT e mutantes foram detectados respectivamente em 458 bp e 920 bp (Figura 17).

Figura 17 - Genotipagem camundongos Klotho por reação em cadeia de polimerase (PCR).

4.2 Avaliação da sobrevida

Os animais deficientes em Klotho submetidos à sepse (LPC- $K^{+/-}$) apresentaram uma significativamente menor sobrevida quando comparados com animais selvagens (LPC-WT). A sobrevida em 14 dias foi de 80% no grupo LPC-WT enquanto no grupo LPC - $K^{+/-}$ foi de apenas 40% ($p=0.008$). A curva de sobrevida pode ser observada na Figura 19.

Os Grupos Sham apresentaram uma sobrevida de 100% e não estão representados na Figura 18.

Figura 18 – Curva de sobrevida dos animais submetidos à LPC

4.3 Peso, ingestão hídrica e alimentar

O peso antes da realização do procedimento foi similar em todos os grupos. A ingestão de água e alimentos foi menor nos animais submetidos à LPC. Interessantemente os animais do grupo LPC- $K^{+/-}$, apresentaram um ganho de peso enquanto todos os demais grupos evoluíram com uma queda expressiva. O ganho de peso no LPC- $K^{+/-}$ não pode ser justificado por uma diferença no aporte hídrico ou de alimento. Mas, uma justificativa poderia ser uma redução do débito urinário com consequente acúmulo de líquido. Todos os dados estão resumidos na Tabela 1 e na Figura 19.

Tabela 1 - Dados de idade, peso, ingestão hídrica e alimentar nos grupos experimentais.

	WT		$K^{+/-}$	
	Sham	LPC	Sham	LPC
Idade (semanas)	9,14±0,99	9,75±1,49	9,5±1,5	10,13±0,99
Peso pré (g)	23,7±2,1	23,1±2,4	24,2±3,6	24,1±2,8
Peso pós (g)	21,0±1,6	21,3±2,2	21,6±3,3	24,2±3,1
Δ de Peso (g)	-2,0±0,9	-1,4± 0,8	-2,2±1,3	0,1±0,8 ^{a,b,c}
Ingestão hídrica (g)	3,5±1,2	2,3±1,2	2,7±1,0	2,1±1,2
Ingestão Alimentar (g)	2,4±0,5	0,8±0,5 ^{a,c}	1,7±0,8 ^a	0,5±0,5 ^{a,c}

Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Diferenças significativas foram aceitas quando: ^a p<0,05 vs Sham-WT, ^b p<0,05 vs LPC-WT, ^c p<0,05 vs Sham- $K^{+/-}$. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

Figura 19 – Gráfico com (a) Ingestão comida (b) Ingestão água (c) Variação de peso (peso após 24h cirurgias – peso antes cirurgia). Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; n=8. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

4.4 Avaliação da lesão renal

Os animais dos grupos Sham apresentaram um volume urinário maior quando comparados com os grupos submetidos à LPC. O grupo LPC- $K^{fl/-}$ apresentou uma menor diurese quando comparado a todos os outros grupos (Tabela 2 e Figura 20). A uréia plasmática também foi significativamente maior nos grupos LPC, sendo ainda mais alta no LPC - $K^{fl/-}$.

Tabela 2 Dados referentes à função renal

	WT		$K^{fl/-}$	
	Sham	LPC	Sham	LPC
Diurese (ml/d)	2,7±0,5	1,1±0,6 ^{a,c}	2,6±0,3	0,4±0,3 ^{a,b,c}
Uréia (mg/dl)	40±8	57±4 ^{a,c}	39±8	77±14 ^{a,b,c}

Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Diferenças significativas foram aceitas quando: ^a p<0,05 vs Sham-WT, ^b p<0,05 vs LPC-WT, ^c p<0,05 vs Sham- $K^{fl/-}$. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC. Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

Figura 20 – Gráfico comparado a função renal entre os grupos (a) Diurese coletada por 24h após o término procedimento; (b) Uréia plasmática. Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

Acompanhando a menor diurese e a maior uréia plasmática, os animais LPC- $K^{+/-}$ apresentaram uma lesão tubular mais severa verificada por um escore de dano tubular na avaliação da histologia renal (Figura 21) quando comparado com todos os outros grupos.

Figura 21 – Dano Tubular na histologia renal (**a-d**) Fotomicrografias representativas de secções renais coradas com ácido-Schiff periódico (x200). (**a**) Sham-WT; (**b**) LPC-WT; (**c**) Sham- $K^{+/-}$; (**d**) LPC- $K^{+/-}$; (**e**) Escore de dano tubular descrito em métodos. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; n=8. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

4.5 Outras Disfunções orgânicas

Após 24h os animais do LPC- $K^{fl/-}$ apresentaram um maior nível de lactato arterial evidenciando uma pior perfusão tecidual e também maiores níveis de alanina-amino transferases (ALT) evidenciando um maior dano hepático. Os valores estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da perfusão com lactatemia e função hepática com ALT

	WT		$K^{fl/-}$	
	Sham	LPC	Sham	LPC
Lactato (mg/dl)	20±15	31±12 ^{a,c}	19±12	60±23 ^{a,b,c}
ALT (IU/L)	37±1	39±12	40±19	92±39 ^{a,b,c}

Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Diferenças significativas foram aceitas quando: ^a p<0,05 vs Sham-WT, ^b p<0,05 vs LPC-WT, ^c p<0,05 vs Sham- $K^{fl/-}$. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.; ALT, alanina aminotransferase.

4.6 Estresse Oxidativo

Os animais sépticos apresentaram níveis significativamente maiores de TBARS que os animais Sham. O grupo LPC- $K^{fl/-}$ apresentou níveis ainda maiores que o grupo LPC-WT. Os níveis da glutatona, um conhecido anti-oxidante, estavam reduzidos nos animais do grupo LPC- $K^{fl/-}$. Os valores estão resumidos na Tabela 4 e representados na Figura 22.

Tabela 4 – Avaliação do estresse oxidativo através das dosagens de TBARS e GSH plasmáticos.

	WT		$K^{fl/-}$	
	Sham	LPC	Sham	LPC
TBARS (nmol/ml)	3,6±1,7	24,6±6,8 ^{a,c}	5,6±0,9	49,8±12,3 ^{a,b,c}
GSH (μmol/ml)	1,9±0,6	1,72±0,3	2,4±0,3	1,34±0,1 ^{b,c}

Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Diferenças significativas foram aceitas quando: ^a p<0,05 vs Sham-WT, ^b p<0,05 vs LPC-WT, ^c p<0,05 vs Sham- $K^{fl/-}$. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH, glutatona.

Figura 22 - Avaliação estresse oxidativo através das dosagens de (a) TBARS e (b) GSH. Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH, glutatona.

4.7 Resposta inflamatória

Os animais sépticos (grupos LPC) apresentaram uma resposta inflamatória intensa evidenciado pelo aumento de citocinas inflamatórias no plasma. Vale ressaltar que os animais sépticos deficientes em Klotho (LPC-*K^{fl/-}*) apresentaram níveis mais elevados de importantes citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 quando comparados aos outros grupos, incluindo os camundongos WT sépticos. Os valores de todas as citocinas plasmáticas dosadas estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise das citocinas plasmáticas

	WT		<i>K^{fl/-}</i>	
	Sham	LPC	Sham	LPC
GM-CSF	0,015 $\pm$ 0,013	41,9 $\pm$ 56,2 ^{a,c}	0,015 $\pm$ 0,013	53,3 $\pm$ 18,1 ^c
INFγ	*	0,015 $\pm$ 0,01	*	7,8 $\pm$ 4,4 ^{a,b,c}
IL-1β	*	*	*	8,3 $\pm$ 3,6 ^{a,b,c}
IL-2	*	*	*	4,3 $\pm$ 2,5 ^{a,b,c}
IL-4	0,53 $\pm$ 0,12	1,3 $\pm$ 1,5	0,61 $\pm$ 0,3	1,84 $\pm$ 0,76
IL-6	28 $\pm$ 5,9	138 $\pm$ 103 ^{a,c}	20,3 $\pm$ 8,4	18241 $\pm$ 18586 ^{a,b,c}
IL-7	*	1,7 $\pm$ 3,4	*	10,8 $\pm$ 15
IL-10	1,35 $\pm$ 2,57	170 $\pm$ 276 ^{a,c}	2,5 $\pm$ 4	2495 $\pm$ 2411 ^{a,b,c}
IL-12	3,8 $\pm$ 6,2	38,8 $\pm$ 77,6 ^{a,c}	7,24 $\pm$ 14,48	97,2 $\pm$ 19,4 ^{a,b,c}
IL-13	10,6 $\pm$ 3,5	9,7 $\pm$ 3,2	10,3 $\pm$ 10,6	75 $\pm$ 25,5 ^{a,b,c}
MCP 1	47 $\pm$ 22	268 $\pm$ 239 ^{a,c}	52 $\pm$ 16	1677 $\pm$ 879 ^{a,b,c}
TNF-α	3 $\pm$ 0,5	11,4 $\pm$ 8,4 ^{a,c}	3,6 $\pm$ 1,8	83 $\pm$ 13,5 ^{a,b,c}

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; n=4. Diferenças significativas foram aceitas quando: ^a p<0,05 vs Sham-WT, ^b p<0,05 vs LPC-WT, ^c p<0,05 vs Sham-*K^{fl/-}*. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC. Ligadura e punção cecal; WT, wild type.; IL, interleucina; TNF- α , fator de necrose tumoral alpha; IFN- γ , interferon gamma; MCP1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*; GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*.

Ao avaliarmos as citocinas expressas no tecido renal, assim como detectado no plasma, ocorreu uma significativa elevação de citocinas pró-inflamatórias no tecido renal do grupo LPC- $K^{+/-}$ em relação a todos os outros grupos (Figura 23).

Figura 23 – Análise das citocinas no tecido renal. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; n=6. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.; IL, interleucina; TNF- α , fator de necrose tumoral alpha; MCP1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*;

Além dessas citocinas, houve um aumento da ativação do NF- κ B no tecido renal como demonstrado pelo EMSA. A ativação desse fator de

transcrição aumenta durante a sepse mas esse aumento foi mais pronunciado nos camundongos $Kl^{+/-}$ sépticos (Figura 24).

Figura 24 – Efeitos da deficiência de Klotho na ativação do NF-κB no tecido renal (**a**) Painel representativo dos extratos nucleares do rim (**b**) Gráfico representativo da quantificação. Resultados apresentados como média ± desvio padrão; n=6. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*; NS, *non specific*; NF-κB, *nuclear factor κB*.

4.8 Expressão renal do Klotho

Pela análise por *western-blotting* da proteína do Klotho no tecido renal observamos uma redução da expressão de Klotho na sepse. Os animais WT LPC apresentavam uma significativa redução da proteína quando comparados com os WT Sham. Nos animais sépticos haploinsuficientes ($Kl^{+/-}$) essa redução foi ainda mais expressiva como demonstrada na Figura 25.

Figura 25 - Expressão renal do Klotho (a) Gráfico representativo dos blots de proteínas renais (b) Quantificação por densitometria. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; $n=6$. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

4.9 Parâmetros Hemodinâmicos

As medidas hemodinâmicas foram realizadas 24h antes e 24h após a realização das cirurgias Sham ou LPC. Não houve diferença significativa entre as medidas de PAM, PAS, PAD e FC realizadas nos animais $KI^{+/-}$ e WT antes das cirurgias (Tabela 6 e Figura 26).

Tabela 6 Medidas hemodinâmicas dos animais $KI^{+/-}$ e WT antes da realização das cirurgias LPC ou Sham

	WT (n=17)	$KI^{+/-}$ (n=19)
PAM	135,3±10,44	136,6±7,98
PAS	154,6±13,91	156,7±9,84
PAD	116,6±8,57	116,7±7,07
FC	540±130	556±77

Resultados apresentados como média ± desvio padrão; Diferenças significativas não foram encontradas. Análise *t test*. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; PAM, pressão arterial média; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; FC, frequência cardíaca.

Figura 26 - Medidas da PAM e FC dos grupos antes da realização da cirurgia. **(a)** Medida da FC antes dos experimentos nos animais $KI^{+/-}$ e WT **(b)** Medida da PAM antes dos experimentos nos animais $KI^{+/-}$ e WT. Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Não foram encontradas diferenças significativas. Análise *t test*. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

Após a realização da cirurgia houve redução da PAM nos grupos LPC conforme esperado em comparação aos valores pré-cirúrgicos de seus grupos correspondentes (Figura 27). Nos animais WT apesar de observarmos uma queda da PA, essa diferença só foi significativamente estatística na PAS (WT Sham $154,6 \pm 13,9$ vs WT LPC $131,0 \pm 26,0$ $p=0,02$). Observamos uma tendência de queda da PAM após LPC ($p=0,052$).

Figura 27- Medidas da PAM e FC antes e após LPC nos grupos $KI^{+/-}$ e WT. (a) FC nos animais WT antes e após LPC (b) PAM nos animais WT antes e após LPC (c) FC nos animais $KI^{+/-}$ antes e após LPC (d) PAM nos animais $KI^{+/-}$. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; Análise *t test*. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; FC, frequência cardíaca; PAM, pressão arterial média.

Quando comparados os quatro grupos estudados, os animais submetidos à LPC não apresentaram uma redução da PAM significativa comparados aos grupos Sham. As medidas de PAM e FC não diferiram entre os grupos LPC-*K^{fl/-}* e LPC-WT 24h após indução da sepse (Figura 28).

Figura 28 - Medidas da PAM e FC entre os 4 grupos estudados. (a) Medida da FC após experimentos nos 4 grupos (b) Medida da PAM após experimentos nos 4 grupos. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

Com o objetivo de analisar a resposta barorreflexa, os animais receberam 100 ng de fenilefrina para avaliar a bradicardia reflexa e 100 ng de nitropussiato de sódio para avaliar a taquicardia reflexa. Primeiramente, pré-procedimentos Sham ou LPC, as avaliações dos índices de bradicardia reflexa ($1,59 \pm 1,17$ vs $1,79 \pm 0,94$) e taquicardia reflexa ($2,19 \pm 0,04$ vs $2,73 \pm 0,71$), não diferiam entres os animais $K^{+/-}$ e WT respectivamente (Figura 29a).

Vinte e quatro horas após a realização das cirurgias, avaliamos o comportamento dessas respostas reflexas. A fenilefrina é um potente vasoconstritor. Ao infundirmos 100 ng dessa droga esperamos um aumento da PAM e por consequência uma automática redução na FC. Porém, nosso primeiro resultado interessante é que animais do grupo LPC- $K^{+/-}$ não foram capazes de aumentar significativamente a PAM com essa dose da medicação, apontando uma certa resistência a droga vasopressora (Figura 29c). A avaliação de seu índice de bradicardia reflexa fica então fortemente prejudicado, tendo em vista que a variação da FC depende da variação da PAM e essa não foi encontrada. Quanto ao índice de bradicardia, os animais LPC-WT apresentaram uma pior bradicardia reflexa, ou seja, um comprometimento da atividade barorreflexa quando comparados com os Sham-WT. Outro resultado surpreendente foi um prejuízo também encontrado nos Sham- $K^{+/-}$, esses animais que apenas foram submetidos a uma laparotomia sem ligação ou perfuração do ceco já apresentavam um prejuízo na sua resposta barorreflexa. Todos esses dados estão sumarizados na Figura 29b.

Figura 29 – Avaliação barorreflexa pelo índice de bradicardia reflexa (a) Representação do índice bradicardia reflexa antes das cirurgias (b) Representação do índice de bradicardia reflexa pós-cirurgias (c) Variação da PAM pós 100ng de fenilefrina. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise *t* test (a) e Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls (b,c). Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

A avaliação da taquicardia reflexa com 100 ng de nitroprussiato de sódio também mostrou dados interessantes. Os animais LPC-*K^{+/+}* apresentaram um prejuízo importante da taquicardia reflexa. Sendo assim o grupo LPC-*K^{+/+}* não respondeu a droga vasopressora e não conseguiu aumentar sua FC em resposta a uma queda da PAM, certamente duas grandes dificuldades no enfrentamento de uma situação como o choque séptico. Os animais LPC-WT também apresentavam um prejuízo na resposta barorreflexa evidenciado por uma piora no índice de bradicardia reflexa, mas mantiveram a elevação da pressão arterial com a administração da fenilefrina e a capacidade de aumentar a frequência cardíaca frente a hipotensão. Esses animais apresentaram uma maior capacidade em oscilar a frequência cardíaca, todos esses dados estão apresentados na Figura 30.

Figura 30 - Avaliação barorreflexa pelo índice de taquicardia reflexa (a) Representação do índice taquicardia reflexa antes das cirurgias (b) Representação do índice de taquicardia reflexa pós-cirurgias (c) Variabilidade da FC. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise *t test* (a) e Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls (b,c). Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; FC, frequência cardíaca.

Para auxiliar na compreensão de como o sistema nervoso autônomo é alterado na sepse e na sepse com deficiência de Klotho, um estudo mais detalhado de variabilidade da FC e da PA (análise espectral) foi realizado.

Na análise espectral, calculamos o intervalo médio entre os batimentos normais (intervalo de pulso) e a variação no intervalo de tempo entre um batimento cardíaco e o próximo é a variabilidade da FC (VFC). Antes das cirurgias, o intervalo de pulso (IP) foi semelhante nos camundongos $K^{+/-}$ e WT ($112,8 \pm 17,10$ e $116,5 \pm 16,96$ ms, respectivamente, $P = NS$), assim como VFC ($93,6 \pm 83,3$ e $74,1 \pm 50,3$ ms², respectivamente $P = NS$). Vinte e quatro horas após a indução da sepse os animais $K^{+/-}$ apresentavam uma menor VFC, enquanto os animais WT mantiveram VFC. A VFC é um mecanismo rápido e eficaz que previne oscilações na pressão arterial, logo um prejuízo na capacidade da VFC pode acarretar em uma maior dificuldade em manter uma pressão arterial estável. Esses dados estão apresentados na Figura 31.

Simplificadamente, o modelo espectral decompõe a FC em 3 ondas sendo que a de baixa frequência representa a modulação simpática (LF) enquanto que a de alta frequência representa a modulação parassimpática (HF). A raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos RR normais adjacentes (RMSSD) possui uma correlação com a atividade vagal.

As análises dos animais antes de serem submetidos aos experimentos curiosamente demonstravam que os animais $K^{+/-}$ apresentavam uma maior atividade simpática, em relação aos animais WT, evidenciada por uma maior razão LF/HF (Figura 32).

Figura 31 – Intervalo de pulso e variabilidade da frequência cardíaca dos animais antes experimentos e após LPC. **(a)** Intervalo de pulso nos animais WT antes e após LPC **(b)** Variabilidade da frequência cardíaca nos animais WT antes e após LPC **(c)** Intervalo de pulso nos animais *KI^{+/-}* antes e após LPC **(d)** Variabilidade da frequência cardíaca nos animais *KI^{+/-}* antes e após LPC. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise *t test*. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; FC, frequência cardíaca.

Figura 32 – Análise Espectral antes da realização dos experimentos mostrando uma maior atividade simpática nos animais $K^{+/-}$. (a) Baixa frequência com unidade normalizada (representando a atividade simpática); (b) Alta frequência com unidade normalizada (representando atividade parassimpática); (c) LF/HF representando a relação simpático/parassimpático; (d) RMMSD representando atividade vagal. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise t test. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; FC, frequência cardíaca; RMMSD raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos R-R adjacentes; LF, *low frequency*; HF, *high frequency*.

Após os experimentos, a análise espectral da frequência cardíaca demonstrou que os animais LPC- $K^{+/-}$ apresentavam um prejuízo na ativação simpática quando comparados aos LPC-WT. Todos os dados da análise espectral tanto da FC quanto da PA estão na Tabela 7 e Figuras 33 e 34.

Tabela 7 – Medidas hemodinâmicas e análise espectral da variabilidade da FC e da PA 24h após a realização LPC ou Sham.

	WT		<i>K^{fl/-}</i>	
	Sham (n=7)	LPC (n=9)	Sham (n=7)	LPC (n=8)
PAS (mm/Hg)	147,8 ± 21,3	131±26	156,6 ± 12,5	142,4±14,7
FC (bpm)	595±96	461±86	521±128	551±62
VPAS (mm/Hg²)	70,2 ±41,8	24,0±13,2 ^a	64,0 ±33,9	34,1±12,7 ^c
IP (ms)	106,2±22,6	139,6±38,3	125,5±28,2	126,6±33,2
VFC (ms²)	31,0±11,6	76,8±39,0 ^a	67,9±46,0 ^a	24,4±10,2 ^{b,c}
RMSSD (ms)	4,57 ± 1,5	6,56±2,8	4,62 ± 2,1	5,6±1,6
Análise espectral da variabilidade da FC				
LF (ms²)	2,5±1,9	9,0±10,3	5,2±5,2	1,35±0,8
LF un	26,4±10,6	29,6±17,8	32,1±9,1	13,9±6,6 ^{a,b,c}
HF (ms²)	6,4±3,6	13,6±8,8	7,0±5,6	7,6±3,9
HF un	73,6±10,6	70,4±17,8	67,9±9,1	86,1±6,6 ^{a,b,c}
LF/HF	0,43±0,3	0,57±0,5	0,69±0,3	0,26±0,3 ^c
Análise espectral da variabilidade da PA				
LF (mm/Hg²)	16,4±14,2	4,1±3,4 ^a	10,0±3,9	6,1±4,9
HF (mm/Hg²)	2,6±1,6	1,6±0,6	1,9±0,7	1,95±1,8
Índice <i>Alpha</i> (ms/mm/Hg)	0,57±0,5	1,52±0,9 ^{a,c,d}	0,66±0,4	0,6±0,4

Resultados 24h após cirurgias, dados representados como média ± desvio padrão. Diferenças significativas foram aceitas quando: ^a p<0,05 vs Sham-WT, ^b p<0,05 vs LPC-WT, ^c p<0,05 vs Sham-*K^{fl/-}* ^d p<0,05 vs LPC-*K^{fl/-}* pela análise de variância com pós-teste de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; PAS, pressão arterial sistólica (mmHg); VPAS, variabilidade da pressão arterial sistólica (mmHg²); IP, interval de pulso (ms); VFC, variabilidade da FC (ms²); RMSSD, Raiz quadrada da média das diferenças dos intervalos R-R sucessivos (ms); LF, banda de baixa frequência da VFC valor absoluto (ms²); LF(un) banda de baixa frequência da VFC unidade normalizada; HF, banda de alta frequência da VFC valor absoluto (ms²); HF, (un) banda de alta frequência da VFC unidade normalizada; LF/HF, balanço autonômico; LF (mmHg²) banda de baixa frequência da VPAS valor absoluto; HF(mmHg²) banda de alta frequência da VPAS valor absoluto; Índice alpha, sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg).

Quando avaliamos a ativação simpática e parassimpática (LF un e HF un) e a razão entre essas atividades (LF/HF) notamos que os animais LPC- $K^{+/-}$ se apresentaram com uma menor atividade simpática e uma manutenção da atividade parassimpática, o que terminou por reduzir a razão LF/HF como apresentado na Figura 33. Ao compararmos a LF/HF nos animais $K^{+/-}$ antes da realização das cirurgias e após a LCP fica evidenciado que a punção e ligadura do ceco foi capaz de causar um prejuízo na resposta simpática dos animais deficientes em Klotho.

Quando saímos da análise da FC e passamos a análise da PA alguns dados foram relevantes. A variabilidade da PA foi menor no grupo LPC-WT, provavelmente secundária a uma maior variabilidade da frequência cardíaca.

O sistema nervoso simpático periférico pode ser avaliado pela análise espectral da onda de baixa frequência da pressão arterial. Os animais LPC-WT apresentavam uma menor ativação simpática quando comparados com os animais Sham-WT ou quando comparados com as medidas nos animais WT antes da realização das cirurgias (Figura 34). Os Animais LPC- $K^{+/-}$ também apresentaram um prejuízo na atividade simpática periférica quando comparados com valores antes da realização da cirurgia LPC. Não houve diferença significativa entre os grupos LPC.

O índice alpha é uma medida da sensibilidade barorreflexa espontânea e os animais LPC-WT apresentavam um aumento do índice alpha demonstrando uma melhor sensibilidade barorreflexa quando comparados com os animais LPC- $K^{+/-}$, seu grupo Sham e ainda com as medidas nos animais WT antes da realização da cirurgia.

Figura 33 Avaliação da relação LF/HF (simpática/parassimpática) entre os grupos. (a) Relação LF/HF entre os grupos avaliados após as cirurgias Sham ou LPC; (b) Comparação da relação LF/HF nos animais $KI^{+/-}$ antes cirurgia e após LPC; (c) Comparação da relação LF/HF nos animais WT antes cirurgia e após LPC; Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls (a) e Análise *t* test (b,c). Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; LF, low frequency; HF, high frequency.

Figura 34 Análise Espectral da variabilidade da PA, avaliação do índice alpha e da atividade simpática periférica. (a) Índice alpha após as cirurgias nos 4 grupos estudados; (b) Índice alpha nos animais $KI^{+/-}$ antes e após LPC; (c) Índice alpha nos animais WT antes e após LPC (d) Avaliação da banda de baixa frequência da PA após as cirurgias nos 4 grupos estudados; (e) Avaliação da banda de baixa frequência da PA nos animais $KI^{+/-}$ antes e após LPC; (f) Avaliação da banda de baixa frequência da PA nos animais WT antes e após LPC. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls (a, d) e Análise *t test* (b,c,e,f). Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type; LF, low frequency.

4.10 Expressão eNOS Renal

Pela análise por *western-blotting* da proteína eNOS no tecido renal observamos uma redução da expressão de eNOS na sepse. Os animais LPC-WT apresentavam uma significativa redução da proteína quando comparados com os Sham-WT. Nos animais $KI^{-/-}$, tanto os Sham quanto os LPC apresentaram uma redução na expressão de eNOS e não observamos diferenças significativas entre os dois grupos. Os dados estão apresentados na Figura 35.

Figura 35 - Expressão renal do eNOS (a) Painele representa blots proteínas renais (b) Avaliação por densitometria. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão; n=6. Análise de variância com teste pós de Newman-Keuls. Abreviações: LPC, Ligadura e punção cecal; WT, wild type.

5 DISCUSSÃO

O objetivo primário desse estudo foi avaliar se a deficiência de Klotho pode agravar a sepse e suas disfunções orgânicas, em especial LRA, utilizando o modelo LPC em camundongos $Kl^{+/-}$. Nossos achados principais demonstraram uma redução da sobrevida, uma piora da função renal, hepática e microcirculatória além de um prejuízo importante do funcionamento barorreflexo nos camundongos $Kl^{+/-}$ submetidos à sepse. O aumento das citocinas inflamatórias associado com uma maior ativação do NF- κ B e um maximização do estresse oxidativo foram os mecanismos fisiopatológicos encontrados e possivelmente implicados nessa maior gravidade da sepse nos animais $Kl^{+/-}$.

Para estudar o papel do Klotho na sepse, escolhemos realizar a punção e ligadura do ceco com base no conhecimento de que este modelo experimental imita as características clínicas da perfuração intestinal e da infecção bacteriana mista de origem intestinal em humanos, sendo um modelo realista de sepsis polimicrobiana⁷⁸. Com base em um estudo anterior de Holly e cols⁷⁹, realizar um tratamento com reanimação com fluido e antibióticos de amplo espectro nos animais torna esse modelo clinicamente mais relevante. Em geral, a sepse em seres humanos possui um tempo entre a sua instalação e início do tratamento, com expansão volêmica e antibióticos. Nesse modelo iniciamos o tratamento nos animais após 6h da indução da sepse tentando ao máximo aproximar nossos experimentos ao que usualmente ocorre na prática clínica.

Também optamos por induzir a sepse em animais com níveis distintos de expressão de Klotho ($Kl^{+/-}$ ou WT), mas sem utilizar os camundongos knockout homozigóticos (kl/kl) já que esses animais são muito frágeis e

pequenos, causando uma mortalidade cirúrgica altíssima. Outro dado a ser destacado é que o fenótipo *kl/kl* não tem uma correspondência clara nos seres humanos, enquanto que uma expressão diminuída de Klotho (como a encontrada nos animais *K^{+/+}*) se aproxima mais de alterações encontradas, por exemplo, em pacientes idosos e com doença renal crônica⁵².

Neste estudo, a expressão de Klotho renal foi significativamente menor nos grupos LPC. Anteriormente, a redução da expressão renal de Klotho em ratos submetidos à cirurgia de LPC já havia sido demonstrada⁸⁰. Não está claro se a redução do Klotho renal foi devida a LRA induzida pela sepse ou à própria sepse, mas uma deficiência transitória de Klotho também já foi identificada em vários modelos de LRA, incluindo lesão por isquemia-reperfusão (IRI)⁸¹, obstrução ureteral, hipovolemia e nefrotoxicidade por cisplatina^{53,66-68}. Além disso, embora a LRA séptica seja profundamente diferente das outras LRA⁸², a redução da expressão de Klotho parece ser um fenômeno que se repete. O mecanismo de como a expressão do Klotho é reduzida na sepse, bem como em outras LRA, permanece desconhecido. Em 2011, Moreno e cols⁸³ demonstraram que as citocinas inflamatórias como o TNF- α , reduzem a expressão de Klotho através de um mecanismo dependente do NF-kB. Na sepse, temos aumento de citocinas inflamatórias e da ativação do NF-kB, e esse mecanismo poderia estar envolvido na redução da expressão de Klotho encontrada na sepse.

A sepse é uma condição médica grave causada por uma infecção e caracterizada por inflamação sistêmica excessiva, hipotensão e disfunção endotelial. Esta condição muitas vezes leva à disfunção de múltiplos órgãos (DMOS), que inclui a LRA, e a morte. A LRA é uma complicação comum e

temida da sepse, aumentando em 3,2 vezes a mortalidade dos pacientes⁸⁴. O entendimento da patogênese da LRA séptica ainda é limitado. O antigo paradigma da LRA séptica era simplista e atribuía as alterações da função renal apenas a fatores macrohemodinâmicos e a isquemia. No entanto, tem surgido um número crescente de evidências demonstrando que a LRA séptica pode ocorrer na ausência de sinais evidentes de hipoperfusão, tanto globais ou quanto regionais⁴⁰. Ambos os grupos LPC apresentaram pressão arterial semelhante em nosso estudo hemodinâmico. Provavelmente, o caminho Klotho-dependente que agrava a DMOS e LRA é independente da macrohemodinâmica. Em relação às alterações morfológicas, em contraste com outras IRA, a necrose tubular aguda é infreqüente na IRA séptica⁸⁵. Em nosso estudo, o grupo LPC-*K^{+/-}* apresentou um maior escore de dano tubular quando comparados com grupo LPC-WT, porém os achados mais comuns foram apenas edema epitelial, perda da borda de escova, degeneração vacuolar, sendo o achado de necrose tubular infreqüente em todos os grupos. Hu e cols também mostraram que as alterações induzidas pelo LRA isquêmica na função e na histologia dos animais *K^{+/-}* foram mais graves do que em animais WT, enquanto que alterações eram mais leves em camundongos transgênicos que superexpressavam essa proteína, sugerindo que o Klotho tem um papel renoprotetor⁸¹.

Em nosso modelo experimental, a deficiência de Klotho foi associada à um aumento da atividade inflamatória na sepse, pois os animais LPC-*K^{+/-}* apresentaram um aumento mais expressivo de citocinas inflamatórias (como TNF- α , Il-1b, Il-6, MCP-1) no tecido renal e no plasma, e uma maior ativação de NF-kB. Geralmente, na LRA séptica, os fatores imunológicos e inflamatórios

parecem ter um papel dominante na fisiopatologia. Uma revisão recente⁴⁰ da literatura propõe uma teoria unificadora para a fisiopatologia da LRA séptica e descreve que o mecanismo de lesão principal seria uma resposta adaptativa das células tubulares renais a um sinal inflamatório prejudicial. Os mediadores inflamatórios derivados da ativação de células imunes ou diretamente de patógenos, os chamados PRRs ou PAMPs seriam reconhecidos pelo sistema imune para combater a infecção mas simultaneamente causariam lesões no hospedeiro. As células tubulares podem reconhecer esses PRRs e PAMPs, por vários receptores, incluindo o TLR4, o que conduz a um aumento da expressão de NF- κ B e TNF- α induzido por uma molécula mensageira, o My88. Tal ativação pode causar lesão de células tubulares. Também já foi demonstrado que o TNF- α é capaz de induzir uma lesão renal direta e é um preditor independente de LRA séptica, o que suporta a sua relevância na patogênese⁴⁰. Anteriormente, já foi observado que o Klotho modula a inflamação endotelial através da supressão da expressão de moléculas de adesão induzidas pelo TNF- α e da atenuação da ativação do NF- κ B também induzido pelo TNF- α ⁷⁴. Com isso, a expressão do klotho poderia ser um mecanismo modulador da inflamação e da função endotelial na sepse. Um aumento do estresse oxidativo é uma característica marcante na sepse. Em 2014, Colleta e cols sugeriram que a disfunção endotelial pode ser um fator independente, bem como preditor precoce da DMOS e mortalidade na sepse. Concluíram ainda que o envelhecimento pré-existente ou a deficiência de eNOS podem agravar a evolução da sepse, induzida pelo modelo LPC, através do desenvolvimento de uma disfunção endotelial decorrente do aumento do estresse oxidativo⁸⁶. É de amplo conhecimento que a superexpressão de Klotho induz uma resistência ao

estresse oxidativo e a sua deficiência causa redução da síntese de NO nas células endoteliais vasculares⁶¹. Neste estudo, demonstramos que os camundongos *K^{+/−}* apresentavam uma menor expressão de eNOS independente da sepse e que o grupo LPC-*K^{+/−}* caracterizou-se por um aumento do estresse oxidativo evidenciado por níveis mais elevados de TBARS e uma redução de GSH. Quando tomados os achados em conjunto, sugerimos uma hipótese onde a redução de Klotho seria uma chave que ligaria envelhecimento, estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial na sepse.

O sistema barorreflexo arterial é um dos mecanismos mais poderosos e rápidos para controlar a pressão arterial e a atividade autonômica. Quando alterado, provoca aumento da variabilidade da PAS e diminui a VFC⁸⁷. A sepse grave é caracterizada por uma falha autonômica que pode preceder o choque e ou a DMOS⁸⁹. Estudos clínicos e experimentais mostraram que a redução da VFC e do seu componente simpático durante a sepse estão associadas a um aumento do risco de morte. O Klotho tem sido associado ao controle da FC e da PA^{89,90}. Na análise do sistema nervoso autônomo, o primeiro resultado encontrado em nosso trabalho, ainda não publicado na literatura, foi uma elevação da modulação simpática nos animais *K^{+/−}* nas medidas pré-operatórias. Após LPC, o grupo *K^{+/−}* mostrou uma diminuição da VFC e do seu componente simpático em relação ao grupo LPC-WT. Ambos os grupos LPC apresentaram uma diminuição da atividade simpática periférica (análise espectral com redução do componente LF da variabilidade da PAS), mas os animais LPC-WT apresentaram um ganho da atividade barorreflexo (evidenciada pelo aumento do índice alfa) e foram capazes de preservar a VFC. Os camundongos LPC-*K^{+/−}* apresentaram ainda uma pior resposta taqui-reflexa

com a infusão do nitroprussiato de sódio e foram resistentes ao efeito vasopressor da fenilefrina. Em resumo, a resposta autonômica dos animais deficientes em Klotho na sepse encontrava-se gravemente prejudicada e nós acreditamos que isso pode ser decorrente da *downregulation* dos receptores adrenérgicos α_1 e β . Em primeiro lugar, o choque séptico é mais freqüentemente associado com a *downregulation* da expressão vascular do receptor α_1 -adrenérgico^{90,91} e isso é provavelmente uma consequência da liberação maciça de citocinas pró-inflamatórias induzida pela ativação do NF- κ B⁹². Os animais LPC- $K^{+/-}$ apresentaram uma maior ativação de NF- κ B e um aumento bem mais acentuado das citocinas inflamatórias, talvez isso tenha levado a uma redução mais intensa da expressão dos receptores α_1 -adrenérgicos, dificultando o aumento pressórico esperado com a infusão do vasopressor. Em segundo lugar, já foi demonstrado que um aumento na ativação simpática basal leva a uma *downregulation* dos receptores β -adrenérgicos em algumas situações como na insuficiência cardíaca⁹³. É importante notar que os camundongos $K^{+/-}$ apresentavam uma maior atividade simpática basal, o que poderia justificar uma menor expressão de receptores β -adrenérgicos acarretando uma pior resposta taqui-reflexa após a indução da sepse. Neste estudo, não foi possível estabelecer por quais vias a deficiência de Klotho alterou o controle autonômico na sepse, mas certamente este assunto precisa ser melhor explorado por sua importante relevância.

Finalmente, este é o primeiro estudo a demonstrar uma pior sobrevida dos camundongos LPC- $K^{+/-}$. Em 2013, Inoue e cols estabeleceram que camundongos Klotho *knockout* (kl/kl) tinham uma sobrevida significativamente menor quando comparados com o grupo LPC-WT⁷⁵. No entanto, é importante notar que os animais kl/kl já têm uma sobrevida mais curta e são fenotipicamente distintos dos WT⁵².

Contudo, os nossos dados confirmam uma pior sobrevida em animais fenotipicamente iguais aos WT, com expectativa de vida semelhante e distintos apenas na quantidade de expressão da proteína Klotho. Ao mesmo tempo, nosso estudo também mostrou que a deficiência de Klotho teve um impacto deletério em vários parâmetros biológicos que estão classicamente correlacionados com a mortalidade na sepse como oligúria e sobrecarga volêmica, lactato arterial, resposta inflamatória e regulação autonômica⁹³⁻⁹⁶. Esses dados, tomados em conjunto, sugerem que a deficiência de Klotho pode ser um fator de risco independente, bem como preditor precoce da DMOS e mortalidade na sepse.

Como já amplamente discutido, a LRA séptica ainda possui uma taxa de mortalidade inaceitavelmente elevada⁴⁴, logo uma intervenção terapêutica eficaz é urgentemente necessária. A proteína Klotho é uma transmembrana (TM) e se expressa principalmente nas células tubulares distais do rim. A α Klotho solúvel é uma proteína circulante resultante da clivagem do domínio extracelular da TM-Klotho operado por metaloproteinases⁹⁷. A α Klotho solúvel exerce múltiplas ações, incluindo ações antioxidantes, antisenescência, pró-autofagia, anti-apoptose, antifibrose, pró-células-tronco e ações anti-insulina. A administração da α Klotho recombinante tem sido utilizada experimentalmente no tratamento LRA isquêmica e na doença renal crônica com resultados promissores^{81,98}. A utilização da α Klotho recombinante no tratamento da sepse e da lesão renal aguda séptica pode constituir uma nova perspectiva terapêutica a ser tentada na prática clínica.

Para finalizar, na Figura 36 apresentamos um resumo dos achados da fisiopatologia da sepse onde pode haver uma participação do Klotho.

Figura 36 – Potenciais mecanismos da participação do Klotho na fisiopatologia da sepse. (a) Resposta inflamatória e aumento estresse oxidativo durante a sepse. (b) Aumento da resposta inflamatória e do aumento estresse oxidativo durante a sepse associado a uma maior ativação do NF- κ B em situações com reduzida expressão de Klotho como nos animais $K^{H/-}$ ou em situações clínicas como a senescência e a doença renal crônica. (c) Perspectiva de tratamento com α Klotho na sepse – proposta de mecanismo de ação.

6 CONCLUSÕES

1. A deficiência de Klotho altera a sobrevivência de animais sépticos.
2. A deficiência de Klotho acentua as disfunções orgânicas relacionadas à sepse em especial a lesão renal aguda
3. A sepse com deficiência de Klotho aumenta o estresse oxidativo
4. A sepse com deficiência de Klotho se apresenta com maior atividade inflamatória e ativação NF- κ B
5. A sepse é um estado que reduz a expressão de Klotho
6. A deficiência de Klotho desregula o sistema autonômico central contribuindo para a falência circulatória e lesão renal aguda na sepse.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2013;369:840-51.
2. Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83:471-482.
3. Thomas, L. Germs. *New England journal medicine*. 1972;287:553-555.
4. Bone RC. Sepsis, the septic syndrome and multi-organ failure: early diagnosis. *The southern african journal of critical care*. 1990;6:9-12.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. 1992;101:1644–1655.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31:1250–1256.
7. Dellinger P, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41:580-637
8. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016; 315:801-10.
9. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40:754-761.

10. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*. 2007;35:1244-1250.
11. Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Qu W, Georgescu C, Nazzal M². Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *J Crit Care*. 2016;31:58-62.
12. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES Study). *Crit Care*. 2004;8:251-260.
13. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, Tura BR, Silva CL, Cal RG, Beer I, Michels V, Safi J, Kayath M, Silva E. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-434.
14. Sales Júnior JA, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB Dias MD, Koterba E, Dias FS, Piras C, Luiz RR. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Revista brasileira terapia intensiva*. 2001(1):9-17.
15. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, Collins AJ: Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20: 223–228.
16. Glodowski SD, Wagener G, et al. New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit. *J Clin Anesth*. 2015;27:175–80.
17. Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:999-1006.
18. Doi K. Role of kidney injury in sepsis. *J Intensive Care*. 2016; 23:4-17.
19. Schrier RW, Wang W: Acute kidney failure and sepsis. *N Engl J Med*. 2004; 351:159-69.
20. S. Anderson, H. G. Rennke, R. Zatz: Glomerular adaptations with normal aging and with long-term converting enzyme inhibition in rats. *American Journal of Physiology*. 1994;267:F35-F43.

-
21. Post EH, Kellum JA, Bellomo R, Vincent JL. Renal perfusion in sepsis: from macro-to microcirculation. *Kidney Int.* 2017; 91:45-60.
 22. Di Giantomasso D1, Morimatsu H, May CN, Bellomo R: Intrarenal blood flow distribution in hyperdynamic septic shock: Effect of norepinephrine. *Crit Care Med.* 2003;31: 2509-13.
 23. Benes J, Chvojka J, Sykora R, et al. Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study. *Crit Care.* 2011;15:R256.
 24. Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, et al. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int.* 2010;77:527–535.
 25. Martin C, Eon B, Saux P, et al. Renal effects of norepinephrine used to treat septic shock patients. *Crit Care Med.* 1990;18:282–285.
 26. Deruddre S, Cheisson G, Mazoit JX, et al. Renal arterial resistance in septic shock: effects of increasing mean arterial pressure with norepinephrine on the renal resistive index assessed with Doppler ultrasonography. *Intensive Care Med.* 2007;33:1557–1562.
 27. Wan L1, Langenberg C, Bellomo R, May CN: Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med.* 2009;13:R190.
 28. Di Giantomasso D1, Morimatsu H, Bellomo R, May CN: Effect of low-dose vasopressin infusion on vital organ blood flow in the conscious normal and septic sheep. *Anaesth Intensive Care.* 2006;34:427-33.
 29. Gombos EA, Lee TH, Solinas J, Mitrovic M: Renal Response to Pyrogen in Normotensive and Hypertensive Man. *Circulation* 36: 555- 569, 1967
 30. Gordon AC1, Russell JA, Walley KR, Singer J, Ayers D, Storms MM, Holmes CL, Hébert PC, Cooper DJ, Mehta S, Granton JT, Cook DJ, Presneill JJ: The effects of vasopressin on acute kidney injury in septic shock. *Intensive Care Med*; Jan;36(1):83-91, 2010
 31. Legrand M, Bezemer R, Kandil A, et al. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. *Intensive Care Med.* 2011;37:1534–1542.
 32. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to

- complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989;243:1160–1165.
33. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010;16:708–712.
34. Tsukahara Y, Morisaki T, Kojima M, et al. iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis. *J Surg*. 2001;71:15–20.
35. Bultinck J, Sips P, Vakaet L, et al. Systemic NO production during (septic) shock depends on parenchymal and not on hematopoietic cells: in vivo iNOS expression pattern in (septic) shock. *FASEB J*. 2006;20:2363–2365.
36. Wu F, Schuster DP, Tyml K, Wilson JX. Ascorbate inhibits NADPH oxidase subunit p47phox expression in microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:124–131.
37. Tyml K, Li F, Wilson JX. Septic impairment of capillary blood flow requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase but not nitric oxide synthase and is rapidly reversed by ascorbate through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Crit Care Med*. 2008;36:2355–2362.
38. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, et al. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care*. 2015;19:26.
39. Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, et al. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*. 1997;273:H286–H294.
40. Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum J: A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014; 41:3–11.
41. Petilla V, Bellomo R. Understanding acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med*. 2014;40:1018–1020.
42. Morrell ED, Kellum JA, Pastor-Soler NM, Hallows KR. Septic acute kidney injury: molecular mechanisms and the importance of stratification and targeting therapy. *Crit Care*. 2014;18:501.

-
43. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009;119:2868-78.
 44. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303-10.
 45. Martin GS, Mannino DM, Moss M: The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34:15-21.
 46. De Luca d Alessandro E, Bonacci S, Giraldi G: Aging populations: the health and quality of life of the elderly. *Clin Ter* 2011;162; e13-e18.
 47. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *NEJM*. 2003;348:1546-54.
 48. Krabbe KS, Pederson M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental gerontology*. 2004;39:687-99.
 49. Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM: Effects of aging on mortality, hypothermia and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev*. 2003;124:1047-1058.
 50. Turbnbull IR, Buchman TG, Javadi P, Woolsey CA, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM: Age disproportionately increases sepsis-induced apoptosis in the spleen and gut epithelium. *Shock*. 2004;22:364-368.
 51. Turbnbull IR, Wlzonek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Buchman TG: Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock*. 2003;19:310-313.
 52. Kuro-O, M et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390:45-51.
 53. Hu MC, Kuro-OM, MOE O. W. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:2650-7.
 54. Nabeshima Y. Klotho: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res Rev*. 2002;1: 627-38..
 55. Tsujikawa H, et al. 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;17: 2393-403.

-
56. Kuro-O M. Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9 650-660.
 57. Hu MC, MOE O. W. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8:423-9.
 58. Chen TH, et al. The secreted Klotho protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in Klotho mutant mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;698:67-73.
 59. Cha SK et al. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol.* 2009;76: 38-46.
 60. Kuro-O M. Klotho and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2009;1790:1049-1058.
 61. Kuro-O M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem.* 2008; 389: 233-41.
 62. Yamamoto M, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem.* 2005;280: 38029-34.
 63. Buendia P, Ramirez R, Aljama P, Carracedo J. Vitamins and Hormones. Cordoba, Espanha: Elsevier; 2016
 64. Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune WS, Sarkar PS, Brobey R, Rosenblatt KP, Tilton RG, Choudhary S. Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation. *Diabetes.* 2011;60:1907-16.
 65. Sato HM, et al. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303: F1641-51.
 66. Sugiura H, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20:2636-45.
 67. Doi S, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem.* 2011;286:8655-65.
 68. Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8:423-9.
 69. De Oliveira RM. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* 2006;580:5753-8.

-
70. Haruna Y, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2331-6.
 71. Tang R, et al. Fosinopril and Losartan Regulate Klotho Gene and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Expression in Kidneys of Spontaneously Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press Res*. 2011; 34:350-357.
 72. De Borst MH, et al. Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1603-9.
 73. Mitani H, et al. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002;39:838-43.
 74. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocrine*. 2009;35:341-6.
 75. Inoue S, Sato T, Suzuki-Utsunomiya K, Komori Y, Hozumi K, Chiba T, Yahata T, Nakai K, Inokuchi S. Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice. *Shock*. 2013;39:311-6.
 76. Miyatji T, HU X, Yuen P.S.T., Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt S.M. and Star R.A. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney International*. 2003;64:1620–1631.
 77. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25:192-205.
 78. Doi K, Hu X, Yuen PS, et al. AP214, an analogue of α -melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney Int*. 2008; 73: 1266–1274.
 79. Holly MK, Dear JW, Hu X, et al. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int*. 2006 70:496–506.

-
80. Córdor JM, Rodrigues CE, Sousa Moreira RD, et al. Treatment With Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuates Sepsis-Induced Kidney Injury, Liver Injury, and Endothelial Dysfunction. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5:1048-57.
 81. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int.* 2010; 78: 1240-51.
 82. Lee SY, Lee YS, Choi HM, et al. Distinct pathophysiologic mechanisms of septic acute kidney injury: role of immune suppression and renal tubular cell apoptosis in murine model of septic acute kidney injury. *Crit Care Med.* 2012; 40:2997-3006.
 83. Moreno JA, Izquierdo MA, Sanchez-Niño MD, et al. The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF- α Reduce Renal Klotho Expression through NF KB. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22:1315–1325.
 84. Lopes JA, Fernandes P, Jorge S, et al. Long-term risk of mortality after acute kidney injury in patients with sepsis: a contemporary analysis. *BMC Nephrol.* 2010; 11: 9.
 85. Langenberg C, Bagshaw SM, May CN, et al. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Crit Care.* 2008; 12: R38.
 86. Coletta C, Módis K, Oláh G, et al. Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture. *Crit Care.* 2014; 18(5):511.
 87. Floras JS, Hassan MO, Jones JV, et al. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. *J Hyperten.* 1988; 6:525-35.
 88. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet.* 2003; 362:1799-805.

-
89. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation*. 2004; 109: 1776-82.
 90. Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, et al. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319:1348–54.
 91. Carcillo JA, Litten RZ, Suba EA, et al. Alterations in rat aortic alpha 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenergic stimulated phosphoinositide hydrolysis in intraperitoneal sepsis. *Circ Shock*. 1988; 26:331–9.
 92. Bucher M, Kees F, Taeger K, et al. Cytokines down-regulate alpha1adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Crit Care Med*. 2003; 31:566–71.
 93. Garrard CS, Kontoyannis DA. Spectral analysis of heart rate variability in the sepsis syndrome. *Clinic Autonomic Research*. 1993; 3:5-13.
 94. Teixeira C, Garzotto F, Piccinni P, et al. Fluid balance and urine volume are independent predictors of mortality in acute kidney injury. *Crit Care*. 2013. 24:17(1): R14
 95. Duman A, Akoç A, Kapci M et al. Prognostic value of neglected biomarker in sepsis patients with the old and new criteria: predictive role of lactate dehydrogenase. *Am J Emerg Med*. 2016; 34:2167-2171.
 96. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*. 2006; 177:1967-74.
 97. Rotondi S, Pasquali M, Tartaglione L, et al. Soluble α -Klotho Serum Levels in Chronic Kidney Disease. *International Journal of Endocrinology*. 2015; 2015:872193.
 98. Hu MC, Shi M, Gillings N, et al. Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int*. 2017; 91:1104-1114.