VINICIUS WATANABE NAKAO

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

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

São Paulo
2019

VINICIUS WATANABE NAKAO

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

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nakao, Vinicius Watanabe
Efeitos da Proteína Klotho na Modulação de Processos Inflamatórios em Células da Glia frente ao Estímulo Pró-Inflamatório LPS / Vinicius Watanabe Nakao; orientador Cristoforo Scavone. -- São Paulo, 2019.
72 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Klotho. 2. Neuroinflamação. 3. Glia. 4. LPS. 5. Neurônio. I. Scavone, Cristoforo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Vinicius Watanabe Nakao

Título da Dissertação: Efeitos da Proteína Klotho na Modulação de Processos Inflamatórios em Células da Glia frente ao Estímulo Pró-Inflamatório LPS

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o candidato:

( ) Aprovado ( ) Reprovado

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Efeitos da proteína Klotho na modulação entre processos autofágicos e inflamatórios em neurônios, astrócitos e microglia de camundongos frente ao estímulo pró-inflamatório LPS***", registrado sob o protocolo nº ***12/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***18/03/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Cristóforo Scavone***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Thaís Neves Sala (Pós-graduando), Elisa Kawamoto (Pesquisador colaborador), Diana Andreotti (Técnico de laboratório), Larissa Lima (Técnico de laboratório)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Effects of Klotho on the balance between autophagic and inflammatory processes in neurons, astrocytes and microglia during pro inflammatory signal LPS***", protocol nº ***12/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***3/18/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Cristóforo Scavone***
- Team members: *Thaís Neves Sala (Graduate Student), Elisa Kawamoto (Colaborator Researcher), Diana Andreotti (Laboratory Technician), Larissa Lima (Laboratory Technician)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57bl/6*	*Macho/Male*	*8 meses/months*	*100*
	C57bl/6	*Fêmea/female*	*16-17 dias/days*	*100*
	C57bl/6	*Macho/Male*	*3 meses/months*	*10*
	C57bl/6	*Fêmea/female*	*3 meses/months*	*20*
	C57bl/6	*Macho/Male*	*2-4 dias/days*	*100*

São Paulo, 23 de março de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Secretário CEUA-ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.144.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **12/2016/CEUA**, válido até 18/03/2020, e por solicitação do Prof. Dr. **Cristoforo Scavone,** do Departamento de Farmacologia, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Vinicius Watanabe Nakao** ao Projeto de Pesquisa "***Efeitos da proteína Klotho na modulação entre processos autofágicos e inflamatórios em neurônios, astrócitos e microglia de camundongos frente ao estímulo pró-inflamatório LPS***", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 01 de agosto de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.155.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **012/2016/CEUA**, de 18/03/2016, relativo ao projeto intitulado "***Efeitos da proteína Klotho na modulação entre processos autofágicos e inflamatórios em neurônios, astrócitos e micróglia de camundongos frente ao estimulo pró-inflamatório LPS***", de responsabilidade do Prof. Dr. **Cristoforo Scavone**, do Departamento de Farmacologia, aprovo as seguintes inclusões para realizar culturas de células mistas de neurônio e glia a partir de ratos Wistar.

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Rattus norvegicus	Wistar	Macho / Fêmea	Neonatos de 0-5 dias	200

São Paulo, 22 de agosto de 2017

Luciane V. Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Aos meus pais, meus maiores exemplos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, por ter me aceito como seu aluno e pela confiança e suporte dado durante esse período.

Ao Dr. Caio Henrique Yokoyama Mazucanti, que foi fundamental no início do projeto e me ajudou mesmo estando distante.

À Prof. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe, com quem iniciei a trajetória nesse grupo como aluno de Iniciação Cientifica e tem me ajudado até hoje.

Ao João Victor, que contribuiu muito para minha formação acadêmica durante a Iniciação Cientifica.

Aos colegas do laboratório por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e que tornaram essa jornada mais tranquila.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Rosana Watanabe Nakao e Carlos Roberto Nakao, sem eles não seria quem sou, nem poderia estar onde estou.

Aos meus amigos, por todo apoio e amizade.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, em especial à Mônica, pela paciência e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À todos que de alguma forma contribuíram e participaram desta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"It is not the mountain we conquer, but ourselves"

Edmund Hillary

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isoformas da Klotho. 21
Figura 2. Imagens representativas da cultura primária de glia de rato submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de NeuN.. 36
Figura 3. Imagens representativas da cultura primária de glia de rato submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de GFAP e Iba-1. 36
Figura 4. Efeito do tratamento da proteína Klotho por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da glia de ratos. 37
Figura 5. Efeito do tratamento do LPS por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da glia de ratos.....38
Figura 6. Efeito do pré-tratamento da Klotho sobre as alterações causadas pelo LPS nos ensaios de viabilidade e citotoxicidade em células da glia de ratos. 39
Figura 7. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis nucleares de p65. 40
Figura 8. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis nucleares de p65. 41
Figura 9. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis de TNF-α.....42
Figura 10. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis de IL-1β, IL-6, IL-18 e IFN-γ.....43
Figura 11. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da ERK em células da glia de rato por Western Blotting. 44
Figura 12. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da AKT em células da glia de rato Western Blotting. 45
Figura 13. Efeito do tratamento da proteína Klotho por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da de glia de camundongo.....46
Figura 14. Efeito do tratamento do LPS por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da de glia de camundongo. 47
Figura 15. Efeito do tratamento de diferentes concentrações da proteína Klotho sobre a secreção de TNF-α induzida pelo LPS em células da glia de camundongo.49

Figura 16. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de camundongo nos níveis de IL-1β, IL-6 e IFN-γ. 51
Figura 17. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da ERK em células da glia de camundongo por Western Blotting.....52
Figura 18. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da AKT em células da glia de camundongo Western Blotting. 52
Figura 19. Imagens representativas da cultura primária embrionária de neurônios de camundongos submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de Pan-Neuronal.....54
Figura 20. Imagens representativas da cultura primária embrionária de neurônios de camundongos submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de NeuN. 54
Figura 21. Esquema do meio condicionado e do ensaio de citotoxicidade. 55
Figura 22. Efeito do MCG em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de neurônios de camundongos. 56
Figura 23. Efeito do MCG e do MCG-KL em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de neurônios de camundongos.....57
Figura 24. Efeito do MCG e do KL + MCG em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de neurônios de camundongos.....58
Figura 25. Efeito anti-inflamatório e neuroprotetor da proteína Klotho. 62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Neuroinflamação 16
1.2 LPS e o modelo de neuroinflamação 18
1.3 Klotho 19
1.4 Klotho e a inflamação 23
2 JUSTIFICATIVA 25
3 OBJETIVO 26
4 MATERIAL E MÉTODOS 27
4.1 Comissão de Ética 27
4.2 Animais 27
4.3 Cultura primária de células da glia 27
4.3 Cultura Primária Embrionária de Neurônios 28
4.4 Tratamento da cultura primária de glia com Klotho e LPS 29
4.5 Ensaio de viabilidade celular: redução do formazan colorido (MTT) 30
4.6 Ensaio de citotoxicidade: liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) 30
4.7 Ensaio de imunofluorescência 30
4.8 Extração de proteínas citosólicas e nucleares 31
4.9 Determinação da Concentração de Proteínas 32
4.10 Ensaio de *Western Blotting* 32
4.11 Ensaio ligado a Enzimas (ELISA) 33
4.12 Ensaio de Multiplex 33
4.13 Análise de resultados 34
5 RESULTADOS 35
5.1 Cultura primária de células da glia de ratos 35
5.1.1 Caracterização da cultura primária de células da glia 35
5.1.2 Ensaio de viabilidade celular e citoxicidade: MTT e LDH 37
5.1.3 Translocação do p65 39
5.1.4 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias 42
5.1.5 Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na via de sinalização da AKT e da ERK 43
5.2 Cultura primária de células da glia de camundongos 45
5.2.1 Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade: MTT e LDH 46

5.2.2 Padronização de tempo e tratamento: dosagem de TNF-α 47
5.2.3 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias 50
5.2.4 Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na via de sinalização da AKT e da ERK 51
5.3 Cultura Primária Embrionária de Neurônios 53
5.3.1 Caracterização da cultura primária embrionária de neurônios 53
5.3.2 Efeitos do meio condicionado de células da glia na citotoxicidade em células neuronais 55
6 DISCUSSÃO 59
7 CONCLUSÃO 64
REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neuroinflamação

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 LPS e o modelo de neuroinflamação

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

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

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

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

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

1.3 Klotho

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

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

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

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

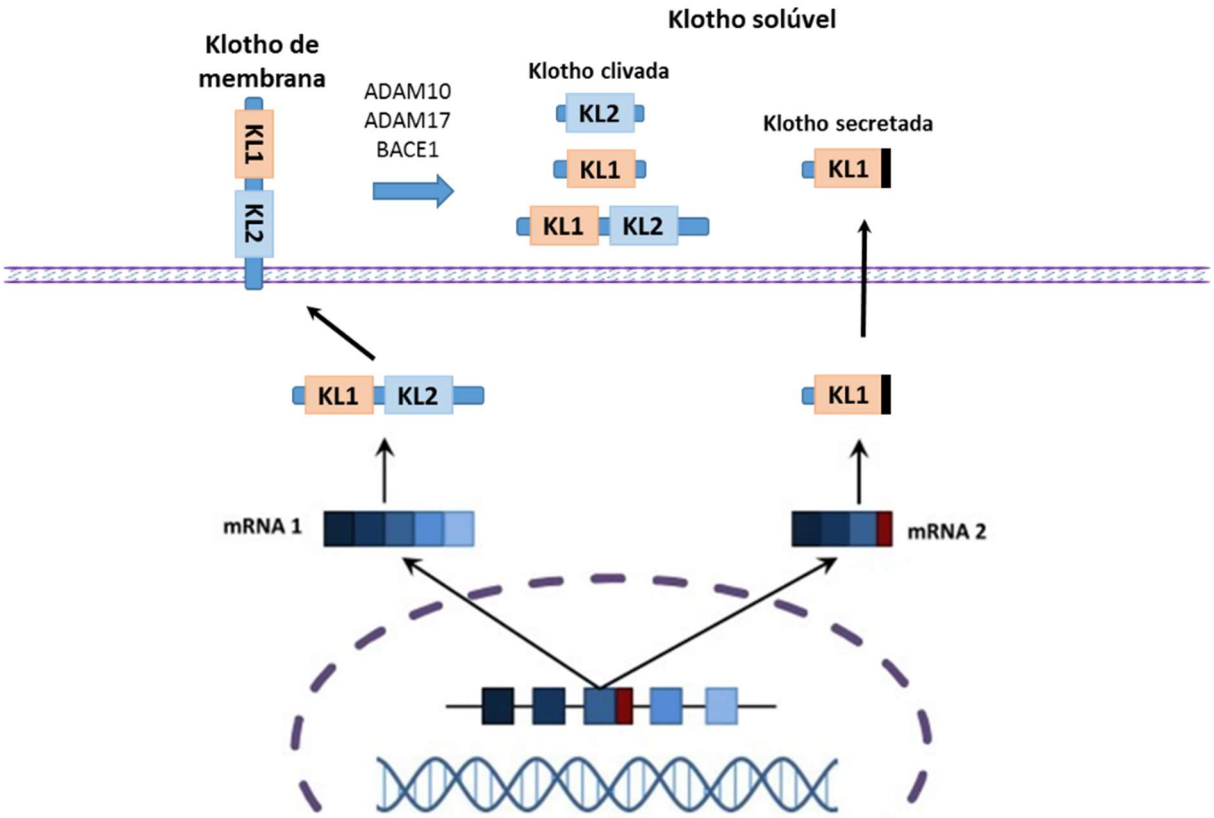


Figura 1. Isoformas da Klotho. A proteína klotho pode ser encontrada tanto na forma de membrana quanto na forma solúvel, a qual pode ser decorrente da clivagem da klotho de membrana pela ADAM 10, ADAM 17 e BACE1 ou de um *splicing* alternativo do RNA mensageiro. Fonte: Adaptado de Cararo-Lopes et al.,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

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

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

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

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

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

Já a forma solúvel da Klotho atua como um fator humoral exercendo uma ação pleiotrópica. Ela pode inibir as vias de sinalização da insulina/fator de crescimento similar à insulina tipo I (IGF-1), da Wnt e do fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF-β1) e esses efeitos estão relacionados com a atividade antienvelhecimento da Klotho (KUROSU, 2005; LIU et al., 2007; WOLF et al., 2008; DOI et al., 2011). No entanto, os mecanismos pelos quais a forma solúvel da Klotho inibe essas vias ainda não estão bem estabelecidos. Esta isoforma também possui atividade de sialidase, podendo inibir a internalização do canal de cálcio, receptor de potencial transitório vaniloide 5 (TRPV5), e o canal de potássio medular externo renal I (ROMK1) (CHA et al., 2008, 2009). Ainda, recentemente, foi demonstrado que a forma solúvel da Klotho também pode agir como cofator do FGF23 (CHEN et al., 2018).

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

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

1.4 Klotho e a inflamação

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

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

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

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

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

2 JUSTIFICATIVA

A inflamação está presente nas doenças e lesões que afetam o SNC, logo há um interesse em entender os mecanismos celulares e moleculares que regulam o início e a resolução da neuroinflamação. A microglia e os astróctios são células da imunidade inata residentes do cérebro e têm papel fundamental no processo inflamatório do SNC.

Já a Klotho é uma proteína endógena, capaz de apresentar uma ação anti-inflamatória e protetora em células renais através da inibição da ativação de NF-κB e a subsequente produção de citocinas inflamatórias em resposta ao estímulo de TNF-α. Entender o papel da Klotho nos processos neuroinflamatórios pode ser interessante para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, uma vez que estudos têm demonstrado um efeito neuroprotetor da Klotho em diversas condições em que há a presença da neuroinflamação, como o envelhecimento, modelos de doenças neurodegenerativas e a lesão cerebral isquêmica.

Dadas estas informações, compreender os efeitos e mecanismos de ação da Klotho nas células da glia mostram-se fundamentais.

3 OBJETIVO

Avaliar o papel da proteína Klotho no balanço dos processos inflamatórios frente a administração de LPS em células da glia pré-tratadas com Klotho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de Ética

O projeto passou por avaliação e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) – registrado sob o protocolo nº 12/2016 – e seguiu todas as normas descritas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Animais

Para as culturas primárias de glia foram utilizados os córtices encefálicos de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) ou camundongos C57BL/6 (*Mus musculus*) neonatos de ambos os sexos. Já para as culturas primárias neuronais foram utilizados os córtices encefálicos de embriões de camundongos C57BL/6 de ambos os sexos.

Os ratos Wistar utilizados foram obtidos do Biotério de Produção de Ratos do ICB-USP. Os camundongos C57BL/6 foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do ICB-USP.

Durante o período de permanência no Biotério, os animais tiveram acesso à água e a comida (ração para roedores – Nuvilab CR1®) *ad libitum*, foram mantidos sob temperatura constante (entre 22 ± 2 °C) e sob ciclo de iluminação controlado claro-escuro de doze horas (claro entre 7 – 19h). Os animais ficaram acondicionados em gaiolas plásticas de polietileno (16 cm de altura, 30 cm de largura e 38 cm de comprimento) forradas com maravalha e instaladas em microisoladores ventilados.

4.3 Cultura primária de células da glia

Para cada cultura foram utilizados de 4 a 6 córtices de ratos ou camundongos neonatos com até 3 dias de vida pós-natal. Os neonatos foram decapitados (eutanásia) com o auxílio de uma tesoura e a caixa craniana aberta para exposição do encéfalo. Após retirada do mesmo, esse foi depositado em solução de sais balanceada de Hanks (HBSS) (KCl 5,33 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, NaCl 137,93 mM, Na_2HPO_4 0,33 mM, glicose 5,55 mM, acrescida de 1% de penicilina e estreptomicina

(Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) – concentração de atividade final equivalente a 100 U/mL) em uma placa de Petri.

Após dissecção do córtex, a meninge foi retirada com o auxílio de pinças sob lupa cirúrgica (modelo Stemi 2000, Zeiss) e a estrutura foi transferida para outra placa de Petri contendo HHBS suficiente para mantê-las sempre submersas onde permaneceu, no gelo, até a dissecação de todos os neonatos.

No fluxo laminar, os córtices livres de meninges foram cortados em pequenos pedaços e então transferidos para um tubo falcon contendo 10 mL de solução de tripsina-EDTA 0,05% (0,5 g de tripsina/L, 0,2 g de EDTA 4Na $2H_2O$/L (Vitrocell)), e mantidos por 20 minutos em incubadora a 37ºC.

Após os 20 minutos, foi feita a transferência do material cortical para outro tubo falcon contendo 10 mL de meio de cultivo: DMEM (Vitrocell) (acrescido de 3,5 g de glicose e 3,7 g de $NaHCO_3$, penicilina e estreptomicina (100 U/mL)) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) para inativação da tripsina.

Para a dissociação mecânica do tecido, foram realizados diversos ciclos de aspiração/dispensação com uma pipeta Pasteur e, posteriormente, com uma ponteira P1000 até a digestão completa do tecido, evitando a formação de bolhas. Nesse momento, a solução homogênea foi vertida sobre um *cell strainer* de 70 µm. Foi diluída uma alíquota em *Trypan Blue Stain* (ThermoFisher Scientific) e feita a contagem de células na câmara de Neubauer. As células foram então plaqueadas em frascos de cultivo, mantidas em incubadora a 37 ºC, 5% de CO_2, em meio de cultivo DMEM com 10% de SFB. No dia seguinte, foi realizado a troca completa do meio e então a troca foi feita a cada 7 dias. As células foram cultivadas por volta de 15 dias, quando alcançam aproximadamente 90% de confluência.

4.3 Cultura Primária Embrionária de Neurônios

Para cada cultura foram utilizados de 6 a 8 córtices de embriões de camundongos (dia de desenvolvimento embrionário entre 15 e 16). Para obtenção dos embriões, foram feitos casais ou trios que permaneceram juntos por duas noites e então foram separados.

No dia anterior à realização da cultura, as placas de cultura foram pré-tratadas com polietilenoimina *overnight*. Antes de iniciar o experimento as placas foram lavadas 3x com H_2O estéril.

Fêmeas com 15-16 dias de gravidez foram anestesiadas com isoflurano e feita cesariana para retirada dos filhotes. Os embriões foram transferidos para uma placa de Petri contendo solução HBSS. Foi realizada a decapitação do embrião com auxílio de uma tesoura e aberta a caixa craniana. O encéfalo foi colocado em uma outra placa de Petri com HBSS, os hemisférios cerebrais abertos e, com auxílio de pinças sob lupa cirúrgica, as estruturas dissecadas. Após dissecção do córtex, a meninge foi retirada e a estrutura foi transferida para outra placa de Petri contendo HHBS suficiente para mantê-las sempre submersas onde permaneceu, no gelo, até a dissecação de todos os embriões.

Os córtices dissecados foram cortados em pequenos pedaços e foram transferidos para um tubo falcon contendo 10 mL de solução de tripsina-EDTA 0,05% e mantidos por 20 minutos em incubadora a 37ºC. Após os 20 minutos, foi feita a transferência do material cortical para outro tubo falcon contendo 10 mL de solução HBSS com 10% SFB, na qual foi mantido por 1 min para inativação da tripsina.

O tecido foi dissociado em Neurobasal (ThermoFisher Scientific), acrescido de penicilina e estreptomicina (100 U/mL) e DNAse I (Sigma-Aldrich St Louis MO, USA) na concentração de 10 Kunitz/mL, por trituração mecânica por meio de diversos ciclos de aspiração/dispensação com uma ponteira P1000, evitando ao máximo a formação de bolhas. A solução homogênea foi vertida sobre um *cell strainer* de 70 µm. As células foram centrifugadas a 1000 g por 5 min e ressuspendidas em meio de cultivo Neurobasal suplementado com B27 (ThermoFisher Scientific), 2 mM de glutamina e penicilina e estreptomicina (100 U/mL). As células foram contadas e plaqueadas. Os neurônios foram mantidos em incubadora a 37 ºC, 5% de CO_2 por uma semana e foi feita troca de 50% do meio de cultura 3 dias após o plaqueamento.

4.4 Tratamento da cultura primária de glia com Klotho e LPS

O meio foi trocado por DMEM sem soro e foram testadas diferentes concentrações da forma solúvel da proteína Klotho recombinante (aa 35-982) obtida da R&D Systems (1819-KL-050, Minnesota, MN, EUA) e LPS (de *Escherichia coli* serotipo O111:B4, L2630, Sigma) para a escolha da concentração de cada molécula.

Após determinar a concentração a ser utilizada, o tratamento foi feito e as células e o sobrenadante foram coletados e estocados no freezer -80ºC para uso posterior.

4.5 Ensaio de viabilidade celular: redução do formazan colorido (MTT)

O ensaio de MTT foi realizado como descrito por Mosmann (MOSMANN, 1983) e Hansen (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989). Este método é baseado na habilidade de células viáveis de converter o sal tetrazolium (MTT) para formazan colorido. A viabilidade das células foi determinada pela adição de MTT (12 mM) na cultura celular. Após 3 horas de incubação a 37ºC, os cristais escuros formados foram dissolvidos adicionando DMSO, e a absorbância (abs) medida por um leitor de microplaca (Epoch - BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

4.6 Ensaio de citotoxicidade: liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A citotoxicidade foi avaliada pela liberação de LDH. A atividade de LDH em sobrenadantes de cultura celular foi observada através de um teste enzimático descrito anteriormente (DECKER; LOHMANN-MATTHES, 1988). Foi utilizado um kit de detecção citotóxica (Promega, Madison, WI, EUA) e a quantidade de LDH liberada pelas células foi detectada por um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490 nm.

4.7 Ensaio de imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência foram plaqueadas $1x10^5$ células por poço sobre lamínula circular (13 mm de diâmetro) em placa de 24 poços. As células foram lavadas com PBS e então fixadas com metanol 100% gelado por 10 min a temperatura de -20 °C. Após lavagem com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM), as células foram incubadas com solução de bloqueio (5% de albumina de soro bovino (BSA) + 0,05% Triton X-100 em PBS) por 2 horas ou *overnight*. Segue-se incubação *overnight* com anticorpo primário diluído na solução de bloqueio. Foram utilizados os anticorpos contra GFAP, Iba-1, NeuN, Pan Neuronal e p65 (tabela 1). No dia seguinte, as células foram lavadas 4x com solução de bloqueio e foram incubadas durante 2 horas com anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 594 ou 488 (ThermoFisher Scientific) diluídos na solução de bloqueio na concentração de

1:1000. Em seguida, as células foram lavadas 4x com PBS e incubadas com DAPI (ThermoFisher Scientific) na concentração de 1:50.000 (diluído em Triton X-100 0,05% em PBS) por 15 minutos. As células foram novamente lavadas 3x com PBS e montadas na lâmina e seladas com esmalte incolor.

As células foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA) máquina Nikon Digital Camera DXM 1200C (Nikon Instrument Inc.) e o software de imagem NIS-Elements Advanced Research 2,30 2006 (Nikon Instrument Inc.). Foram capturados 5 campos representativos de cada lamínula, todos em objetiva de 20X, em cada filtro de interesse.

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados nos ensaios de Imunofluorescência.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Fabricante	Código
GFAP	Camundongo	1:300	Cell Signaling	#3670
IBA-1	Cabra	1:100	Abcam	ab5076
NeuN	Coelho	1:50	Cell Signaling	#24307
Pan Neuronal	Camundongo	1:100	Merck Millipore	MAB2300
p65	Coelho	1:100	Abcam	ab7970

4.8 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

O método utilizado foi descrito por Rong e Baudry (RONG; BAUDRY, 1996). As células foram homogenizadas em 100 µL de tampão de lise (HEPES 10 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,5 mM; antipaína 2,5 µg/mL; leupeptina 2,5 µg/mL; NaF 30 mM, pirofosfato de sódio 20 mM; β-glicerofosfato 5 mM; EDTA 0,1 mM) e incubadas em gelo durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 2,5 µL de NP-40 10% as amostras, as quais foram vortexadas vigorosamente por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 30 segundos a 4ºC e o sobrenadante foi coletado (extrato citosólico). O *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de tampão de extração (HEPES 20 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; glicerol 25%; PMSF 0,5 mM; antipaína 2,5 µg/mL; leupeptina 2,5 µg/mL; NaF 30 mM, pirofosfato de sódio 20 mM; β-glicerofosfato 5 mM) e incubado por 20 minutos a 4 °C sob agitação. O extrato foi centrifugado à 13000 g por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi recolhido (extrato nuclear). As concentrações de proteínas dos extratos citosólico e nuclear foram determinadas, segundo método descrito abaixo.

4.9 Determinação da Concentração de Proteínas

A dosagem da concentração de proteínas foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o reagente da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

4.10 Ensaio de *Western Blotting*

O ensaio foi baseado no método descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Após determinação da concentração de proteínas nas amostras, as proteínas foram ajustadas para as concentrações de 0,25 µg/µL para as amostras nucleares e 1,0 µg/µL para as amostras citosólicas com o tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM; SDS 4%; glicerol 20% v/v; DTT 200 mM; azul de bromofenol 0,02%; pH 6,8) e esquentadas a 70 ºC por 10 minutos.

A corrida foi realizada em gel de SDS-poliacrilamida 10% [acrilamida/bisacrilamida (5:1); 10% de SDS] a 90 V por aproximadamente 3 h, utilizando um tampão de corrida (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%). Ao final da corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories) por eletroforese por 150 min a 400 mA, utilizando tampão de transferência (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Etanol 20%).

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução vermelho de Ponceau (Ponceau-S 0,5%, Ácido tricloro acético 5%), e então as membranas foram deixadas *overnight* numa solução contendo BSA 5% em TTBS (Tris-base 100 mM; NaCl 0,9%; Tween 20 0,05%).

Após esta etapa, foram feitas as incubações com o anticorpo primário (TTBS, BSA 1%) *overnight* a 4 ºC. Foram utilizados anticorpos específicos para p-AKT T308, AKT, p65, ERK, p-ERK, GFAP, Actina (tabela 2). Após incubação, as membranas foram lavadas 5x por 5 minutos cada com TTBS e incubadas com o respectivo anticorpo secundário (1:1000. TTBS, BSA 1%) por 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas 5x por 5 minutos cada com TTBS.

A revelação das membranas foi feita por meio de um kit de quimioluminescência Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate ou

Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA) e analisadas no aparelho G-Box (Synoptics Group, Cambridge, Inglaterra).

Tabela 2 - Lista de anticorpos primários utilizados nos ensaios de *Western Blotting*.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Fabricante	Código
p-AKT T308	Coelho	1:1000	Cell Signaling	#4056
AKT	Coelho	1:1000	Cell Signaling	#4685
p-ERK 1/2	Coelho	1:1000	Cell Signaling	#9101
ERK 1/2	Coelho	1:1000	Cell Signaling	#4695
p65	Coelho	1:500	Abcam	ab7970
GFAP	Camundongo	1:1000	Cell Signaling	#3670
Actina	Camundongo	1:10000	Cell Signaling	#58169

4.11 Ensaio ligado a Enzimas (ELISA)

A dosagem das citocinas TNF-α, IL-6, IL-1β e IFN-γ foi determinada por ensaio de ELISA por meio de kits da R&D Systems (TNF-α (DY410); IL-6 (DY406); IL-1β (DY401); IFN-γ (DY485)). O processamento das amostras, bem como a realização do kit e análise dos resultados foram realizados conforme o protocolo do fabricante. Resumidamente, a microplaca de 96 poços foi sensibilizada com 100 µL do anticorpo de captura contra a citocina analisada *overnight* a 4 ºC. Posteriormente, os poços foram lavados com tampão de lavagem. Em seguida, a microplaca foi incubada com solução de bloqueio (BSA 1% em PBS) por 1 hora. Após a etapa de bloqueio, os poços foram lavados com tampão de lavagem e 100 µL da curva padrão e das amostras foram adicionados aos micropoços e a placa foi incubada por 2 horas. A seguir, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem e foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção e a placa foi incubada por 2 horas. Novamente, os poços foram lavados e a estreptavidina-HRP foi adicionada à placa e mantida durante 30 minutos. Repetiu-se a etapa de lavagem e, posteriormente, os poços foram incubados com *Substrate Solution* durante 20 minutos. A reação foi interrompida com a *Stop Solution*. A absorbância foi lida em comprimento de onda de 450 nm. A correlação com a curva-padrão forneceu a concentração de citocina presente nas amostras.

4.12 Ensaio de Multiplex

O imunoensaio de Multiplex foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante Merk Millipore (Milliplex MAP for Luminex xMAP Technology,

#RECYTMAG-65K) para as seguintes citocinas: IL-1β, IL-6, IL-18, INF-γ. Foram adicionados 200 µL/poço do tampão de ensaio na placa, e posteriormente levemente agitada por 10 min. O tampão residual foi removido e foram adicionados 25 µL/poço da curva-padrão, controle e as amostras. Em seguida, foram adicionados 25 µL do Tampão de Ensaio aos poços das amostras e 25 µL de meio sem soro aos poços da curva-padrão e dos controles. Foram adicionados 25 µL/poço da solução contendo beads magnéticas e a placa foi e incubada sob agitação por 2h. Posteriormente, o conteúdo das placas foi removido e os poços foram lavados. O anticorpo de detecção foi adicionado aos poços no volume de 25 µL/poço e a placa foi incubada sob agitação por 1h. A solução de estreptavidina-ficoeritrina foi adicionada aos poços contendo o anticorpo de detecção e a placa foi novamente incubada sob agitação por 30 min. Repetiu-se a etapa de lavagem. As beads foram ressuspendidas em 125 µL de sheath fluid sob agitação da placa por 5 min. A Intensidade Média de Fluorescência (IMF) foi aferida em equipamento Luminex® 200™ (Merck Millipore), utilizando-se o software xPONENT (Merck Millipore). A correlação com a curva-padrão forneceu a quantidade dos analitos presente nas amostras.

4.13 Análise de resultados

Os dados decorrentes do ensaio de imunofluorescência e *western blotting* foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa ImageJ (National Institute of Health, EUA). Os dados de MTT, LDH, ELISA, Multiplex, imunofluorescência, *western blotting* receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste *Tukey*. Para todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p \leq 0,05$. Todos os gráficos foram representados como a média dos valores ± o erro padrão da média (E.P.M).

5 RESULTADOS

5.1 Cultura primária de células da glia de ratos

5.1.1 Caracterização da cultura primária de células da glia

A primeira etapa dos experimentos foi realizar a caracterização da cultura primária das células da glia de córtex de ratos para determinar a proporção de astrócitos e micróglia, assim como verificar a presença de outros tipos de células, como neurônios. Para isso, foram feitos ensaios de imunofluorescência.

Para avaliar a presença de neurônios foi utilizado o marcador de neurônio, NeuN. Como pode ser observado na figura 2 não há presença de neurônios na cultura, o que já era esperado, uma vez que as células são cultivadas em meio sem suplemento para a sobrevivência desse tipo de célula.

Para avaliar a proporção de astrócitos e micróglia foram utilizados os marcadores anti-GFAP e anti-Iba-1, respectivamente (Figura 3). A cultura possui aproxidamente 60% de astrocitos e 30% de micróglia. 10% corresponde a outros tipos de células (sem marcação par GFAP e Iba-1) que podem ser oligodendrócitos ou fibroblastos.

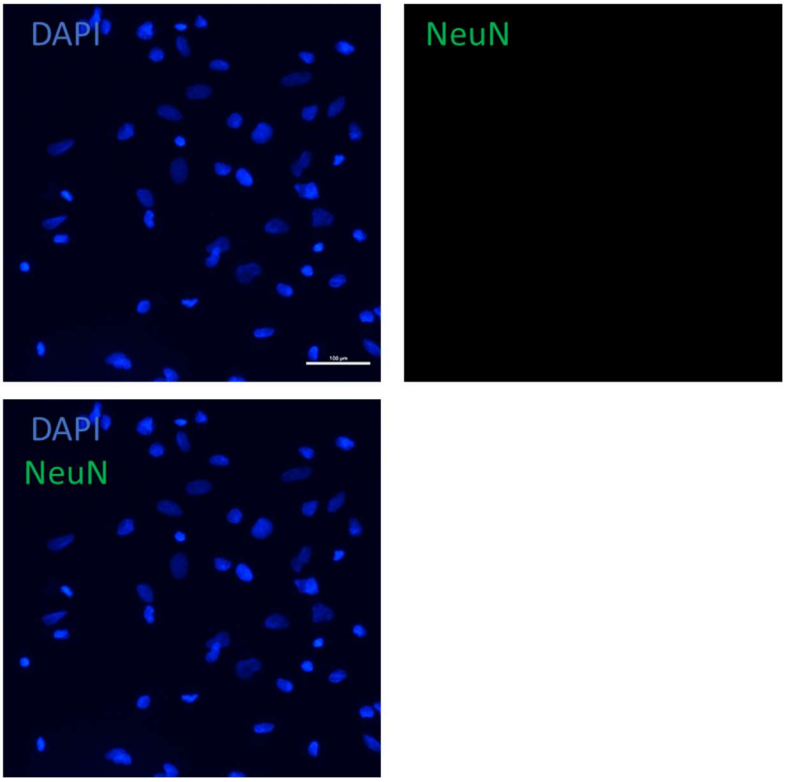


Figura 2. Imagens representativas da cultura primária de glia de rato submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de NeuN. Marcação para a proteína NeuN (verde) e núcleos foram corados com DAPI (azul). Fotos em aumento de 20X.

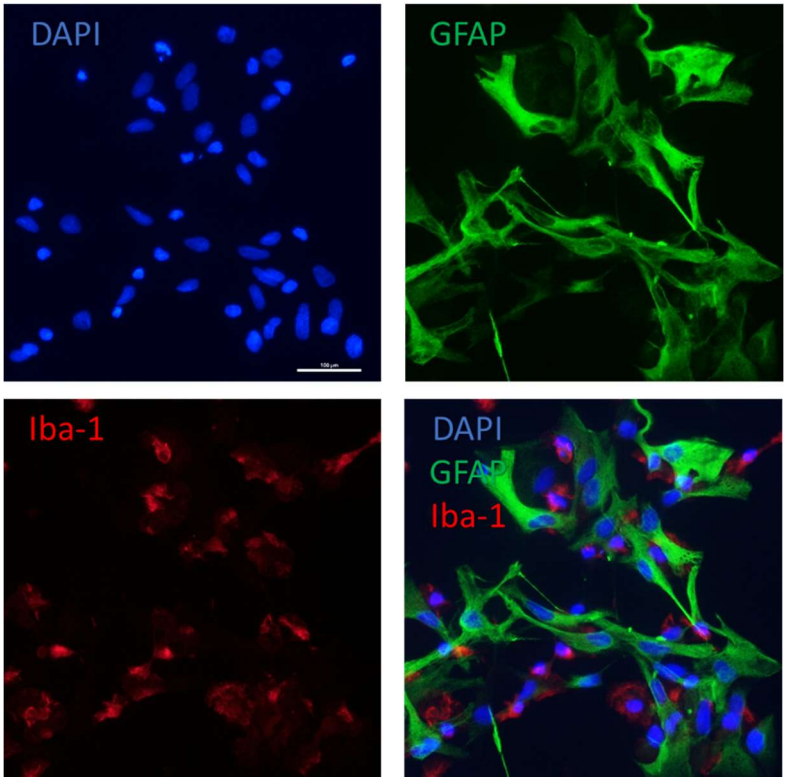


Figura 3. Imagens representativas da cultura primária de glia de rato submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de GFAP e Iba-1. Marcação para a proteína GFAP (verde), Iba-1 (vermelho) e núcleos foram corados com DAPI (azul). Fotos em aumento de 20X.

5.1.2 Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade: MTT e LDH

Os ensaios de MTT e LDH foram realizados para descobrir quais concentrações de Klotho e de LPS poderiam ser utilizadas sem que houvesse alterações significativas na viabilidade celular e na citotoxicidade.

Foram testadas diferentes concentrações de Klotho entre 0,01 nM e 10 nM por 24 horas. Nenhuma concentração de Klotho alterou a viabilidade celular ou apresentou toxicidade às células da glia tanto no ensaio de MTT como no de LDH (Figura 4). Logo, qualquer concentração poderia ser utilizada no estudo sem que houvesse alterações na viabilidade e na citotoxicidade.

Foi escolhida a concentração de 500 pM de Klotho para os próximos ensaios, uma vez que concentrações semelhantes já se mostraram efetivas em trabalhos publicados com cultura de células (MAEKAWA et al., 2009; ZHAO et al., 2011; MAZUCANTI, 2018).

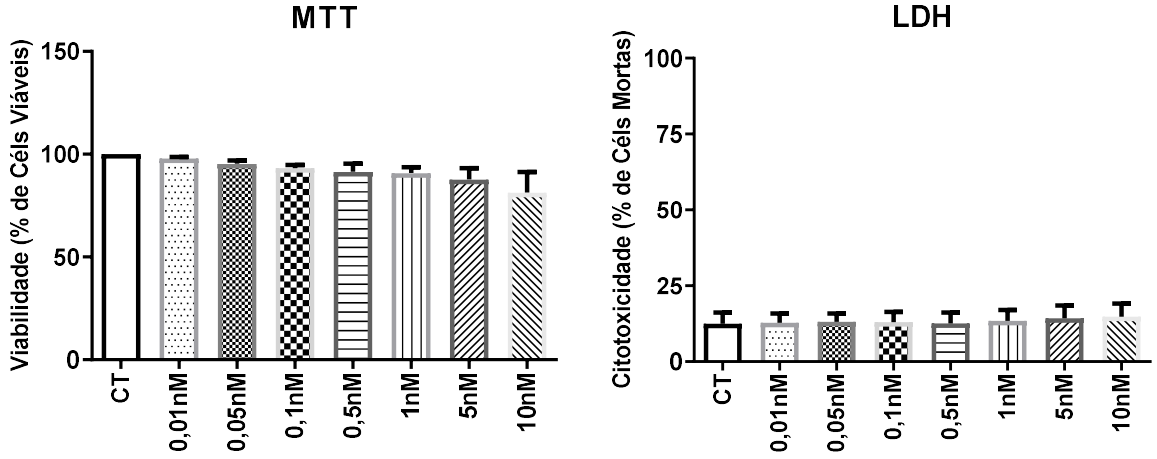


Figura 4. Efeito do tratamento da proteína Klotho por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da glia de ratos. A cultura primária de células da glia foi submetida ao tratamento de 24 horas com Klotho em diferentes concentrações. A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas pelos ensaios de MTT e de LDH, respectivamente. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

Em relação ao LPS, foram testadas concentrações entre 0,01 a 100 µg/mL por 24 horas. No ensaio do MTT apenas a concentração de 100 µg/mL diminuiu de forma significativa a viabilidade das células com relação ao controle, já no ensaio de LDH tanto a concentração de 10 como a de 100 µg/mL apresentaram toxicidade às células da glia (Figura 5). Como a concentração de 100 ng/mL de LPS é muito utilizada na literatura em cultura de células da glia (MINOGUE; BARRETT; LYNCH, 2012; CHEN

et al., 2015; CROWLEY et al., 2015), essa concentração foi escolhida para os próximos experimentos.

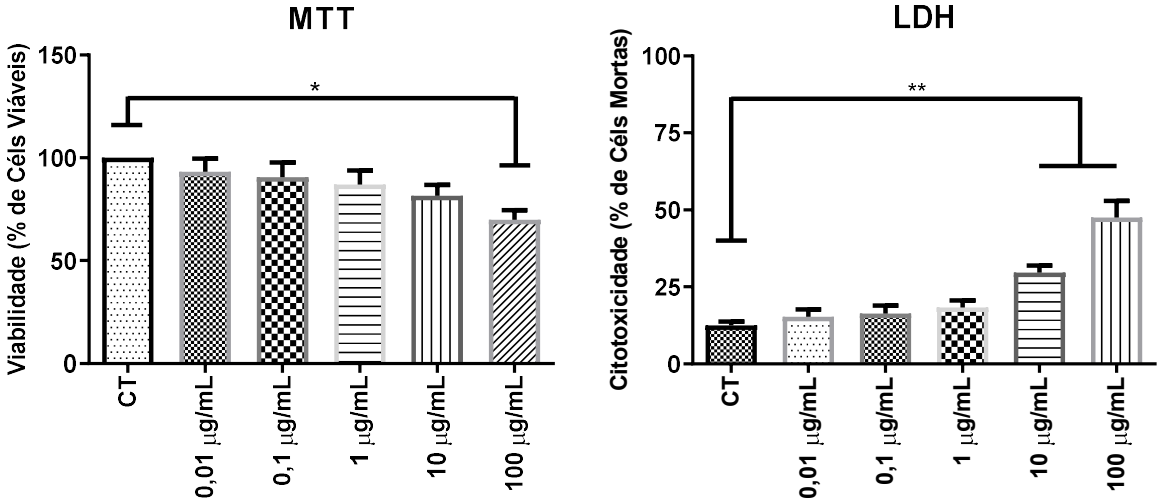


Figura 5. Efeito do tratamento do LPS por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da glia de ratos. A cultura primária de células da glia foi submetida ao tratamento de 24 horas com LPS em diferentes concentrações. A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas pelos ensaios de MTT e de LDH, respectivamente. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *$p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

Posteriormente foi avaliado se o pré-tratamento com 500 pM de Klotho por 24 horas poderia reverter as alterações causadas pelo tratamento com LPS por 24 horas nas concentrações de 10 e de 100 µg/mL. O LPS foi capaz de diminuir a viabilidade celular e causar toxicidade tanto nas concentrações de 10 como na de 100 µg/mL, porém, o pré-tratamento com a proteína Klotho não reverteu os efeitos do LPS (Figura 6).

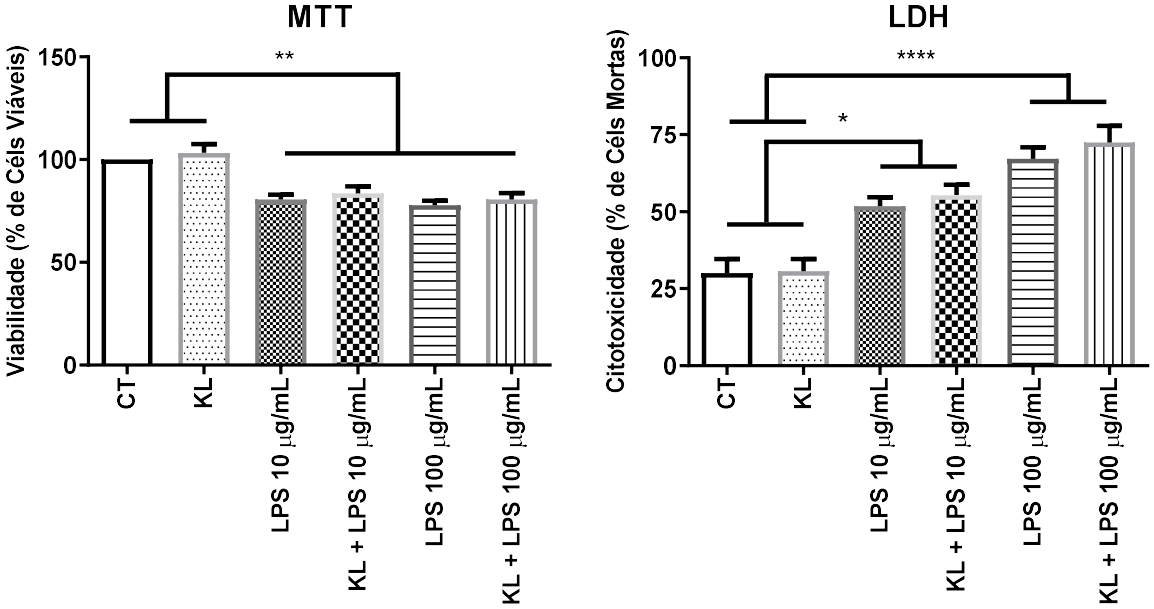


Figura 6. Efeito do pré-tratamento da Klotho sobre as alterações causadas pelo LPS nos ensaios de viabilidade e citotoxicidade em células da glia de ratos. A cultura primária de células da glia foi submetida a um pré-tratamento com 500 pM de Klotho por 24 horas e, posteriormente, com LPS por mais 24 horas nas concentrações de 10 ou 100 µg/mL, A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas pelos ensaios de MTT e de LDH, respectivamente. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *$p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.1.3 Translocação do p65

Após definir a concentração de Klotho e a de LPS, foi avaliado a translocação do p65, subunidade do fator de transcrição NF-κB, para o núcleo por meio dos ensaios de *Western Blotting* e de imunofluorescência. As células da glia foram pré-tratadas com Klotho 500 pM por 24 horas, em seguida, foi realizado o estímulo inflamatório com o LPS 100 ng/mL por 1 hora. Como pode ser observado nas figuras 7 e 8, o LPS aumentou a translocação do p65 para o núcleo quando comparado ao grupo controle, entretanto, o pré-tratamento com a Klotho não foi capaz de reduzir o efeito causado pelo LPS.

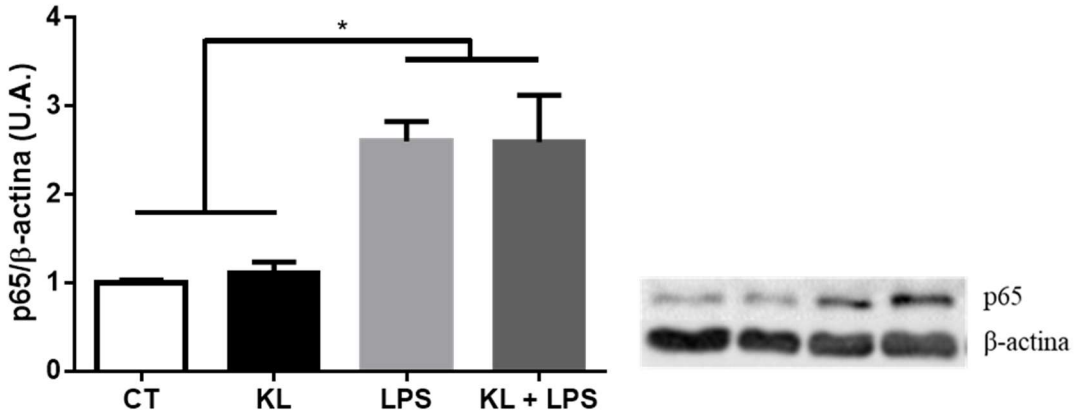


Figura 7. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis nucleares de p65. Quantificação do p65 nuclear por *Western Blotting*. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 500 pM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 hora. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *$p < 0,05$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

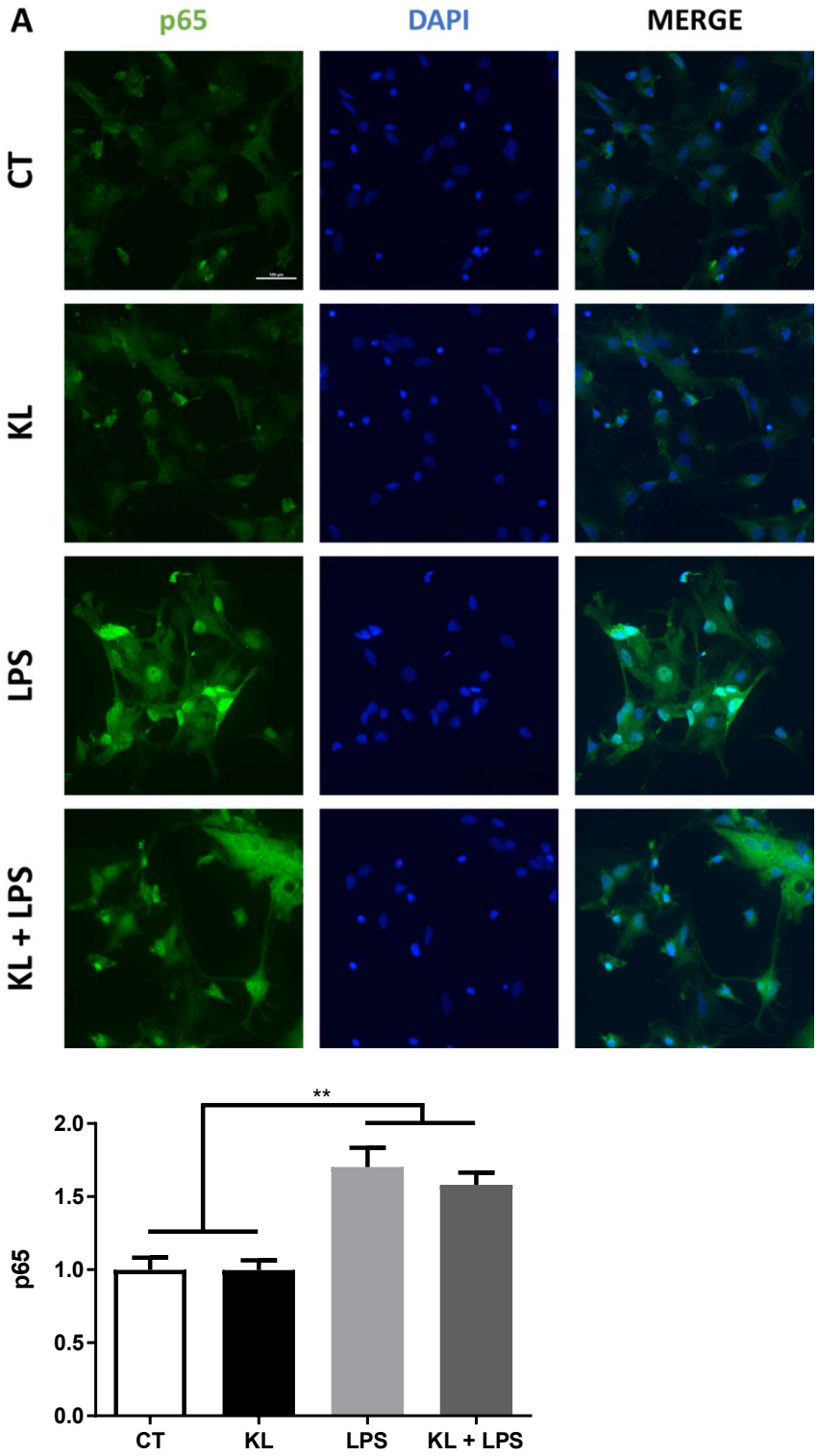


Figura 8. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis nucleares de p65. Quantificação do p65 nuclear por imunofluorescência. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 500 pM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 hora. (A) Imagens representativas da cultura primária de glia submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de p65 (verde), núcleos foram corados com DAPI (azul). (B) Quantificação da média da intensidade nuclear. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, **$p < 0,01$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 2 experimentos independentes.

5.1.4 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias

Embora o LPS tenha aumentado a translocação do p65 para o núcleo, o pré-tratamento com a Klotho não foi capaz de reduzir o efeito causado pelo LPS. Mesmo assim, foi avaliado os efeitos do LPS e da Klotho nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, pois a Klotho poderia modular os efeitos do LPS por meio de outro fator de transcrição. Como esperado, o LPS induziu um aumento de TNF-α (1 hora após o estímulo) (Figura 9) e de IL-1β, IL-6, IL-18 (4 horas após o estímulo) (figura 10) quando comparado ao grupo controle. Porém, o pré-tratamento com 500 pM de Klotho não foi capaz de reverter os efeitos causado pelo LPS (Figura 9 e 10).

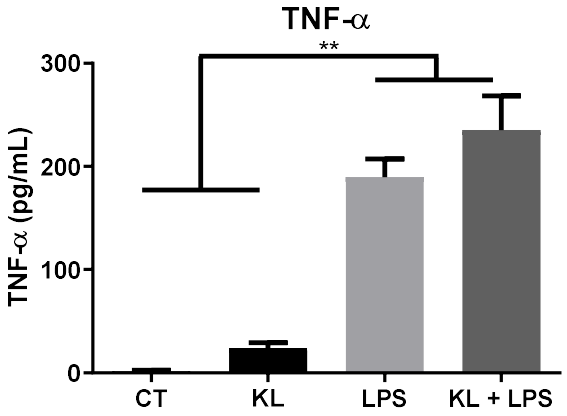


Figura 9. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis de TNF-α. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 500 pM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 hora. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, **$p < 0,01$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

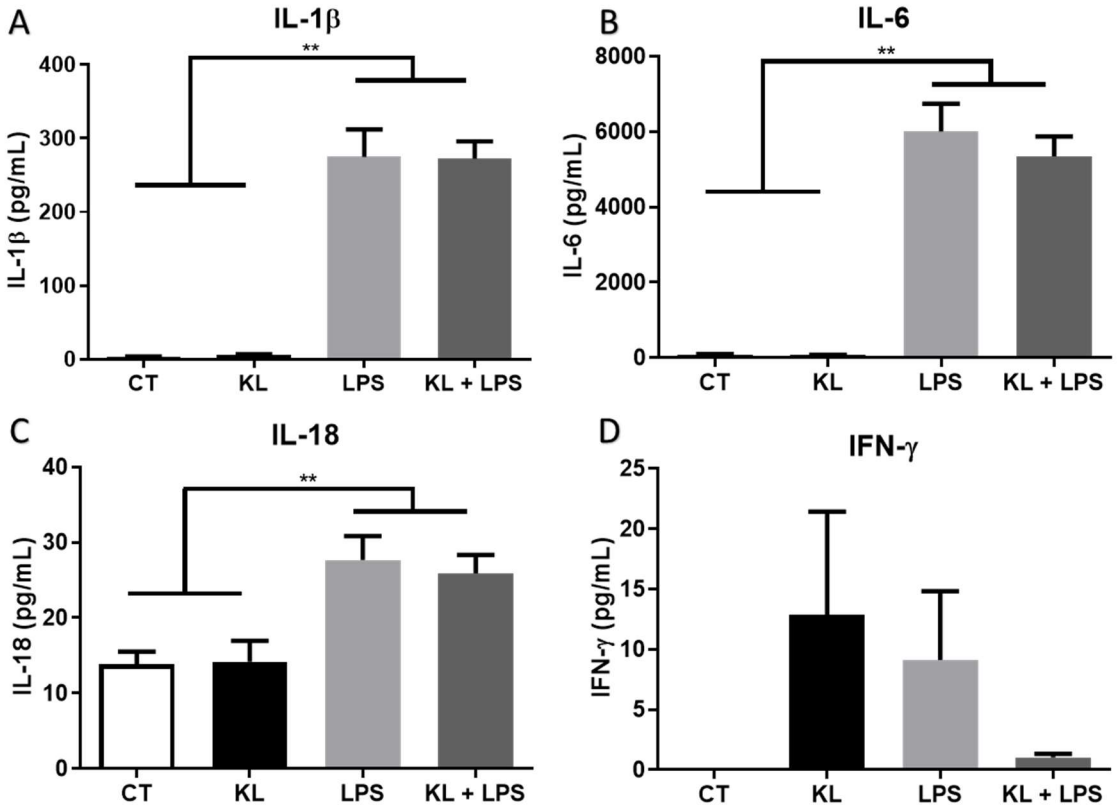


Figura 10. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de rato nos níveis de IL-1β, IL-6, IL-18 e IFN-γ. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 500 pM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 4 horas. O sobrenadante foi coletado para a dosagem dos níveis de IL-1β (A), IL-6 (B), IL-18 (C) e IFN-γ (D). Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, **$p < 0,01$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.1.5 Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na via de sinalização da AKT e da ERK

Sabe-se que a proteína Klotho é capaz de modular a via de sinalização da AKT e da ERK. Como não foi visto diminuição na translocação do p65 e da produção de citocinas pró-inflamatórias, foi investigado se a concentração utilizada é capaz de modular essas vias. A concentração de 500 pM de Klotho foi capaz de aumentar a fosforilação da ERK quando comparado ao controle (figura 11), entretanto, quando ponderado pela expressão total da ERK não foi observado esse aumento. A Klotho não teve influência na fosforilação da AKT (figura 12). O LPS não modulou tanto a fosforilação da ERK como da AKT. Diante dos resultados relatados, a concentração de 500 pM de Klotho se mostrou insuficiente para modular as vias de sinalização da AKT e da ERK e dos efeitos causados pelo LPS em células da glia de ratos.

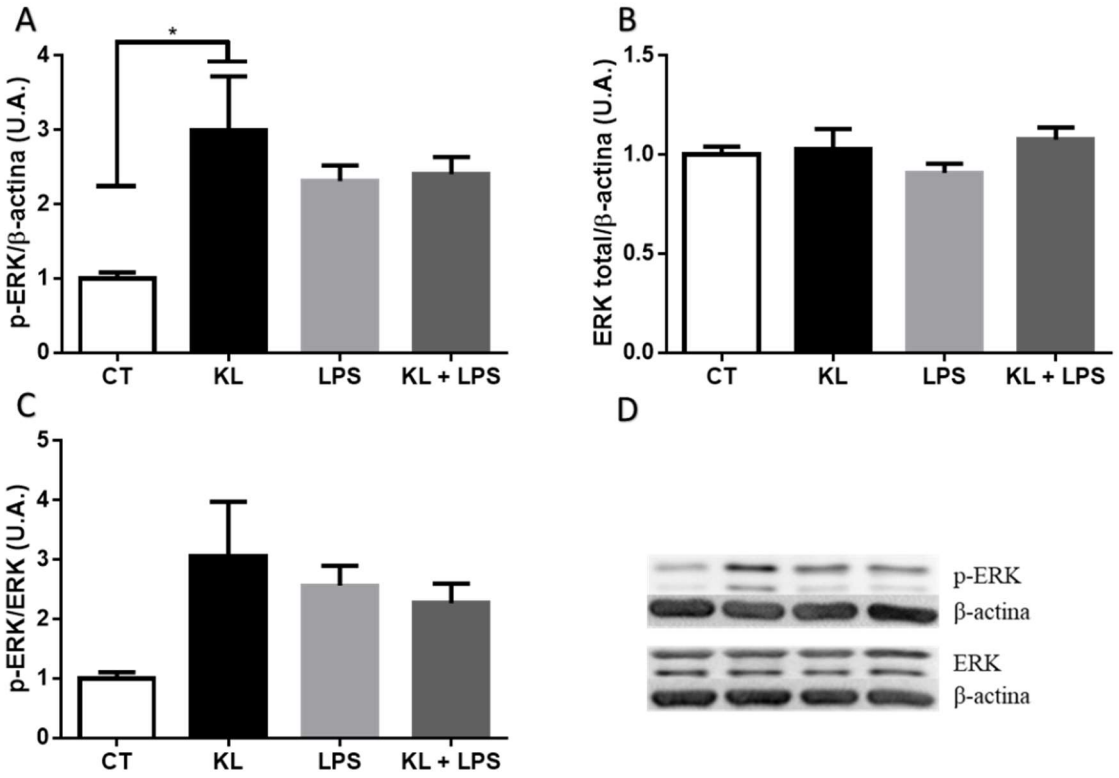


Figura 11. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da ERK em células da glia de rato por *Western Blotting*. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 500 pM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 horas. (A) p-ERK, (B) ERK total, (C) p-ERK por ERK total. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *$p < 0,05$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

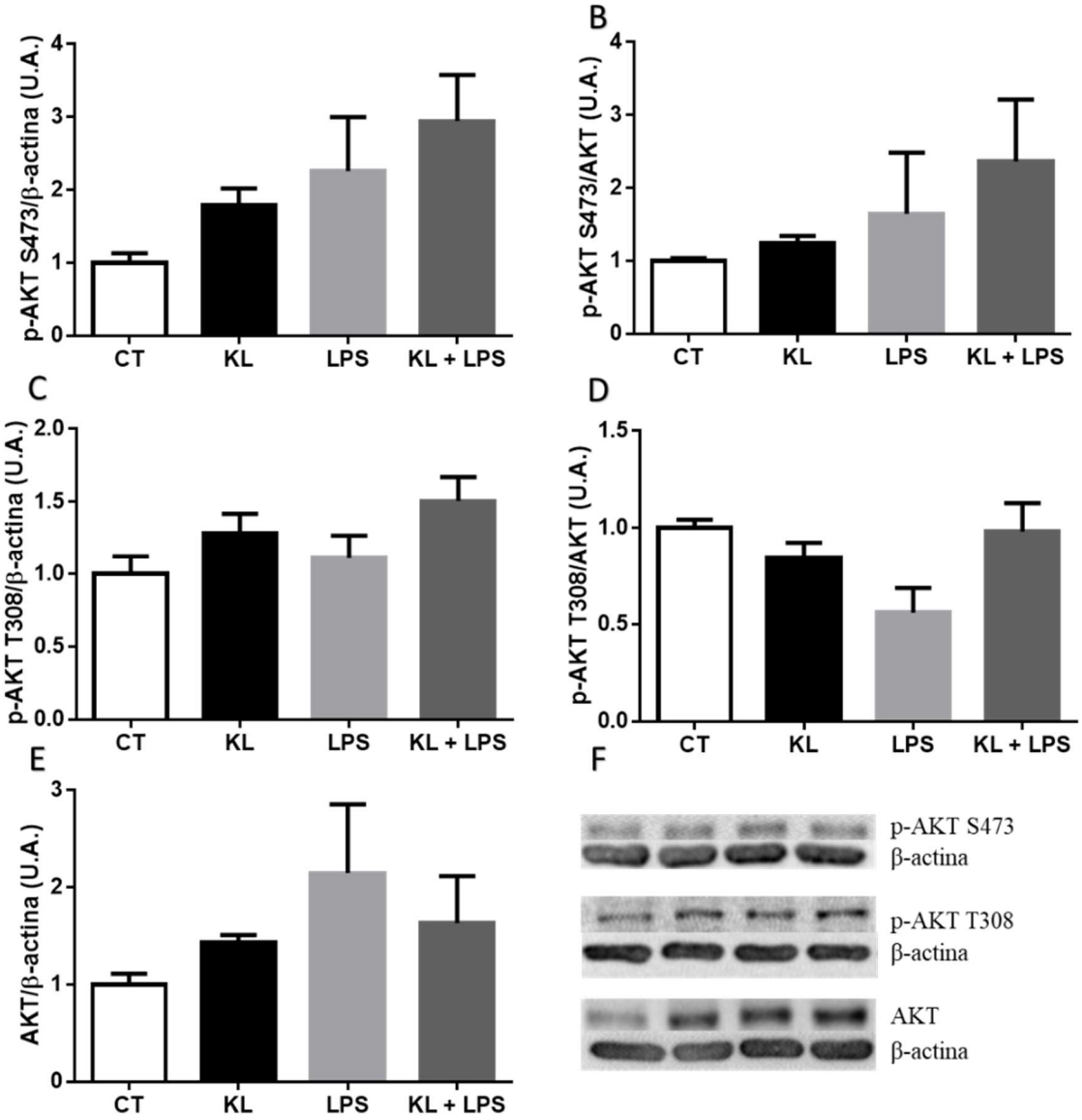


Figura 12. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da AKT em células da glia de rato *Western Blotting*. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 500 pM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 horas. (A) p-AKT S473, (B) p-AKT por AKT total, (C) p-AKT T308, (D) p-AKT T308 por AKT total, (E) AKT total. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.2 Cultura primária de células da glia de camundongos

Inicialmente, utilizou-se células da glia de rato pela facilidade em obter-se os animais, uma vez que o Biotério de Produção de Ratos do ICB-USP disponibiliza os ratos neonatos excedentes da produção toda segunda-feira. Como não foi visto nenhum efeito da proteína Klotho na concentração testada sobre as células da glia de ratos e pelo fato de não ser possível obter animais embrionários diretamente do

Biotério de Produção de Ratos do ICB-USP para realizar cultura primária embrionária de neurônios, decidiu-se continuar o estudo utilizando camundongos.

5.2.1 Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade celular: MTT e LDH

Assim como nas células da glia de rato, os ensaios de viabilidade e citotoxicidade foram realizados para descobrir quais concentrações de Klotho e de LPS poderiam ser utilizadas sem que houvesse alterações significativas na viabilidade celular e na citotoxicidade na células da glia de camundongos.

Foram testadas diferentes concentrações de Klotho entre 0,1 nM e 4 nM por 24 horas. Nenhuma concentração de Klotho alterou a viabilidade celular ou apresentou toxicidade às células da glia tanto no ensaio de MTT como no de LDH (Figura 13).

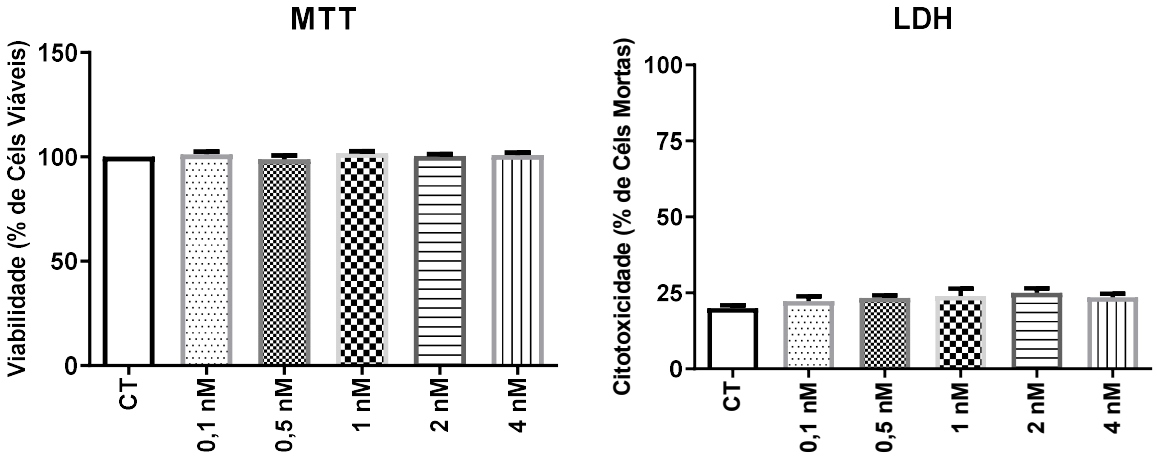


Figura 13. Efeito do tratamento da proteína Klotho por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da glia de camundongo. A cultura primária de células da glia foi submetida ao tratamento de 24 horas com Klotho em diferentes concentrações. A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas pelos ensaios de MTT e de LDH, respectivamente. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

Em relação ao LPS, foram testadas concentrações entre 0,01 a 100 µg/mL por 24 horas. No ensaio do MTT não foi observado nenhuma diferença significativa nas concentrações testadas. Já no ensaio de LDH apenas as concentrações de 10 e 100 µg/mL apresentaram toxicidade às células da glia quando comparadas ao grupo controle (Figura 14). Assim, a concentração de 100 ng/mL de LPS foi mantida para os próximos experimentos, pois, como dito anteriormente, ela é bastante utilizada na literatura.

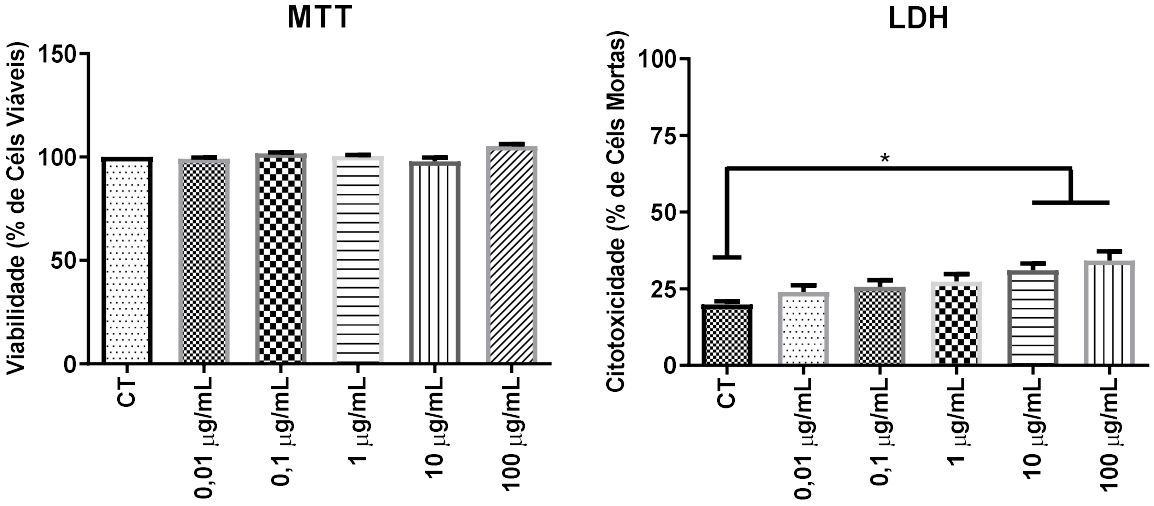


Figura 14. Efeito do tratamento do LPS por 24 horas em diversas concentrações sob a viabilidade celular e citotoxicidade de células da glia de camundongo. A cultura primária de células da glia foi submetida ao tratamento de 24 horas com LPS em diferentes concentrações. A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas pelos ensaios de MTT e de LDH, respectivamente. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *p < 0,05. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.2.2 Padronização de tempo e tratamento: dosagem de TNF-α

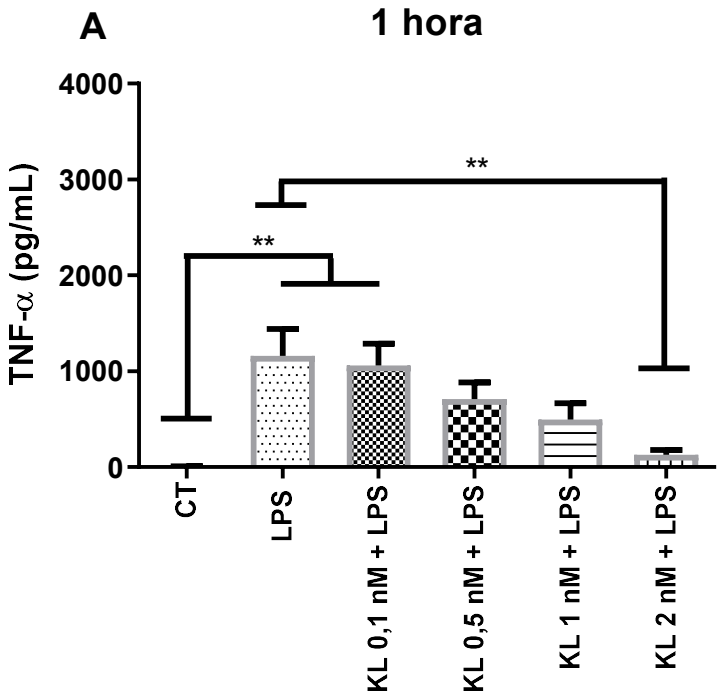
Após analisar a viabilidade celular e toxicidade de diferentes concentrações da proteína Klotho nas células da glia de camundongo, uma vez que não foi visto nenhum efeito do pré-tratamento de 500 pM da proteína Klotho por 24 horas nas células da glia de rato sobre os efeitos do LPS, a próxima etapa foi fazer uma padronização da concentração e do tempo de tratamento que alterassem os efeitos do LPS. Foram testadas as concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2 nM da proteína Klotho nos tempos de 1, 4 e 24 horas.

Como o LPS é um composto que leva a ativação do NF-κB, aumento da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, utilizou-se o ensaio de dosagem de TNF-α para determinar a concentração e o tempo de tratamento da proteína Klotho. As células foram pré-tratadas com a proteínas Klotho nas concentrações e tempos descritos acima e então estimuladas com LPS na concentração de 100 ng/mL, 8 horas após o estímulo o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de TNF-α.

Como pode ser observados nas Figuras 15A, B e C, o LPS na concentração de 100 ng/mL aumentou a secreção de TNF-α em relação ao controle. O pré-tratamento com a proteína Klotho por 1 hora nas concentrações de 0,5, 1 e 2 nM não

apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, no entanto, apenas a concentração de 2 nM apresentou diminuição significativa em relação as células tratadas apenas com o LPS (Figura 15A). O pré-tratamento por 4 horas nas concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2 nM não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, e as concentrações de 1 e 2 nM apresentaram diminuição significativa em relação ao LPS (Figura 15 B). Já no pré-tratamento por 24 horas, as concentrações de 0,5, 1 e 2 nM não apresentaram diferença em relação ao controle e as concentrações de 1 e 2 nM apresentaram diminuição em relação ao LPS (Figura 15C).

Diante dos resultados obtidos, foi observado um efeito anti-inflamatória da proteína Klotho sobre o aumento da secreção de TNF-α estimulado pelo LPS em células da glia, concentrações e tempos diferentes podem ser utilizados para realizar o pré-tratamento com a proteína Klotho. Foi escolhido a concentração de 1 nM por 24 horas para os próximos ensaios.



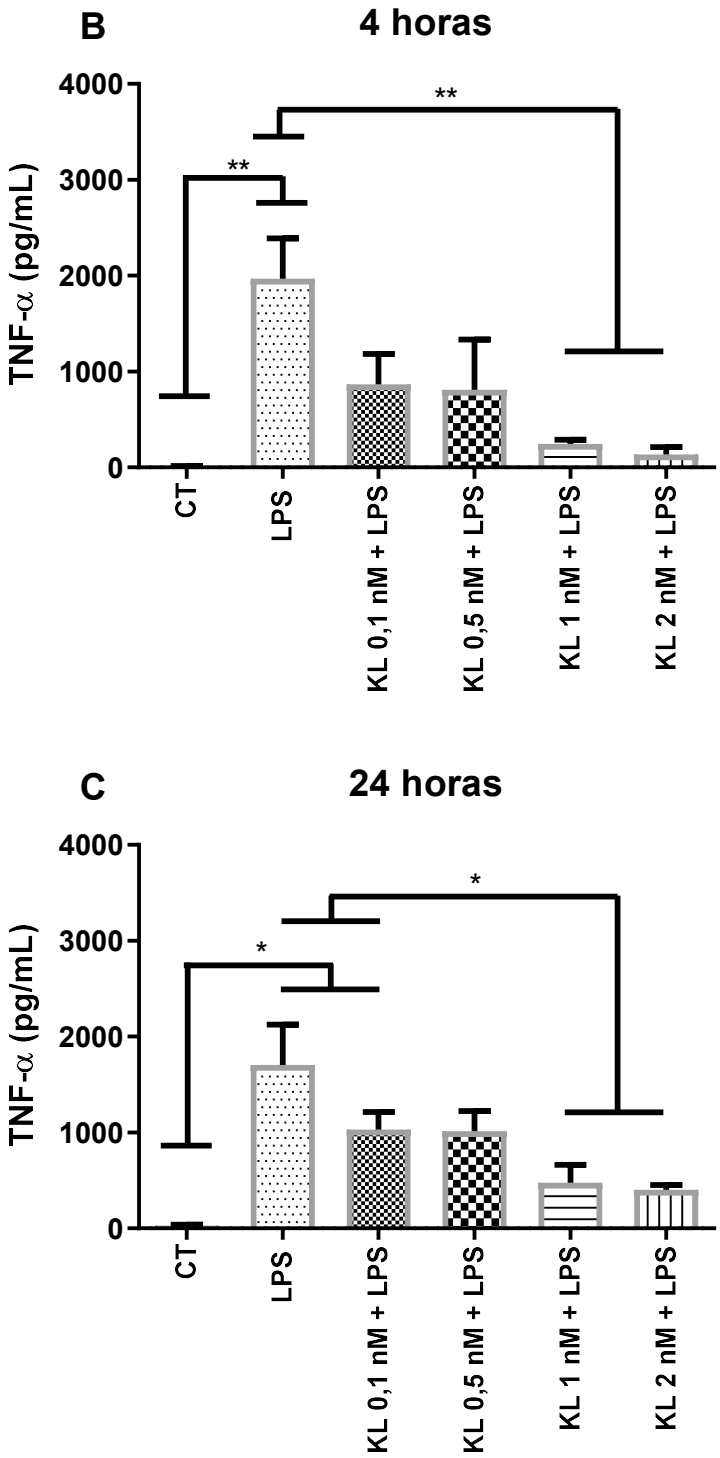
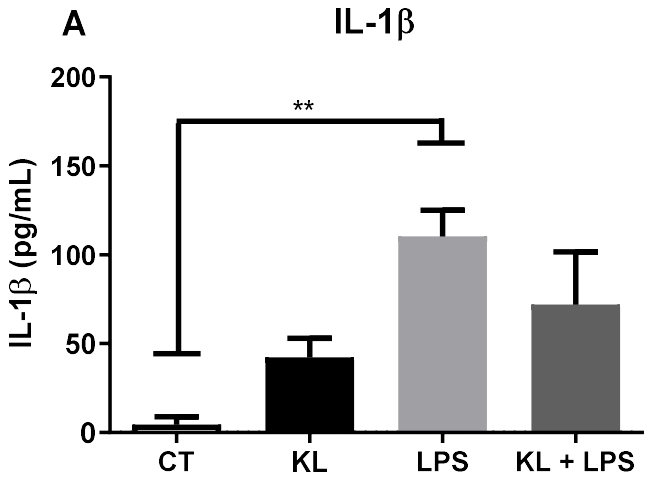


Figura 15. Efeito do tratamento de diferentes concentrações da proteína Klotho sobre a secreção de TNF-α induzida pelo LPS em células da glia de camundongo. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com a proteína Klotho em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1 e 2 nM) e tempos, 1 (A), 4 (B) e 24 (C) horas, e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 8 horas. O sobrenadante foi coletado para a dosagem dos níveis de TNF-α. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *$p < 0,5$, **$p < 0,01$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.2.3 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias

Além do TNF-α, o LPS é capaz de aumentar a produção e secreção de outras citocinas pró-inflamatórias. Então, procurou-se analisar se a Klotho teria influência na secreção de outras citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo LPS. Foi feita a dosagem de IL-1β, IL-6 e IFN-γ. As células foram pré-tratadas com 1 nM de Klotho por 24 horas e então estimuladas com LPS na concentração de 100 ng/mL, 24 horas após o estímulo o sobrenadante foi recolhido para a dosagem dessas citocinas.

O LPS aumentou a secreção de IL-1β, IL-6 e IFN-γ em relação ao grupo controle. As células pré-tratadas com Klotho e estimuladas com LPS não apresentaram diferença significativa em relação ao controle na secreção de IL-1β (Figura 16A). Em relação ao IL-6, o pré-tratamento reverteu o aumento de secreção causado pelo LPS (Figura 16B). Além disso, a Klotho não teve efeito sobre o aumento de secreção causado pelo LPS (Figura 16C).



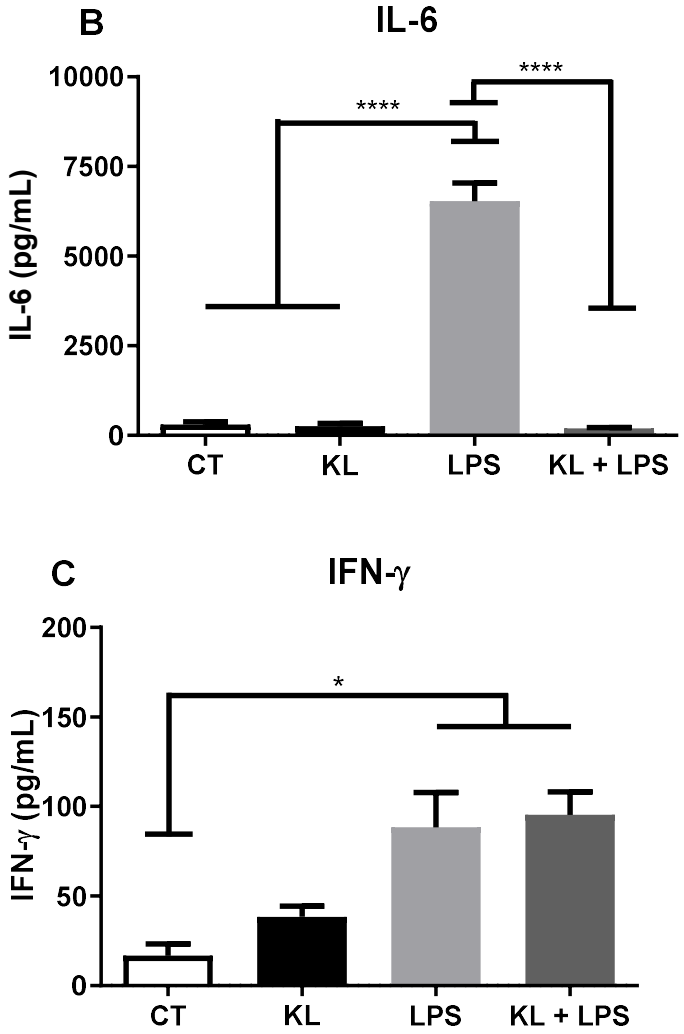


Figura 16. Efeito do tratamento da Klotho e do LPS em células da glia de camundongo nos níveis de IL-1β, IL-6 e IFN-γ. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 1 nM de Klotho por 24 horas, e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 24 horas. O sobrenadante foi coletado para a dosagem dos níveis de IL-1β (A), IL-6 (B), IFN-γ (C). Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *p < 0,5, **p < 0,01, **** < 0,0001. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.2.4 Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na via de sinalização da AKT e da ERK

Foi avaliado se a Klotho e o LPS seriam capazes de modulas as vias de sinalização da ERK e da AKT. No entanto, tanto o pré-tratamento com a Klotho quanto o estímulo com LPS não tiveram influência na expressão e na fosforilação dessas proteínas (Figura 17 e 18).

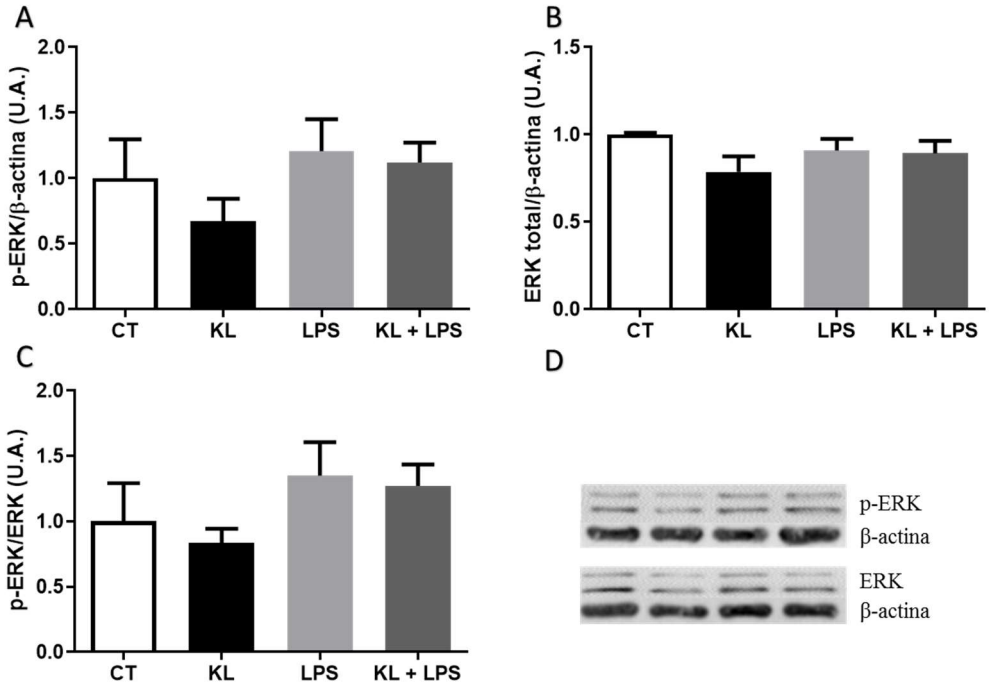


Figura 17. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da ERK em células da glia de camundongo por *Western Blotting*. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 1 nM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 horas. (A) p-ERK, (B) ERK total, (C) p-ERK por ERK total. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

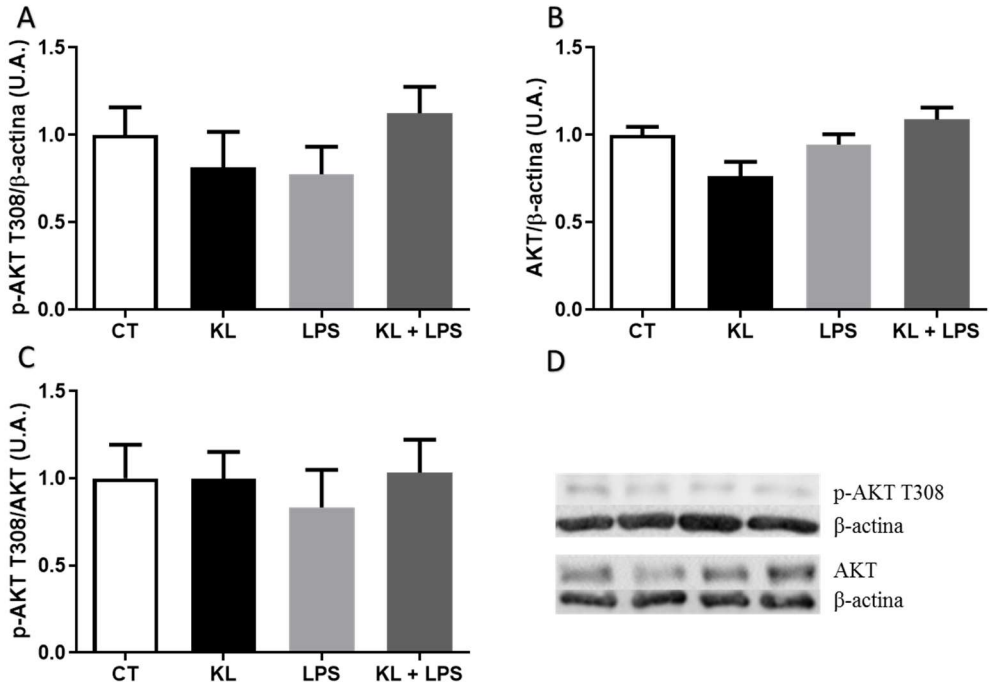


Figura 18. Avaliação do efeito da Klotho e do LPS na expressão e ativação da AKT em células da glia de camundongo *Western Blotting*. A cultura de glia foi pré-tratada com meio sem soro (controle) ou com 1 nM de Klotho por 24 horas e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 1 horas. (A) p-AKT T308, (B) AKT total, (C) p-AKT T308 por AKT total. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

5.3 Cultura Primária Embrionária de Neurônios

Sabe-se que os mediadores pró-inflamatórios produzidos pelas células da glia podem ser neurotóxicos e induzir a morte neuronal (KEMPURAJ et al., 2016). Como foi visto que o LPS foi capaz de aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IFN-γ) em células da glia de camundongos e o pré-tratamento com a proteína Klotho foi capaz de diminuir a secreção de algumas dessas citocinas (TNF-α, IL-6), buscou-se analisar a influência desses mediadores na citotoxicidade em neurônios e se o pré-tratamento com a proteína Klotho seria capaz de modular essa toxicidade.

5.3.1 Caracterização da cultura primária embrionária de neurônios

Foram realizados ensaios de imunofluorescência para análise da pureza da cultura. Para tal, após 7 dias *in vitro*, foram utilizados os marcadores neuronais, Pan-Neuronal Marker e NeuN. Após quantificação, foi possível observar que aproximadamente 90% das células presentes eram neurônios (Figura 19 e 20)

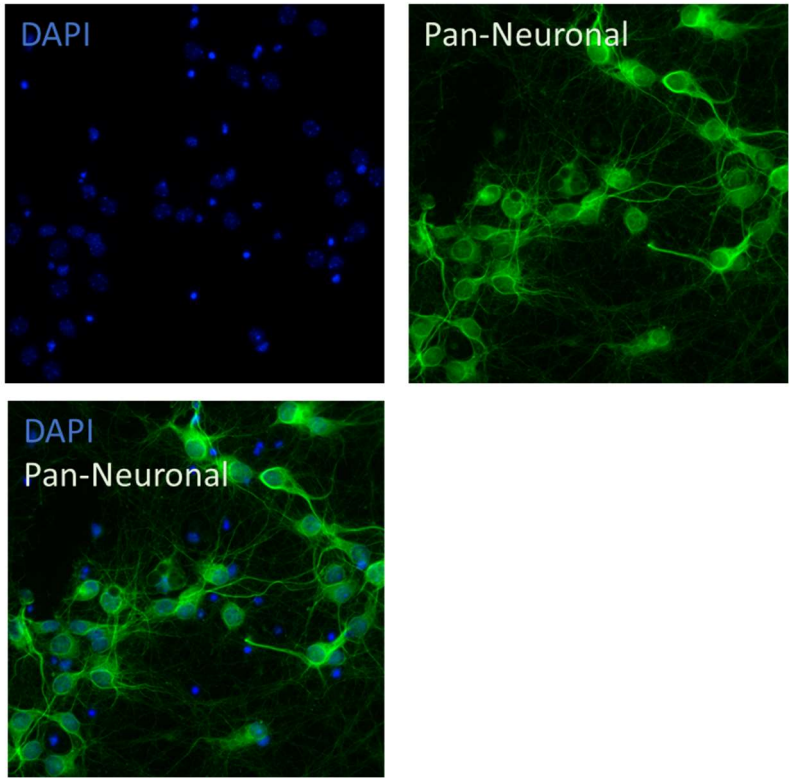


Figura 19. Imagens representativas da cultura primária embrionária de neurônios de camundongos submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de Pan-Neuronal. Marcação para a proteína Pan-Neuronal (verde) e núcleos foram corados com DAPI (azul). Fotos em aumento de 20X.

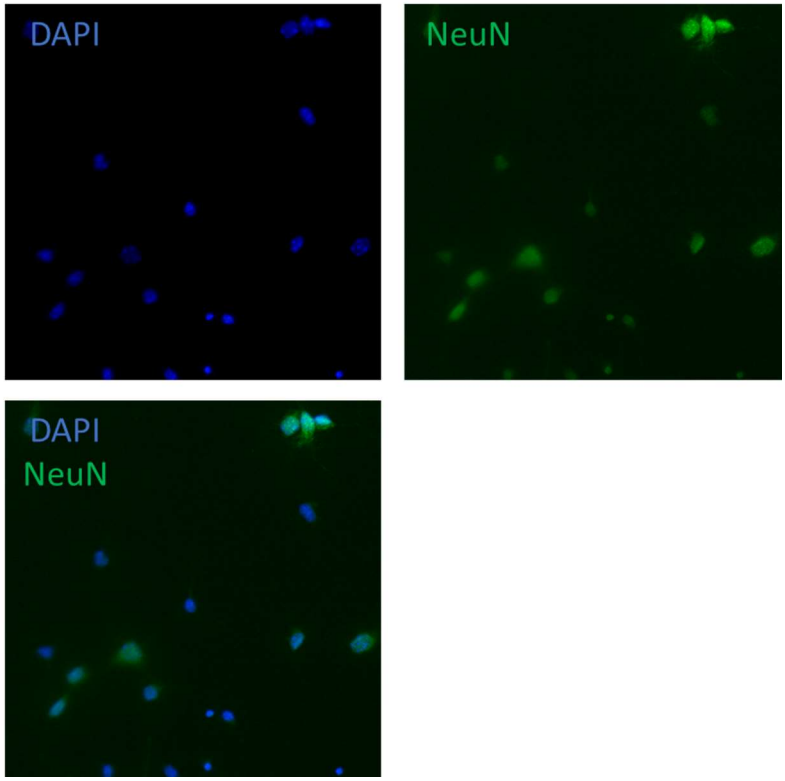


Figura 20. Imagens representativas da cultura primária embrionária de neurônios de camundongos submetida a ensaio de imunofluorescência para marcação de NeuN. Marcação para a proteína NeuN (verde) e núcleos foram corados com DAPI (azul). Fotos em aumento de 20X.

5.3.2 Efeitos do meio condicionado de células da glia na citotoxicidade de células neuronais

A cultura de glia de camundongo foi pré-tratada com meio sem soro ou 1 nM de Klotho por 24 horas, e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 24 horas. O meio foi coletado, e o meio das células da glia tratadas apenas com LPS foi denominado de Meio Condicionado de Células da Glia (MCG) e o meio das células da glia pré-tratadas com Klotho e estimuladas com LPS foi chamado de MCG-KL (Figura 21. Primeiro, foi analisado qual concentração de MCG levaria a um aumento de morte neuronal, 10, 25 e 50% do meio de cultura dos neurônios foram substituídos pelo MCG. O MCG levou a um aumento da citotoxicidade de modo concentração dependente, quando 25 e 50% do meio de cultura dos neurônios foram trocados pelo MCG houve um aumento da morte neuronal em relação ao grupo controle (Figura 22).

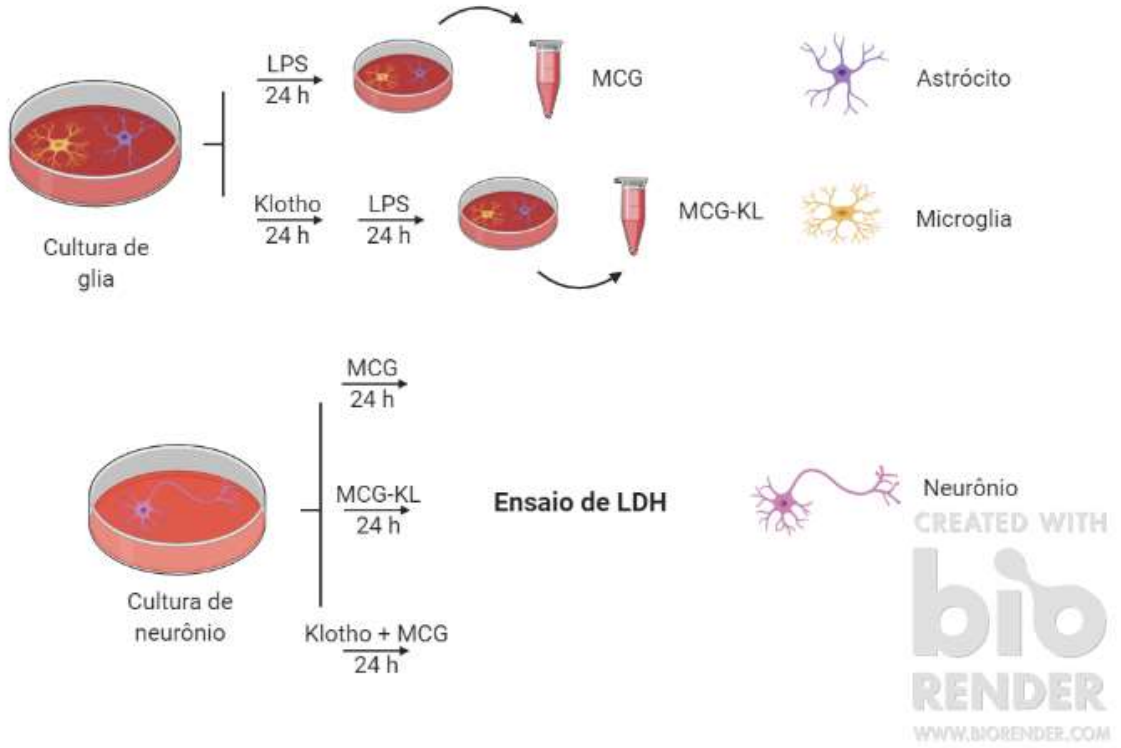


Figura 21. Esquema do meio condicionado e do ensaio de citotoxicidade. As células da glia foram pré-tratadas com meio sem soro ou 1 nM de Klotho por 24 horas, e então desafiada com 100 ng/mL de LPS por 24 horas. O meio foi coletado, o meio das células da glia tratadas apenas com LPS foi denominado de Meio Condicionado de Células da Glia (MCG) e o meio das células da glia pré-tratadas com Klotho e estimuladas com LPS foi chamado de MCG-KL. O meio condicionado foi transferido para a cultura de neurônio em diferentes concentrações, 10, 25 e 50% por 24 horas e então foi feito o ensaio de LDH.

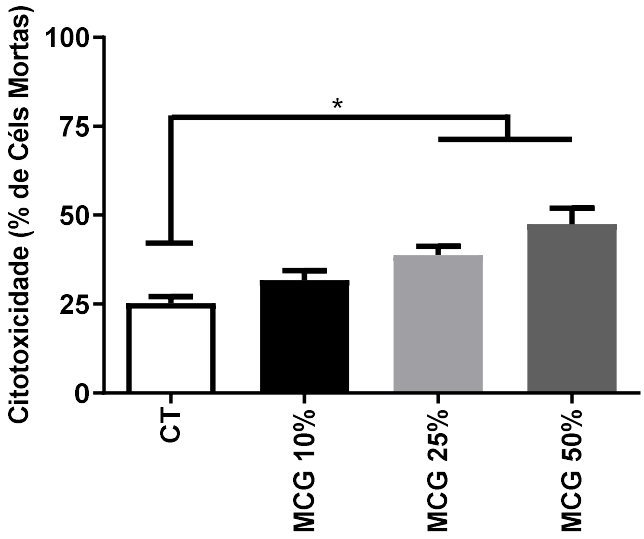
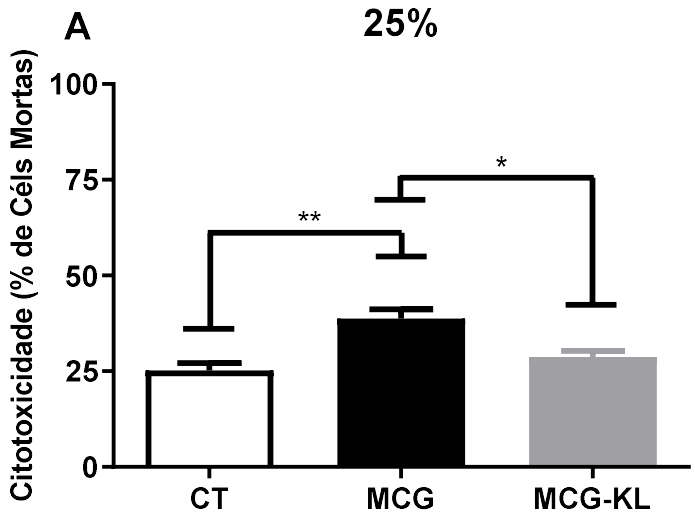


Figura 22. Efeito do MCG em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de neurônios de camundongos. A cultura primária embrionária de neurônios foi submetida ao tratamento de 24 horas com MCG em diferentes concentrações. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de LDH. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *p < 0,5. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

Após determinar as concentrações de MCG que são neurotóxicas, buscou-se investigar se o meio condicionado de células da glia pré-tratadas com Klotho e estimuladas com LPS seria capaz de diminuir a morte neuronal causada pelo MCG (Figura 21). Quando 25% do meio de cultura dos neurônios foi trocado pelo meio condicionado, o MCG-KL foi capaz de reverter o aumento da morte neuronal causado pelo MCG (Figura 23A). No entanto, quando 50% do meio foi trocado pelo meio condicionado, o MCG-KL não apresentou redução significativa da morte neuronal (Figura 23B).



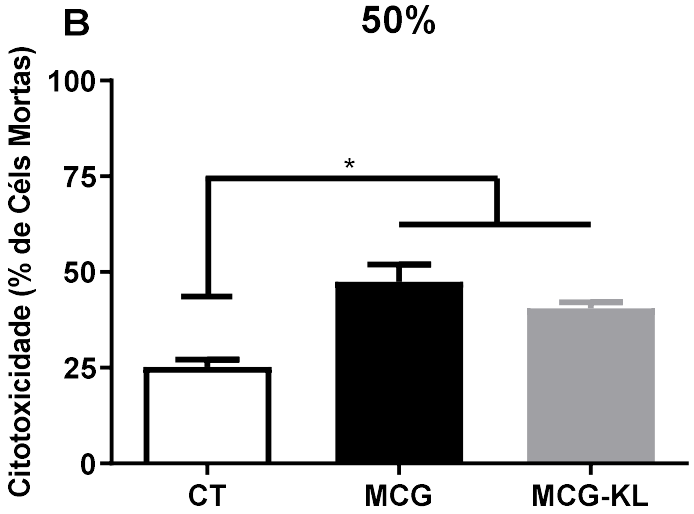
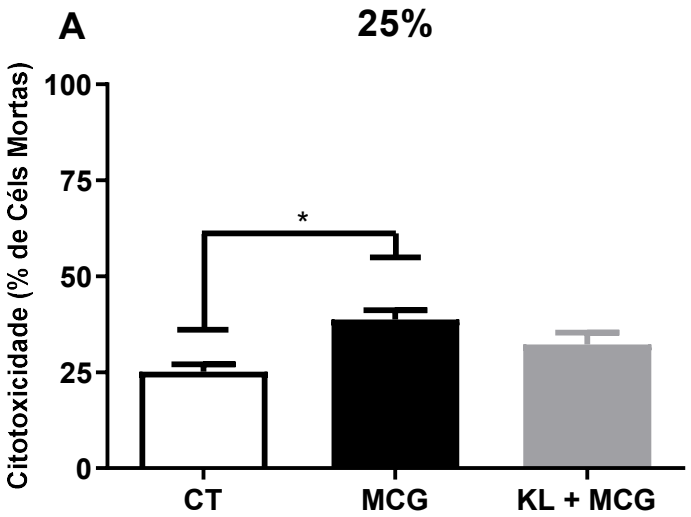


Figura 23. Efeito do MCG e do MCG-KL em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de neurônios de camundongos. A cultura primária embrionária de neurônios foi submetida ao tratamento de 24 horas com MCG ou MCG-KL em diferentes concentrações, 25 (A) e 50% (B). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de LDH. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *p < 0,5, **p < 0,01. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

Ainda, foi verificado se o tratamento da Klotho diretamente nos neurônios seria capaz de reduzir a morte neuronal causada pelo MCG (Figura 21). Os neurônios foram cotratados com 1 nM de Klotho e MCG. Como pode ser observado na Figura 24, quando 25% do meio foi retirado e substituído por MCG houve a um aumento da morte neuronal em relação ao controle que não foi observado quando cotratado com 1 nM de Klotho (Figura 24A). No entanto, quando 50% do meio trocado, o cotratamento também apresentou um aumento da morte neuronal (Figura 24B) em relação ao controle.



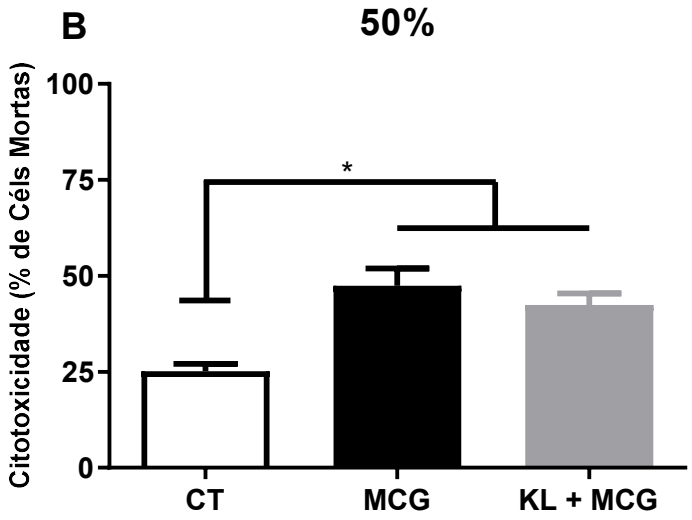


Figura 24. Efeito do MCG e do KL + MCG em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de neurônios de camundongos. A cultura primária embrionária de neurônios foi submetida ao tratamento de 24 horas com MCG ou ao cotratamento com 1 nM de Klotho e MCG em diferentes concentrações, 25 (A) e 50% (B). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de LDH. Análise por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, *$p < 0,5$, **$p < 0,01$. Resultados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

A neuroinflamação está presente no processo de envelhecimento, nas doenças e lesões que afetam o SNC, e é caracterizada pela ativação da microglia e dos astrócitos. Essas células possuem papel fundamental na regulação da neuroinflamação, dependendo da natureza da sua ativação pode levar a produção de mediadores pró e/ou anti-inflamatórios e ter efeitos tanto benéficos como detrimentriais nos neurônios. Logo, um melhor entendimento dos mecanismos que regulam o início e a resolução da neuroinflamação mediada pela imunidade inata do SNC é de suma importância e podem contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Neste trabalho, buscou-se avaliar o papel da proteína Klotho na modulação de processos inflamatórios em células da glia.

Para tal finalidade, foi utilizado o LPS, um importante indutor da resposta inflamatória, que é amplamente utilizado para estudar a neuroinflamação tanto *in vivo* como *in vitro* (NAZEM et al., 2015). O LPS é capaz de ativar células que apresentam TLR4 em sua membrana, como a microglia. A ativação da microglia pelo LPS leva a um aumento da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF-α, IL-6, IL-1, IL-12), além do aumento da expressão de outros mediadores pró-inflamatórios, como quimiocinas (como CXCL8, CCL5 e CCL2), proteínas do sistema complemento (como C3, C3aR, C5a5 e fator B) e enzimas (como a ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) e a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (RIVEST, 2009). De fato, neste estudo, o LPS foi capaz de aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6, IL-1β e IFN-γ, pelas células da glia (Figura 25A). Neste trabalho foi utilizado cultura mista de células da glia e não de células isoladas, portanto, os resultados obtidos são provenientes tanto da microglia como dos astrócitos e da interação microglia-astrócitos. Por conta disso, não é possível saber a contribuição de cada tipo célula na produção e secreção de cada um desses mediadores.

A microglia é considerada como a principal célula do sistema imune inato presente no cérebro (HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014). No SNC, o TLR4 é prioritariamente expresso na microglia (LEHNARDT et al., 2003), portanto, não é surpreendente que o LPS seja um potente ativador da microglia (TROTTA et al., 2014). Já em relação aos astrócitos, existe um debate se essas células expressam TLR4 em condições fisiológicas e se são ativadas diretamente pelo LPS. Alguns

estudos não detectaram a presença de TLR4 em astrócitos (LEHNARD et al., 2002; BOWMAN et al., 2003; HOLM; DRAEBY; OWENS, 2012). Enquanto outros trabalhos detectaram uma baixa expressão de TLR4 que pode ser aumentada após sua ativação (BSIBSI et al., 2002; BOWMAN et al., 2003; CARPENTIER et al., 2005).

Embora, muitos estudos tenham relatado ativação dos astrócitos pelo LPS *in vitro* (LIEBERMAN et al., 1989; BSIBSI et al., 2002; HOLM; DRAEBY; OWENS, 2012; CUNNINGHAM; DUNNE; revisado em LOPEZ-RODRIGUEZ, 2019), os protocolos de purificação utilizados nesses estudos não levam a uma cultura 100% pura de astrócitos. Essas culturas possuem uma contaminação de microglia que variam de 1-10%, que são suficientes para mediar as respostas inflamatórias induzidas por LPS (SAURA, 2007; CUNNINGHAM; DUNNE; LOPEZ-RODRIGUEZ, 2019). Para determinar se os astrócitos respondem ao LPS na ausência da microglia, Holm *et al*. purificou rigorosamente os astrócitos e mostrou que a resposta ao LPS pelos astrócitos é dependente da presença da microglia (HOLM; DRAEBY; OWENS, 2012). A microglia pode iniciar ou facilitar a ativação dos astrócitos por meio de mediadores inflamatórios e assim amplificar a resposta inflamatória (SAIJO et al., 2009; HOLM; DRAEBY; OWENS, 2012; PASCUAL et al., 2012). Diante disso, é provável que neste estudo a microglia tenha sido o principal contribuidor para o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidos pelo LPS e que essa resposta tenha sido aumentada pelos astrócitos.

Os mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α, IL-1β e IL-6, quando produzidos de forma excessiva e/ou crônica pelas células da glia podem levar a morte neuronal (ALLAN; ROTHWELL, 2001; HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014), estudos já demonstraram que a aplicação de meio condicionado de cultura de microglia e de glia mista ativadas por LPS em neurônios leva a morte neuronal (GUADAGNO et al., 2013; SUN et al., 2018; DAI et al., 2019). De acordo com esses dados, a aplicação de meio condicionado de células da glia ativadas pelo LPS em neurônios levou a um aumento da morte neuronal (Figura 25A). Como foi utilizado o meio condicionado, não é possível afirmar qual molécula estaria levando a morte neuronal. Provavelmente, não apenas uma, mas um conjunto de mediadores, incluindo as citocinas pró-inflamatórias que se apresentaram elevadas após o estímulo com LPS.

Como a ativação das células da glia pelo LPS leva a um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórias em células da glia e esses mediadores são capazes

de induzir a morte neuronal, foi investigado se a Klotho seria capaz de diminuir os efeitos induzidos pelo LPS em células da glia, uma vez que já foi visto atividade protetora e anti-inflamatória da proteína Klotho no sistema renal, vascular e pulmonar. No entanto, os efeitos da proteína Klotho na neuroinflamação foram pouco estudados.

Foi demonstrado que a Klotho diminui a ativação do NF-κB e reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-1β, *in vivo* e in *vitro* em modelos de inflamação cardíaca (HUI et al., 2017; GUO et al., 2018), doença renal (ZHAO et al., 2011; JIN et al., 2017) e doença pulmonar (LI et al., 2015; KRICK et al., 2017). Por exemplo, em células embrionárias de rim humano (HEK293), *Zhao et al.* demonstrou que o pré-tratamento com 200 pM de Klotho por 45 minutos foi capaz de diminui em aproximadamente 70% a ativação de NF-κB e reduzir a expressão de IL-8, MCP-1, RANTES e IL-6 após a adição de TNF-α (ZHAO et al., 2011). Em células HUVECs, foi mostrado que o pré-tratamento com 200 pM de Klotho por 6 horas diminui a ativação do NF-κB e a expressão de moléculas de adesão, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão de celular vascular 1 (VCAM-1), induzidas pelo TNF-α (MAEKAWA et al., 2009).

Estudos recentes têm demonstrado o efeito protetor e anti-inflamatório da Klotho no SNC. A superexpressão da Klotho no plexo coroide de camundongos melhorou o déficit neurocomportamental e aumentou o número de neurônios vivos após a hipoperfusão cerebral, acompanhado de uma diminuição da translocação do p65 para o núcleo, da produção de citocinas pró-inflamatórias e da ativação de astrócitos e micróglia (ZHOU et al., 2018). Um estudo recém publicado mostrou que a superexpressão sistêmica de Klotho em um modelo experimental de esclerose múltipla amiotrófica (camundongo transgênico para superóxido dismutase (SOD1)), levou a um início e progresso mais tardio da doença e aumentou a sobrevivência desses animais (ZELDICH et al., 2019). Ainda, foi observado que a Klotho diminuiu a expressão de marcadores inflamatórios e preveniu a morte neuronal. Além disto, foi mostrado uma diminuição da secreção de TNF-α, IL-6 e da expressão de iNOS e de COX-2 induzidas pelo LPS/IFN-γ em cultura de microglia de camundongos que superexpressão a Klotho (ZELDICH et al., 2019).

Corroborando com esse efeito neuroprotetor da Klotho, neste estudo foi visto uma ação anti-inflamatório da Klotho em células da glia de camundongos. A Klotho foi capaz de diminuir a secreção das citocinas pró-inflamatórias, TNF-α e IL-6 (Figura

25B). O pré-tratamento com 1 nM de Klotho por 4 e 24 horas e 2 nM por 1, 4 e 24 horas diminuiu a secreção de TNF-α induzida pelo LPS em células da glia. Ainda, o pré-tratamento com 1 nM de Klotho por 24 horas reverteu o aumento da secreção de IL-6 induzida pelo LPS. Interessantemente, os efeitos da Klotho nas células da glia se mostrou neuroprotetor. Quando o meio dessas células foi coletado e aplicado em cultura neuronal, o pré-tratamento com Klotho nas células da glia revertou a morte neuronal causada pelo meio condicionado de células da glia tratadas apenas com LPS (Figura 25B). Reforçando, o potencial terapêutico da Klotho no SNC mostrado em outros estudos.

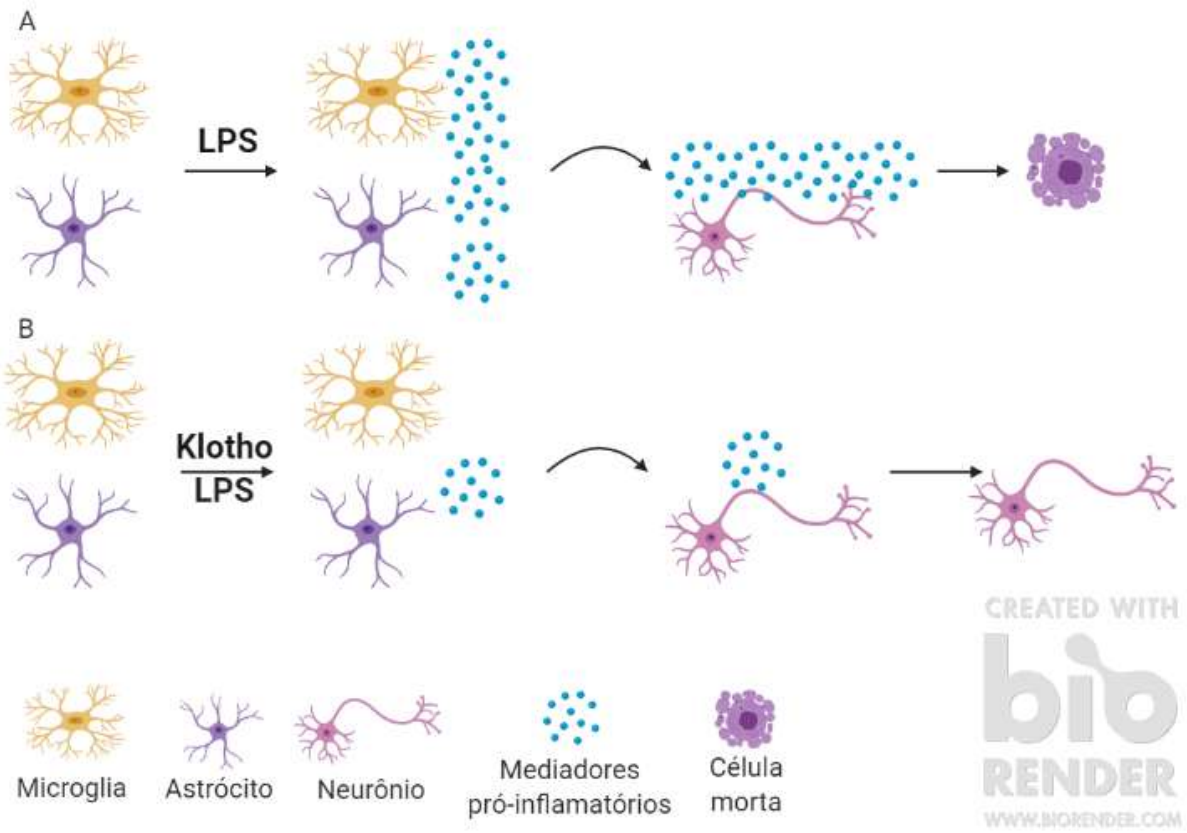


Figura 25. Efeito anti-inflamatório e neuroprotetor da proteína Klotho. O LPS induz as células da glia a produzirem mediadores pró-inflamatórios que podem levar a morte neuronal (A). A proteína Klotho diminui a produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos pelo LPS em células da glia, revertendo os efeitos neurotóxicos do LPS (B).

Assim como não foi possível afirmar quais moléculas estariam levando a morte neuronal, também não é possível dizer quais mediadores levaram a esse efeito neuroprotetor. Pode ter sido pela diminuição do TNF-α e IL-6, que foram observados neste estudo, como também pela diminuição de outros mediadores inflamatórios não

avaliados. Além disso, a Klotho pode ter tido esse efeito protetor pela secreção de mediadores anti-inflamatórios e/ou fatores neuroprotetores.

Neste trabalho, não foi identificado o mecanismo pelo qual a Klotho poderia estar levando a esse efeito anti-inflamatório. Os estudos que demonstraram um efeito anti-inflamatório da Klotho observam uma diminuição da ativação do NF-κB (MAEKAWA et al., 2009; ZHAO et al., 2011). Inclusive, essa modulação da ativação do NF-κB também foi observada no SNC (ZHOU et al., 2018). É possível que neste estudo, o pré-tratamento com a Klotho tenha levado a uma diminuição da ativação do NF-κB nas células da glia e, consequentemente, resultado em uma diminuição na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Esse efeito anti-inflamatório não foi visto em células da glia de ratos tratadas com 500 pM de Klotho por 24 horas, embora em outros tipos de células (HEK293 e HUVEC) o pré-tratamento com uma concentração menor (200 pM) de Klotho foi suficiente para ter um efeito anti-inflamatório (MAEKAWA et al., 2009; ZHAO et al., 2011). Nas células da glia de camundongo, o LPS induziu um aumento do TNF-α quando comparadas ao grupo controle e em células pré-tratadas com 500 pM de Klotho por 24 horas não houve esse aumento. Por se tratar de outra linhagem de células e de outro modelo animal, talvez a dose de 500 pM seja insuficiente para produzir os efeitos anti-inflamatórios em células da glia de ratos. Os tempos de tratamento com LPS também podem ter levado a não observação do efeito anti-inflamatório da proteína Klotho. O sobrenadante das células de rato foi coletado 1 hora após o estímulo com LPS para a dosagem de TNF-α, enquanto para o de camundongos foi coletado 8 horas após o estímulo. Embora tenha sido observado um aumento do TNF-α com o estímulo de LPS por 1 hora, esse tempo pode ter sido muito curto e os níveis de TNF-α não tenham aumentado o suficiente para observar uma diferença em relação as células pré-tratadas com Klotho. De fato, quando comparado com os níveis de TNF-α de camundongo que foram o estimulados por 8 horas com LPS os níveis de TNF-α se mostraram mais elevados. Entretanto, o IL-6 de células da glia de ratos em que o meio foi coletado 4 horas após o estímulo com LPS, apresentou níveis elevados de IL-6 e o pré-tratamento com a Klotho não apresentou diferença.

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. **Toll-like receptors in the induction of the innate immune responseNature**, 17 ago. 2000. .

AIZAWA, H. et al. Downregulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 3, p. 865–871, 28 ago. 1998.

AJAMI, B. et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 1538–1543, dez. 2007.

ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. **Cytokines and acute neurodegenerationNature Reviews Neuroscience**, out. 2001. .

ARKING, D. E. et al. Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 856–861, 22 jan. 2002.

ARKING, D. E. et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation research**, v. 96, n. 4, p. 412–418, 4 mar. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677572>. Acesso em: 13 nov. 2019.

BLOCH, L. et al. Klotho is a substrate for α-, β- and γ-secretase. **FEBS Letters**, v. 583, n. 19, p. 3221–3224, 6 out. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.09.009>. Acesso em: 11 nov. 2019.

BOWMAN, C. C. et al. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. **Glia**, v. 43, n. 3, p. 281–291, set. 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.10256>. Acesso em: 26 nov. 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BSIBSI, M. et al. Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1013–1021, 1 nov. 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1093/jnen/61.11.1013>. Acesso em: 26 nov. 2019.

CARARO-LOPES, M. M. et al. **The relevance of α-KLOTHO to the central nervous system: Some key questionsAgeing Research Reviews**Elsevier Ireland Ltd, , 1 jul. 2017. .

CARPENTIER, P. A. et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. **Glia**, v. 49, n. 3, p. 360–374, fev. 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20117>. Acesso em: 26 nov. 2019.

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

CHA, S. K. et al. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 28, p. 9805–9810, 15 jul. 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 115, n. 1, p. 61–69, 25 nov. 1988.

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

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

DOI, S. et al. Klotho inhibits transforming growth factor-β1 (TGF-β1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8655–8665, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 203–210, 12 maio 1989.

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

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

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

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

IMURA, A. et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS Letters**, v. 565, n. 1–3, p. 143–147, 7 maio 2004. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2004.03.090>. Acesso em: 11 nov. 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MAEKAWA, Y. et al. Klotho suppresses TNF-α-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-κB activation. **Endocrine**, v. 35, n. 3, p. 341–346, jun. 2009.

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626–630, 26 jan. 1998.

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

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

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

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

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

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

NAGAI, T. et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 50–52, 2003.

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

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

OHYAMA, Y. et al. Molecular cloning of rat klotho cDNA: Markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 3, p. 920–925, 29 out. 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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