

Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo

**PALOMA SEGURA DE MELLO**

**Avaliação da participação da  $\alpha$ -Klotho na proteção do Sistema Nervoso Central em cultura primária mista de cerebelo**

**Versão Parcial**

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

**Área de concentração:** Farmacologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

São Paulo

2022

## RESUMO

Mello, PS. Avaliação da participação da  $\alpha$ -Klotho na Neuroproteção em cultura primária mista de cerebelo. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

O dano neuronal culminando na geração de morte celular por meio de danos agudos e crônicos, como nas doenças neurodegenerativas, pode estar altamente relacionada à apoptose e estresse oxidativo. A proteína  $\alpha$ -Klotho é correlacionada ao aumento da expectativa de vida e é imprescindível para a manutenção das funções neurofisiológicas, uma vez que parece estar envolvida em alterações no número de sinapses, mielinização, aprendizado e memória. Evidências mostram que a proteína Klotho é capaz de regular a expressão de enzimas antioxidantes, importante para a promoção da homeostase celular com a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a Klotho é possivelmente capaz de modular importantes vias envolvidas em processos de apoptose e longevidade, como a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt). Diante disso, o presente trabalho buscou investigar os efeitos protetores da proteína Klotho em cultura primária mista de cerebelo e em linhagem Neuro-2A frente a diferentes estímulos neurotóxicos que promovessem apoptose e estresse oxidativo. Na cultura primária mista de cerebelo, nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com a proteína Klotho durante 4 horas foi responsável por promover aumento da viabilidade celular e diminuição da citotoxicidade celular nos grupos tratados com Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) ou Estaurosporina (STS) durante 24 horas. O pré-tratamento com a proteína Klotho durante 6 horas foi capaz de produzir aumento da viabilidade celular e diminuição da citotoxicidade nos grupos tratados com STS durante 24 horas, assim como, diminuição da citotoxicidade nos grupos tratados com  $\text{FeSO}_4$  durante 24 horas. Não foram encontradas diferenças no aumento da viabilidade e na redução da citotoxicidade em linhagem Neuro-2A pelo pré-tratamento de 4 horas com a proteína Klotho. Desse modo, os resultados sugerem um possível papel protetor da proteína Klotho em cultura primária mista de cerebelo frente aos compostos citotóxicos utilizados, sendo necessárias futuras investigações das vias que possam estar atuando na reversão de tais danos celulares.

**Palavras chaves:** Klotho, Proteção, Citotoxicidade, Estresse oxidativo, Apoptose.

## ABSTRACT

Mello, PS. Evaluation of the participation of  $\alpha$ -Klotho in the Central Nervous System in primary mixed culture of the cerebellum. Dissertation (Master thesis in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Neuronal damage culminating in the generation of cell death through acute and chronic damage, such as in neurodegenerative diseases, may be highly related to apoptosis and oxidative stress. The protein  $\alpha$ -Klotho is correlated with increased life expectancy and is essential for the maintenance of neurophysiological functions, since it seems to be involved in changes in the number of synapses, myelination, learning and memory. Evidence shows that the Klotho protein can regulate the expression of antioxidant enzymes, important for the promotion of cellular homeostasis with the elimination of reactive oxygen species (O<sub>2</sub>S). In addition, Klotho is possibly able to modulate important pathways involved in apoptosis and longevity processes, such as phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway and protein kinase B (Akt). Therefore, the present study aimed to investigate the protective effects of Klotho protein in mixed primary culture of cerebellum and neuro-2A cells against different neurotoxic stimuli that promoted apoptosis and oxidative stress. In the mixed primary culture of cerebellum, our results demonstrated that pretreatment with Klotho protein for 4 hours was responsible for promoting increased cell viability and decreased cell cytotoxicity in groups treated with Ferrous Sulfate (FeSO<sub>4</sub>) or STS for 24 hours. Pretreatment with Klotho protein for 6 hours was able to produce increased cell viability and decreased cytotoxicity in the groups treated with STS for 24 hours, as well as decreased cytotoxicity in the groups treated with FeSO<sub>4</sub> for 24 hours. No differences were found in the increase in viability and in the reduction of cytotoxicity in Neuro-2A cells by 4-hour pretreatment with Klotho protein. Thus, the results suggest a possible protective role of Klotho protein in mixed primary culture of cerebellum in relation to the cytotoxic compounds used, and further investigations of the pathways that may be acting in the reversal of such cellular damage are necessary.

**Keywords:** Klotho, Protection, Cytotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis

# 1. INTRODUÇÃO

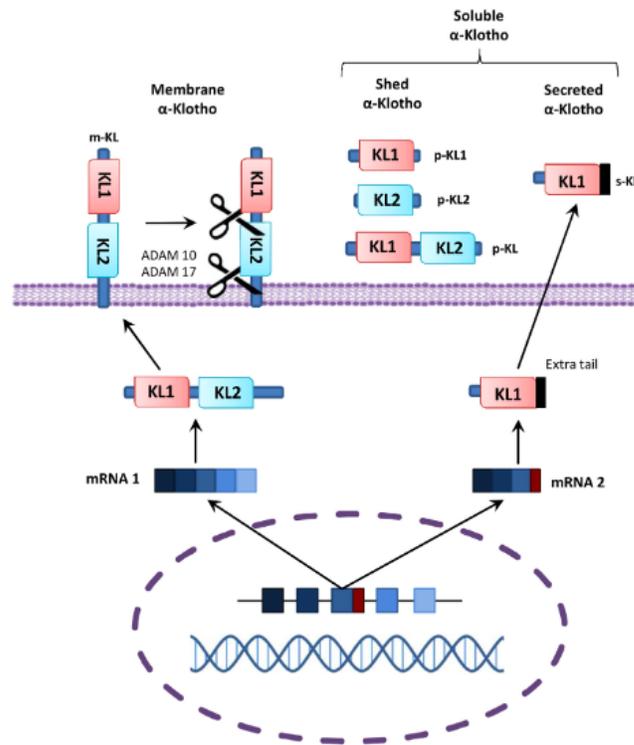
## 1.1 A proteína $\alpha$ -Klotho

O gene *klotho*, descrito pela primeira vez em 1997, foi descoberto a partir de camundongos que tiveram uma mutação insercional na região flanqueadora 5' do gene *klotho*, resultando em rompimento da região promotora e geração de um alelo hipomórfico. Nos animais, a produção reduzida do produto do gene *klotho* levou a diminuição da expectativa de vida e o aparecimento precoce de múltiplas desordens relacionadas ao envelhecimento como arteriosclerose, osteoporose e enfisema pulmonar (KURO-O et al., 1997).

Foram descobertos genes parálogos da Klotho, ou seja, genes que divergiram por duplicação com tendência a assumir diferentes funções. Estes parálogos foram subdivididos em  $\beta$ -Klotho e  $\gamma$ -Klotho, sendo a  $\alpha$ -Klotho comumente nomeada de apenas Klotho (KIM et al., 2015; KURO-O M, 2012). Neste trabalho, focaremos nas ações da proteína Klotho/ $\alpha$ -Klotho.

O gene é composto por 5 éxons que codificam uma proteína transmembrana “single pass” do tipo I constituída por um pequeno domínio intracelular composto por 10 aminoácidos e com dois domínios extracelulares (KL1 e KL2), com sequência homóloga a  $\beta$ -glicosidases (MATSUMURA et al., 1998). Além disso, as porções extracelulares podem ser clivadas e secretadas no sangue, líquido cefalorraquidiano e urina (KURO-O et al., 1997) (Figura 1). Assim, alterações na expressão do gene *klotho* envolvem tecidos que não o expressam intrinsecamente, confirmando a possibilidade da ação da proteína Klotho como fator humoral (MATSUMURA et al., 1998).

**Figura 1.** A proteína Klotho pode ser encontrada na forma de membrana (m-KL) ou na forma solúvel, esta obtida por meio de clivagem pela ADAM 10 ou 17 (p-KL1, p-KL2 ou p-KL) ou por splicing alternativo diretamente secretada (s-KL).



Fonte: Revisado em Cararo-Lopes et al (2017).

A forma secretada da  $\alpha$ -Klotho parece estar associada a mais de 10 diferentes funções como a regulação de canais iônicos e transporte de íons (HUANG, 2012), além de interferir em vias importantes para o envelhecimento, como a WNT (LIU et al., 2007) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (KUROSU et al., 2005). Trabalhos recentes mostraram a possibilidade da klotho solúvel modular a sinalização por meio de sua ligação a resíduos de glicolípídeos presentes em microdomínios na membrana, as *lipids rafts*, regiões importantes no processo de transdução de sinais e tráfego de membrana (DALTON et al., 2017; WRIGHT et al., 2017). Já a forma membranar da proteína funciona como co-receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-23) (KUROSU et al., 2006) atuando na inibição da reabsorção de fosfato e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (revisado de CARARO-LOPES et al., 2017). A forma intracelular da proteína  $\alpha$ -Klotho é capaz de interagir com o RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene-1*), inibindo a expressão induzida por RIG- I, das interleucinas IL-6 e IL-8, importantes

mediadores da inflamação presentes no envelhecimento (LIU et al., 2011).

O gene *klotho* é predominantemente expresso no túbulo distal convoluto do rim, mas também é expresso em grandes quantidades no cérebro em células endoteliais do plexo coróide e nas células de Purkinje do cerebelo (KURO-O et al., GERMAN et al., 2022; 1997; LIM et al., 2015). Além disso, possui expressão considerável na glândula pituitária, paratireóide, pâncreas, ovários, testículos, placenta e outras regiões do sistema nervoso central (SNC) como hipotálamo, hipocampo e córtex (KURO-O et al., 1997; WATANABE et al., 2004; GERMAN et al., 2012). Nos rins, a  $\alpha$ -Klotho apresenta papel renoprotetor, capaz de bloquear a inflamação por meio da inibição da ativação de NF- $\kappa$ B e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHAO et al., 2011; NITTA et al., 2014, MORENO et al., 2011). Já no SNC, estudos apontam alterações no número de sinapses, mielinização, aprendizado e memória relacionado a proteína  $\alpha$ -Klotho, sendo a superexpressão desta, um fator potencializador da cognição (DUBAL et al., 2014). Desse modo, a  $\alpha$ -Klotho, possui um papel neuroprotetor, influenciando a mielinização e portanto, sendo imprescindível para a manutenção das funções neurofisiológicas e habilidade de resposta frente a estímulos nocivos (revisado por CARARO-LOPES et al., 2017).

Estudos demonstraram a relevância da  $\alpha$ -Klotho em humanos, onde a presença de um alelo (KL-VS) que aumenta os níveis de  $\alpha$ -Klotho circulantes, está correlacionado a um aumento na expectativa de vida, redução do risco de doenças cardiovasculares, aumento do volume cortical e melhora cognitiva (ARKING et al., 2002; ARKING et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2015; DUBAL et al., 2014). Por sua vez, a proteína encontra-se reduzida em líquido cefalorraquidiano de idosos, e essa redução é agravada na presença de Doença de Alzheimer (DA) e Esclerose múltipla (EM) (SEMBA et al., 2014; ALEAGHA et al., 2015).

O camundongo deficiente para *klotho* apresenta alelo hipomórfico, ou seja, um alelo que em homozigose ( $kt^{-/-}$ ) reduz a atividade do gene *klotho*, produzindo síndrome de envelhecimento precoce. É importante considerar, que tais animais não são modelos nocaute, e sim hipomórficos, uma vez que ainda apresentam alguma expressão da proteína Klotho. Até as 3 primeiras semanas de desenvolvimento, estes animais são indistinguíveis dos animais selvagens, porém, entre 3-4 semanas de desenvolvimento,

os animais hipomórficos apresentam interrupção do crescimento, atrofia na pele e músculos, infertilidade, surgimento de doenças relacionadas ao envelhecimento e morte precoce em torno de 8 semanas de idade (KURO-O et al., 1997). As alterações centrais nos camundongos *kt<sup>-/-</sup>* parecem se relacionar com o aumento da oxidação do DNA e peroxidação lipídica no córtex cerebral e no hipocampo, sendo maiores os níveis de dano oxidativo nesta última região. Há também o aumento de fatores pró-apoptóticos Bax (*BCL-2 associated X protein*) e diminuição dos fatores anti-apoptóticos Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) no hipocampo e aumento da expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e glutational peroxidase (GPx) no hipocampo e cerebelo, provavelmente devido a resposta compensatória ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Nagai et al., 2003). Além disso, esses animais possuem menor quantidade de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, menor nível de dopamina no estriado (CLINTON et al, 2013; KOSAKAI et al., 2011), menor número de neurônios hipocampais piramidais (SHIOZAKI et al., 2008), menor número de células de Purkinje no cerebelo (KURO-O et al., 1997) e menor número de neurônios motores na medula espinhal (ANAMIZU et al., 2005).

## 1.2 Dano Neuronal

O dano neuronal é uma característica comum a diversos processos neuropatológicos crônicos associados ao envelhecimento, como na doença de Parkinson (DP) e doença de Alzheimer (DA), e em processos gerados por danos agudos, como na isquemia ou trauma (YUAN; YANKNER, 2000). Tal dano pode ser relacionado com a ativação de uma série de mecanismos, entre eles, a geração do estresse oxidativo e a apoptose (CHANDRA et al., 2000; FRIENDLANDER, 2003; SIES, 2015). Sabe-se que o estresse oxidativo é formado pelo desequilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (DROGE W, 2002; YOUNG; WOODSIDE, 2001). Já a apoptose, conhecida como morte celular programada, apresenta papel fundamental na promoção da homeostase e no desenvolvimento normal celular e a sua disfunção possui sérias consequências patológicas (DELONG, 1998; FRIENDLANDER, 2003; STEVENS; OLTEAN, 2019). Em doenças neurodegenerativas como DA, DP, Doença de Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) foram

observados aumento da taxa de apoptose e conseqüentemente disfunção e morte celular (RADI et al., 2014). Trata-se de um mecanismo altamente relacionado com o estresse oxidativo, uma vez que o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e a defesa antioxidante pode vir a produzir eventos apoptóticos (CHANDRA et al., 2000).

A ativação de tais mecanismos no cérebro pode ser exacerbada devido a sua susceptibilidade no combate a EROS em comparação a outros órgãos, em detrimento dos altos níveis de oxigênio necessários para a manutenção da função cerebral (responsável por mais de 20% do consumo total de oxigênio). Estudos demonstraram que o cérebro, apresenta elevadas quantidades de EROs produzidas durante a fosforilação oxidativa, elevada quantidade de ferro capaz de catalisar a formação de EROs, rica constituição lipídica e de ácidos graxos insaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica e a menor quantidade de enzimas antioxidantes como a SOD, catalase (CAT) e GPx (DRINGEN R, 2000; CHEN; ZHONG, 2014).

É importante destacar o papel e a função das EROs, uma vez que em concentrações fisiológicas, as EROs atuam como segundos mensageiros promovendo importante ação no crescimento e homeostase celular. Contudo, em altas concentrações são capazes de provocar oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios podendo causar danos e morte celular no processo então conhecido de estresse oxidativo (ABRAHAM et al., 2016). São exemplos de espécies reativas o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito ( $ONO_2^-$ ) (ZHANG et al., 2016), sendo o  $OH^{\cdot}$  o mais prejudicial ao organismo em detrimento de sua meia vida curta (BARREIROS et al., 2016). Todas elas podem ser produzidas pelas proteínas constituintes da membrana plasmática, como a família de NADPH oxidases, pelas enzimas citosólicas, como as ciclooxigenases, em peroxissomos, e a grande maioria, nas mitocôndrias como consequência da fosforilação oxidativa para a geração de energia. A célula é capaz de combater as EROs por meio de uma importante defesa antioxidante composta por enzimas como a SOD, CAT, peroxirredoxina (Prx) e GPx ou por agentes obtidos da dieta, como ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol (BARBER et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). São encontradas três formas intracelulares de SOD, a SOD 1 dependente de Cobre e Zinco (Cu-ZnSOD, no citosol; SOD 2 (ou MnSOD) dependente de manganês, na matriz mitocondrial; e a

SOD 3 encontrada no espaço extracelular. Ambas são capazes de reduzir  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , posteriormente convertida em  $H_2O$  e  $O_2$  pela catalase ou glutathione peroxidase (RADI et al., 1991). A existência de uma superóxido dismutase própria de mitocôndria confirma a importância da produção mitocondrial de superóxidos (WEISEGER et al., 1973). As peroxirredoxinas fazem parte da família das peroxidases dependentes de tioredoxina (Trx) e atuam na redução de peróxidos, como o  $H_2O_2$  (KIM; JANG, 2019).

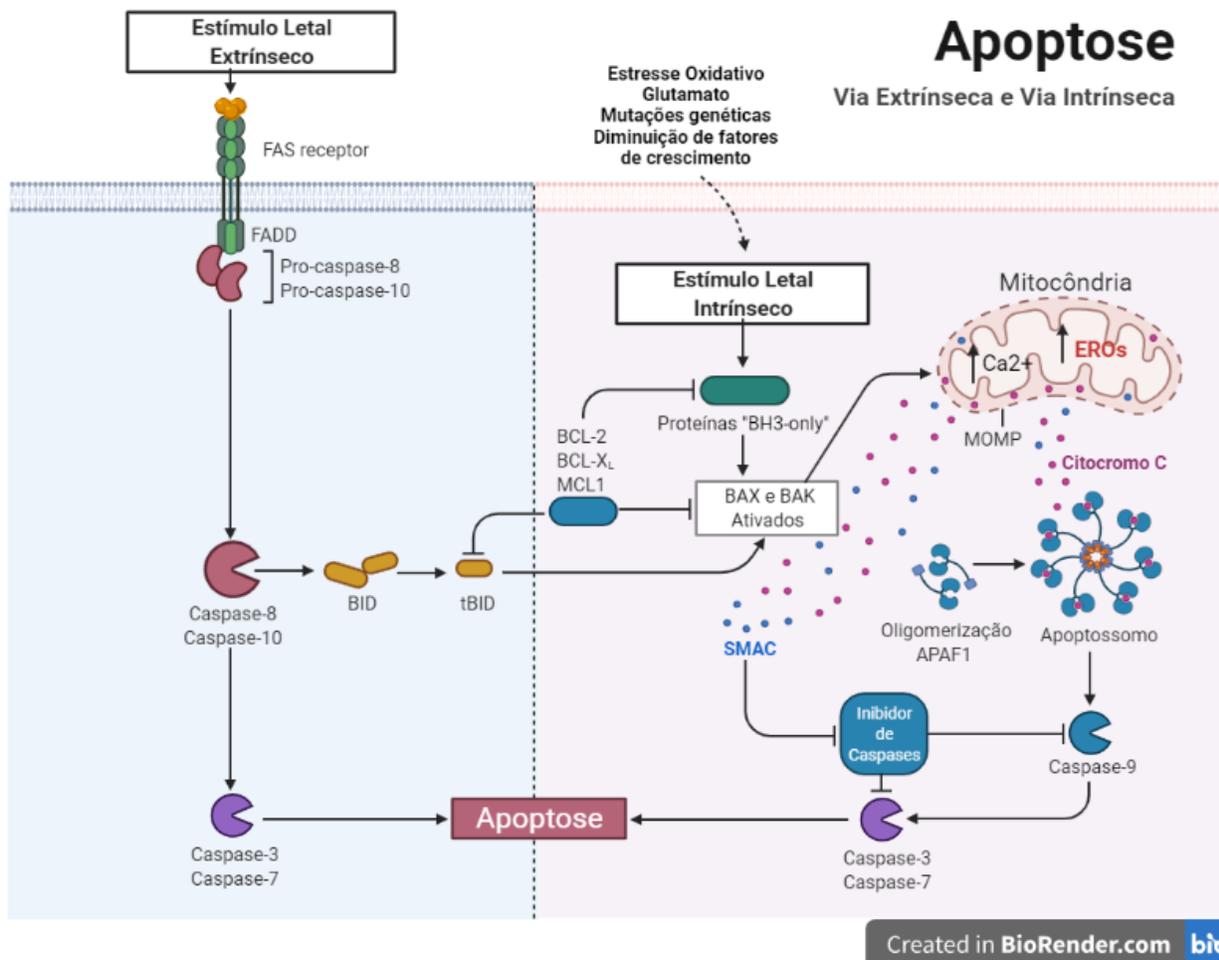
O uso do composto citotóxico Sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) em modelos *in vitro* pode ser uma boa ferramenta para a compreensão de mecanismos de dano neuronal associados ao estresse oxidativo. O  $FeSO_4$  é capaz de prejudicar o transporte de glutamato e glicose, induzir peroxidação lipídica e causar disfunção mitocondrial (URANGA et al., 2009). O ferro é necessário para a manutenção de diversas funções fisiológicas no SNC, uma vez que está envolvido no processo de fosforilação oxidativa, atua como cofator na síntese de enzimas cerebrais específicas e na síntese de neurotransmissores, como dopamina, serotonina e epinefrina, além de atuar na formação da bainha de mielina (HULET et al., 1999). Entretanto, em situações em que o ferro se encontra em excesso e livre dentro da célula, excedendo a capacidade de ligação à transferrina, este pode se tornar uma potente neurotoxina (WILLMORE; RUBIN, 1984). Durante a reação de Fenton, o  $Fe(II)$  é oxidado a  $Fe(III)$  pelo  $H_2O_2$ , produzindo o radical hidroxila, cujo alto poder oxidante é capaz de danificar lipídios, proteínas e DNA (HULET et al., 1999). Tal evidência de acúmulo de ferro no cérebro está associada à patogênese de doenças neurodegenerativas como na DP e DA, uma vez que foram encontrados acúmulo de ferro na substância negra e nas placas neuríticas, respectivamente (CONNOR et al., 1995; SOFIC et al., 1988).

A formação de EROs em excesso contribui para alterações na maquinaria mitocondrial, por meio da fragmentação e perda do potencial de membrana mitocondrial, acúmulo de  $Ca^{2+}$  mitocondrial, dano ao DNA mitocondrial e liberação de citocromo C, ativando-se então o processo conhecido como apoptose (RADI et al., 2014). E tal relação entre os processos de apoptose e o estresse oxidativo pode ser corroborada em situações onde a superexpressão da enzima SOD foi capaz de provocar a redução da apoptose neuronal (KANE et al., 1993).

A apoptose pode ocorrer a partir de duas vias distintas que trabalham

sinergicamente para a homeostase celular: via extrínseca, mediada por receptores de morte celular e seus ligantes e a via intrínseca/mitocondrial, mediada por estímulos internos como dano de DNA, estresse oxidativo ou hipóxia (STEVENS; OLTEAN, 2019). A ativação da via intrínseca resulta na perda da integridade da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c no citoplasma, que ao se ligar a Apaf-1 e caspase-9 formam o complexo molecular apoptossomo. Ambas as vias levam a ativação da caspase-3 efetora, culminando na ativação de endonucleases e proteases que assim promovem a degradação do DNA e desintegração da célula (FRIEDLANDER, 2003; STEVENS; OLTEAN, 2019; SVANDOVA et al, 2017) (Figura 2). O processo de apoptose é então regulado pela família de proteínas Bcl-2, Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) e a ativação de uma cascata de caspases que são capazes de promover a destruição de componentes da infraestrutura celular, matriz nuclear, fatores de transcrição e enzimas de reparo de DNA e promover a ativação de fatores pró-apoptóticos (ENARI et al., 1998; KRANTIC et al., 2007; YUAN; YANKNER, 2000).

**Figura 2.** Via extrínseca e Via intrínseca da apoptose.



Fonte: Imagem criada pela autora no Biorender.com.br.

A via extrínseca é ativada por meio de ligantes de morte celular resultando na ativação de uma cascata de caspases, e por fim ativação da caspase 3 efetora. A via intrínseca é ativada por sinais de estresse intracelulares que levam a ativação de proteínas pró-apoptóticas efetoras Bax e BAK por meio de proteínas pró-apoptóticas iniciadoras “BH3-only”. A ativação de BH3-only resulta na translocação de Bax e BAK do citosol para a membrana mitocondrial, onde ocorre a dimerização e posterior oligomerização Bax/BAK. Essa oligomerização resulta na permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) e liberação de diversas proteínas pró-apoptóticas, como SMAC e citocromo C. O dano na integridade da membrana mitocondrial leva à perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento da concentração de cálcio intracelular, oxidação de NADH e NADPH e produção de EROs em excesso. No citosol, o citocromo c liberado se liga com Apaf-1, formando o complexo apoptossomo com subsequente ativação da cascata de caspases e apoptose. As duas vias podem se comunicar por meio da proteólise da proteína BH3-only Bid mediada pela caspase-8 e originando t-Bid capaz de ativar Bax e Bak diretamente. As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1 podem agir diretamente na inibição de Bax e Bak no citosol ou na inibição das proteínas BH3-only (TAYLOR et al., 2008; RADI et al., 2014).

Algumas substâncias podem ser utilizadas na modulação da maquinaria envolvida na apoptose, como por exemplo, a Estaurosporina (STS), um alcalóide derivado de *Streptomyces* responsável pela inibição de diversas proteínas quinases, mais precisamente a proteína quinase C (PKC) (ZHANG et al., 2004; ZHAO et al., 2015). Estudos demonstraram que a STS é responsável pela indução da liberação de citocromo c, ativação de caspases, aumento de EROs intracelular e aumento da concentração intracelular de cálcio (KROHN et al., 1998; PREHN et al., 1997; KRUMAN et al., 1998). Tais danos podem ser corroborados com o observado por Koh e colaboradores, onde foi observado a condensação da cromatina, diminuição do corpo celular e a fragmentação do DNA em culturas de neurônios corticais expostas a STS (KOH et al., 1995). Krohn e colaboradores verificaram que o tratamento de culturas de neurônios hipocâmpais de ratos submetidos a exposição por STS com agente antioxidante alfa-tocoferol ou um mimético de superóxido dismutase foi capaz de reduzir significativamente a morte celular desses neurônios (KROHN et al., 1998). Adicionalmente, o grupo de Jantas-Skotniczna observou que a memantina, fármaco utilizado na DA, foi capaz de atenuar a apoptose induzida pela STS em culturas hipocâmpais, neocorticais e estriatais, sendo na primeira região atenuado de forma mais eficiente (JANTAS-SKOTNICZNA et al., 2006). Desse modo, a estaurosporina passou a ser frequentemente utilizada para estudos relacionados aos danos celulares provocados pela apoptose e estresse oxidativo, eventos altamente relacionados, sendo em muitos deles testados compostos com potencial efeito neuroprotetor. Apesar disso, não foram encontrados estudos que envolvessem o uso de STS, como também do FeSO<sub>4</sub> e a Klotho no SNC, proteína conhecida por seus potenciais efeitos protetores frente às alterações promovidas durante o envelhecimento.

### **1.3 A proteína $\alpha$ -Klotho: ações no estresse oxidativo e apoptose**

A proteína  $\alpha$ -Klotho/Klotho é capaz de regular a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (BOKSHA et al., 2017). A adição de Klotho recombinante (rKlotho) em cultura celular HeLa foi capaz de induzir a expressão da enzima SOD 2, aumentando a resistência ao dano oxidativo frente o uso do *paraquat*, um herbicida que produz altas doses de superóxido e potencialmente tóxico para

humanos (YAMAMOTO et al., 2005). Além disso, o tratamento com a proteína Klotho em células do ovário de ratos (CHO) em conjunto do uso do herbicida promoveu redução da população de células apoptóticas anexinas V-positivas e preservou a quantidade de células não apoptóticas anexina V-negativa (YAMAMOTO et al., 2005). No mesmo estudo, animais transgênicos superexpressando Klotho sobreviveram quando receberam doses letais de *paraquat* em relação a animais *kt<sup>-/-</sup>* e selvagem, em detrimento da regulação da fosforilação do fator de transcrição FOXO, que uma vez no núcleo, promove a expressão de SOD 2 e catalase (YAMAMOTO et al., 2005).

Zeldich e colaboradores demonstraram o papel neuroprotetor da Klotho no aumento da resistência ao dano oxidativo através da regulação na enzima antioxidante Prx-2 e através da fosforilação da via PI3K/Akt (fosfatidilinositol-3-quinase e proteína quinase B), quinase reguladora de sinais apoptóticos e centro de sinalização da sensibilidade a EROs (ZELDICH et al., 2014). A superexpressão da Klotho foi capaz de proteger neurônios dopaminérgicos estriatais frente ao dano oxidativo por meio da supressão da via p38 MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) e da ASK1 (quinase-1 reguladora de sinal de apoptose) e promover aumento da longevidade, uma vez que a via p38 MAPK é capaz de regular fisiologicamente o processo de envelhecimento por um mecanismo de balanço entre sinais que ativam ou inibem ASK1 (BROBEY et al., 2015; HSIEH et al., 2010).

Outros estudos corroboram os efeitos da superexpressão de  $\alpha$ -Klotho na supressão do estresse oxidativo e eventos apoptóticos, por meio da redução da apoptose induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, redução da atividade de  $\beta$ -galactosidase, da fragmentação do DNA mitocondrial, da geração de ânion superóxido, peroxidação lipídica e da redução da expressão de proteínas pró-apoptóticas Bax (HARUNA et al., 2007; WANG et al., 2012).

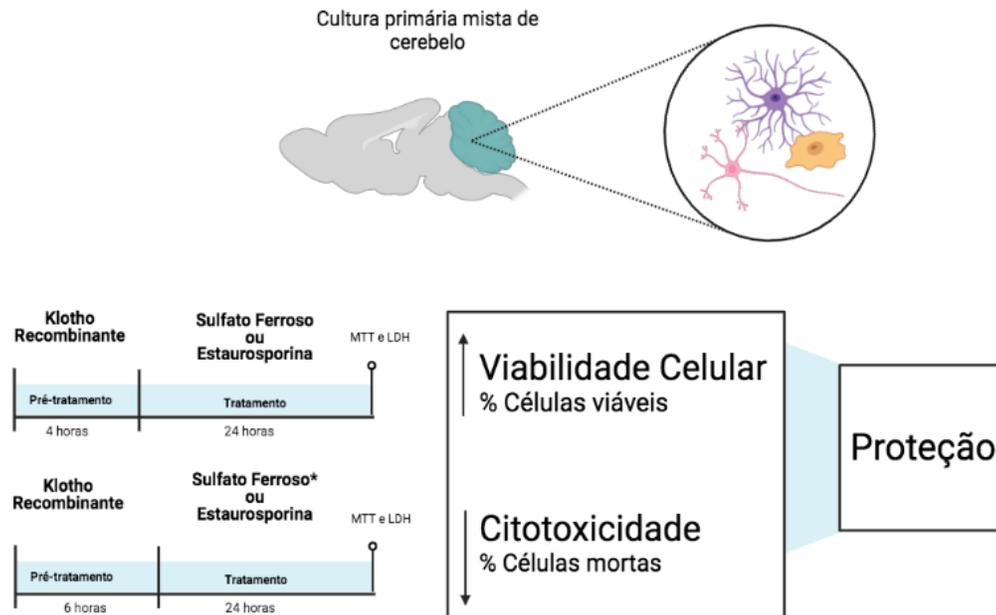
Apesar de tais evidências, ainda há uma carência na compreensão dos possíveis efeitos protetores da proteína Klotho frente ao dano oxidativo e apoptose no SNC e mais especificamente, na região do cerebelo. A região do cerebelo tem sido pouco explorada para estudos relacionados à proteína antienvhecimento. Curiosamente, se tratando de neurodegeneração e envelhecimento, o cerebelo tem se demonstrado um grande enigma (LIANG; CARLSON, 2020). Uma série de estudos *post-mortem* revelaram certa resistência na região cerebelar aos danos celulares, entre eles os danos oxidativos

mitocondriais (MECOCCI et al., 1993), caracterizando um envelhecimento "mais lento" em relação a regiões como o córtex (FRASER et al., 2005). Ademais expressa Klotho em quantidades expressivas em relação a outras regiões do SNC, mais precisamente nas células de Purkinje presentes entre as camadas moleculares e granulares do cerebelo (KURO-O et al., 1997, GERMAN et al., 2022) e vem sendo bastante utilizado para o estudo de modelos de morte celular, incluindo excitotoxicidade e apoptose (LAAPER et al., 2017). Sendo assim, é de extrema relevância investigar possíveis efeitos protetores da proteína Klotho na região do cerebelo.

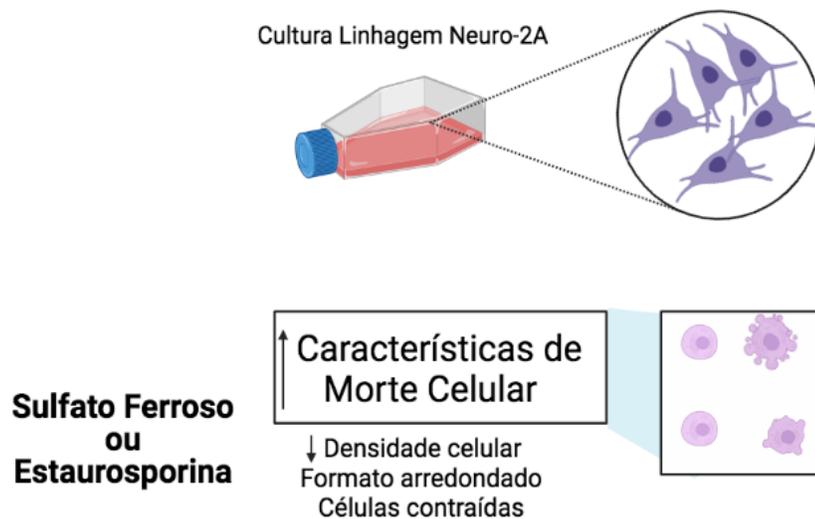
## **2. CONCLUSÃO**

Os experimentos conduzidos no presente estudo sugerem um possível papel protetor da proteína Klotho em cultura primária mista de cerebelo, observado por meio do aumento significativo da viabilidade celular e da diminuição significativa da citotoxicidade celular nos grupos pré-tratados com a proteína Klotho durante 4h seguidos dos compostos citotóxicos testados, Sulfato ferroso ou Estaurosporina durante 24 horas, em relação aos grupos com os compostos citotóxicos apenas. O pré-tratamento com a proteína Klotho durante 6 horas foi capaz de provocar a redução da citotoxicidade nos grupos tratados com  $\text{FeSO}_4$ , redução da citotoxicidade e aumento da viabilidade celular nos grupos tratados com STS. Essas alterações podem estar ocorrendo por meio da possível ação antioxidante e anti-apoptótica da proteína Klotho observada em diferentes estudos. Nos experimentos conduzidos com a linhagem de células Neuro-2A, não foi possível observar um efeito protetor da proteína Klotho frente aos compostos  $\text{FeSO}_4$  e STS nas concentrações utilizadas. No entanto, foi possível observar características morfológicas típicas de morte celular por parte de ambos os compostos citotóxicos utilizados durante 24 horas (Figura 3). Entretanto, o presente trabalho demonstrou que houve a proteção por meio da proteína Klotho frente aos compostos citotóxicos, não sendo investigado até o momento a fosforilação de vias de sinalização e expressão de enzimas antioxidantes e genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos pela proteína Klotho, sendo necessária a realização de tais experimentos futuramente.

**Figura 3.** Possível papel protetor da proteína Klotho em cultura primária mista de cerebello e características morfológicas de morte celular provocadas pelos compostos citotóxicos em linhagem Neuro-2A.



\*O pré-tratamento com Sulfato Ferroso durante 6 horas produziu apenas diminuição da citotoxicidade, sem significância estatística entre os grupos no ensaio de viabilidade celular.



### 3. REFERÊNCIAS

ALEAGHA, M.S.E. et al. Decreased concentration of Klotho in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.281, p.5-8, 2015.

ANAMIZU, Y. et al. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. **Acta Neuropathologica**, vol. 109(5), p. 457-466, 2005.

ARKING, D.E. et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation Research**, vol. 96, p.412-418, 2005.

ARKING, D.E. et al. Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 99, p.856–861, 2002.

BALABAN, R.S., NEMOTO, S., FINKEL, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, vol. 120(4), p.483-495, 2005.

BARBER, S.C., MEAD, R.J., SHAW, P.J. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, vol.1762, p.1051–1067, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BOKSHA, I.S. et al. Klotho protein: Its role in aging and central nervous system pathology. **Biochemistry (Moscow)** vol. 82(9), p. 990–1005, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p.248-254, 1976.

BRENNAN, A.M. et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. **Nature Neuroscience**, vol.12(7), p.857-863, Jul 2009.

BROBEY, R.K. et al. Klotho Protects Dopaminergic Neuron Oxidant-Induced Degeneration by Modulating ASK1 and p38 MAPK Signaling Pathways. **PLOS ONE**, vol.10, Oct 2015.

BRONISZ, A., GAJKOWSKA, B., DOMAŃSKA-JANIK, K. PKC and Raf-1 inhibition-related apoptotic signaling in N2a cells. **Journal of Neurochemistry**. vol. 81(6), p.1176-1184, Jun 2002.

CARARO-LOPES, M.M. et al. The relevance of  $\alpha$ -KLOTHO to the central nervous system: Some key questions. **Ageing Res Rev**, vol.36, p.137-148, 2017.

CHANDRA, J., SAMALI, A., ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med**, vol. 29, p. 323–333, 2000.

CHEN, C.D. et al. A method to specifically activate the Klotho promoter by using zinc finger proteins constructed from modular building blocks and from naturally engineered Egr1 transcription factor backbone. **The FASEB Journal**, vol. 34(6), p. 7234-7246, Jun 2020.

CHEN, Z., ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bull**, vol.30(2), p. 271-281, April 2014.

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, vol.1, p.623–634, 1988.

CIAPETTI, G. et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, vol.14(5), p.359-64, Apr 1993.

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

CONNOR, J.R., MENZIES, S.L. Cellular management of iron in the brain. **Journal of the Neurological Sciences**, vol.134, p.33-44, Dec 1995.

COYLE, J., PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, vol.262, p.689–695, 1993.

DALTON, G. et al. Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.114(4), p. 752–757, 2017.

DELONG, M.J. Apoptosis: A Modulator of Cellular Homeostasis and Disease States. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 842, p. 82-90, 1998.

DOMAŃSKA-JANIK, K., ZALEWSKA, T. Effect of brain ischemia on protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**; vol.58(4), p.1432-1439, Apr 1992.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, vol.62, n.6, p. 649-671, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, vol. 82(1), p.47-95, Jan 2002.

DUBAL, D.B. et al. Life extension factor klotho enhances cognition. **Cell reports**, vol.7, p.1065-1076, 2014.

ENARI, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, vol.391, p.43–50, 1998.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**, vol.42, p. 1–11, 1984.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells. **Wiley Online Books**, p. 99-114, 2011.

FRIEDLANDER, R.M. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. **New England Journal of Medicine**, vol.348(14), p. 1365–1375, 2003.

GERMAN, D.C. et al. Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein. **Neurobiology of aging**, vol. 33, p.1425-1483, 2012.

GIROUARD, H. et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. **Journal of Neuroscience**, vol.29(8), p.2545-2552, Feb 2009.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, vol18(9), p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, 5<sup>th</sup> edition, 1999.

HARUNA, Y. et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.104(7), p. 2331-2336, 2007.

HSIEH, C.C. et al. The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging. **Aging**, vol.2(9), p.597-611, 2010.

HUANG, C-L. Regulation of ion channels by secreted Klotho. **In Endocrine FGFs and Klothos**, p.100-106, 2012.

HULET S.W. et al. Characterization and distribution of ferritin binding sites in the adult mouse brain. **Journal of Neurochemistry**, vol.72(2), p.868-874, Feb 1999.

JANTAS-SKOTNICZNA, D., KAJTA, M., LASOŃ, W. Memantine attenuates staurosporine-induced activation of caspase-3 and LDH release in mouse primary neuronal cultures. **Brain Research**, vol.1069(1), p.145-153, Jan 2006.

KANE, D.J. et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, vol.262, p.1274–1277, 1993.

KAWAMOTO, E.M. et al. Age-related changes in cerebellar Phosphatase-1 and Na,K-ATPase activities. **Neurobiology of Aging**, vol.9, p.1149–1159, 2008.

KAWAMOTO, E.M. et al. Effect of activation of canonical Wnt signaling by the Wnt-3a protein on the susceptibility of PC12 cells to oxidative and apoptotic insults. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol.45(1), p.58-67, 2012.

KIM, J.H. et al. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. **Journal of Lifestyle Medicine**, vol. (1), p.1-6, 2015.

KIM, Y., JANG, H.H. Role of Cytosolic 2-Cys Prx1 and Prx2 in Redox Signaling. **Antioxidants**, vol. 8, p.169, 2019.

KOH, J.Y., CHOI, D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **Journal of Neuroscience Methods**, vol.20, p.83 - 90, 1987.

KOH, J.Y. et al. Staurosporine-induced neuronal apoptosis. **Experimental Neurology**, vol.135(2), p.153-159, Oct 1995.

KOH, J.Y., COTMAN, C.W. Programmed cell death: its possible role in calcium channel antagonist neurotoxicity. **Brain Research**, vol. 587, p.233-240, 1992.

KOSAKAI, A. et al. Degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons in klotho mouse related to vitamin D exposure. **Brain Research**, vol.1382, p.109-117, 2011.

KRÄMER, D., MINICHELLO, L. Cell culture of primary cerebellar granule cells. **Methods in Molecular Biology**, vol.633, p.233-239, 2010.

KRANTIC, S. et al. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. **Progress in Neurobiology**, vol.81, p.179–196, 2007.

KROHN, A.J., PREIS, E., PREHN, J.H.M. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. **Journal of Neuroscience**, vol.18, p.8186–8197, 1998.

KRUMAN, I., GUO, O., MATTSON, M.P. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. **Journal of Neuroscience Research**, vol.51, p.293–308, 1998.

KURO-O, M. Klotho in health and disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, vol.21(4), p.362-368, Jul 2012.

KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, vol. 390, p.45-51, 1997.

KUROSU, H. et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, vol.16, p.1829-1833, Sep 2005.

KUROSU, H. et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. **Journal of Biological Chemistry**, vol.281, p.6120-6123, 2006.

LAU, A., TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch: European Journal of Physiology**, vol. 460, p.525–542, 2010.

LEPAGE, K.T. et al. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. **Critical Reviews in Neurobiology**, vol.17(1), p.27-50, 2005.

LIANG, K.J., CARLSON, E.S. Resistance, vulnerability and resilience: A review of the cognitive cerebellum in aging and neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Learning and Memory**, vol.170, Apr 2020.

LIM, K. et al.  $\alpha$ -Klotho Expression in Human Tissues. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol.100(10), p.1308-1318, Oct 2015.

LIU, Y. et al. Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. **Neuroscience**, vol10;166(1), p.241-251, Mar 2010.

LIU, F. et al. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. **Nature cell biology**, vol. 13, p.254-262, 2011.

LIU, H. et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, vol.317, p.803-806, 2007.

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the Human Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho Protein. **Biochemical and biophysical research communications**, vol.242, p.626-630, 1998.

MECOCCI, P. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. **Annals of Neurology**, vol.34(4), p.609-616, Oct 1993.

MORENO, J.A. et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 22, p.1315-1325, 2011.

NAGAI, T. et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. **The FASEB Journal**, vol.17, p.50-52, 2003.

NITTA, K., NAGANO, N., TSUCHIYA, K. Fibroblast growth factor 23/klotho axis in chronic kidney disease. **Nephron Clinical Practice**, vol.128, p.1-10, 2014.

OZAWA, S.O., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, vol. 54, p. 581–618, 1998.

PREHN, J.H.M. et al. Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. **Journal of Neurochemistry**, vol.68, p.1679–1685, 1997.

RADI, R. et al. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **Journal of Biology Chemistry**, 1991.

RADI, E., et al. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, vol. 42, suppl, 3 S125-S152, 2014.

SCHMIDT, W.J., BUBSER, M., HAUBER, W. Behavioural pharmacology of glutamate in the basal ganglia. **Journal of Neural Transmission**, vol.38, p. 65–89, 1992.

SEGOVIA, G., et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mechanisms of Ageing Development**, vol. 122, p.1-29, 2001.

SEMBA, R.D. et al. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, vol. 558, p.37-40, 2014.

SHAMAS-DIN, A. et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 5(4), Apr 2013.

SHIOZAKI, M. et al. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. **Neuroscience**, vol.152(4), p.924-941, Apr 2008.

SIES, H. Oxidative stress: impact in redox biology and medicine. **Archives of Medical and Biomedical Research**, vol. 2(4), p.146-150, 2015.

SOFIC, E. et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. **Journal of Neural Transmission**, vol.74(3), p.199-205, 1988.

SONG, G., OUYANG, G., BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, vol. 9(1), p.59-71, Jan 2005.

STEVENS, M., OLTEAN, S. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. **Frontiers in Genetics**, vol. 10, p.804, 2019.

SVANDOVA, E.B. et al. Expression of Fas, FasL, caspase-8 and other factors of the extrinsic apoptotic pathway during the onset of interdigital tissue elimination. **Histochemistry and Cell Biology**, vol. 147(4), p. 497-510, 2017.

TAYLOR, R.C., CULLEN, S.P., MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol.9(3), p.231-41, Mar 2008.

URANGA, R.M., GIUSTO, N.M., SALVADOR, G.A. Iron-induced oxidative injury differentially regulates PI3K/Akt/GSK3beta pathway in synaptic endings from adult and aged rats. **Toxicological Sciences**, vol.111, n.2, p. 331-44, Oct 2009.

WANG, Y., KURO-O, M., SUN, Z.: Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. **Aging Cell**, vol.11(3), p.410-417, 2012.

NAKAO, VW. Efeitos da proteína Klotho na modulação de processos inflamatórios em células da glia frente ao estímulo pró-inflamatório LPS. 2019.72 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: organelle specificity. **Journal of Biology Chemistry**, vol. 248, 1973.

WILLMORE, L.J., RUBIN, J.J. The effect of tocopherol and dimethyl sulfoxide on focal edema and lipid peroxidation induced by isocortical injection of ferrous chloride. **Brain Research**, vol.296(2), p.389-392, Apr 1984.

WRIGHT, J.D. et al. Modeled structural basis for the recognition of  $\alpha$ 2-3-sialyllactose by soluble Klotho. **The FASEB Journal**, 2017.

YANG, J.Y., HUNG, M.C. Deciphering the role of forkhead transcription factors in cancer therapy. **Current Drug Targets**, vol.12(9), p.1284-1290, Aug 2011.

YAMAMOTO, M. et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. **Journal of Biological Chemistry**, vol.280, 2005.

YOKOYAMA, J.S., et al. Variation in longevity gene KLOTHO is associated with greater cortical volumes. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, vol. 2, p.215-230, 2015.

YOUNG, I.S., WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, vol.54(3), p.176-86, Mar 2001.

YOULE, R.J., STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 9, p.47–59, 2008.

YUAN, J., YANKNER, B.A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, vol.407(6805), p. 802–809, 2000.

XU, L., LEE, J.E., GIFFARD, R.G. Overexpression of bcl-2, bcl-XL or hsp70 in murine cortical astrocytes reduces injury of co-cultured neurons. **Neuroscience**, vol. 277, p.193–197, 1999.

XU Y., SUN, Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. **Endocrinology Reviews**, vol. 36(2), p.174-193, Apr 2015.

ZELDICH, E. et al. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. **Journal Biological Chemistry**, p.24700-15, 2014.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 4350965, 2016.

ZHANG, L. et al. Excessive apoptosis and ROS induced by ethionine affect neural cell viability and differentiation. **Acta Biochimica Biophysica Sinica**, vol.52(10), p.1156-1165, Oct 2020.

ZHANG, X.D., GILLESPIE, S.K., HERSEY, P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. **Molecular Cancer Therapy**, vol.3(2), p.187-97, Feb 2004.

ZHANG, Y. et al. Dividing roles of prion protein in staurosporine-mediated apoptosis. **Biochemical Biophysical Research Communications**, vol. 349(2), p.759-68, Oct 2006.

ZHAO, L. et al. Staurosporine Induces Platelet Apoptosis Through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. **Clinical Laboratory**, vol.61(7), p. 717-726, 2015.

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