

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA

Paulo Giovanni de Albuquerque Suassuna

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REPOSIÇÃO DE  $\alpha$ KLOTHO RECOMBINANTE  
SOBRE A REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DOENÇA RENAL CRÔNICA”**

Juiz de Fora  
2018

Paulo Giovanni de Albuquerque Suassuna

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REPOSIÇÃO DE  $\alpha$ KLOTHO RECOMBINANTE  
SOBRE A REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DOENÇA RENAL CRÔNICA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

Orientadores: Prof. Dr. Rogério Baumgratz de Paula.  
Profa. Dra. Hélady Sanders Pinheiro.

Juiz de Fora

2018

Suassuna, Paulo Giovanni de Albuquerque.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REPOSIÇÃO DE  $\alpha$ KLOTHO RECOMBINANTE SOBRE A REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA RENAL CRÔNICA / Paulo Giovanni de Albuquerque Suassuna. -- 2018.

100 f.

Orientador: Rogério Baumgratz de Paula

Coorientadora: Hélydy Sanders Pinheiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. Doença renal crônica. 2. Distúrbio mineral e ósseo da DRC. 3. Miocardiopatia urêmica. 4. Klotho. 5. FGF21. I. de Paula, Rogério Baumgratz, orient. II. Pinheiro, Hélydy Sanders, coorient. III. Título.

Paulo Giovanni de Albuquerque Suassuna

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REPOSIÇÃO DE  $\alpha$ KLOTHO RECOMBINANTE  
SOBRE A REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DOENÇA RENAL CRÔNICA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

Aprovada em 14 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. ROGÉRIO BAUMGRATZ DE PAULA  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. HÉLADY SANDERS PINHEIRO  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. MARIA EUGÊNIA FERNANDES CANZIANI  
Universidade Federal de São Paulo

---

Profa. Dra. MELANI RIBEIRO CUSTÓDIO  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. WANDER BARROS DO CARMO  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. MARCELLA MARTINS TERRA  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e resiliência para superar todas as dificuldades encontradas no caminho.

Aos meus orientadores, Prof. Rogério e Profa. Hélydy, por todo o tempo que dedicaram a me ajudar durante o processo de realização deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade.

Aos amigos da equipe LABNEX...

Obrigado especial para Paula Cherem, querida amiga e companheira em todo o caminho. Aprendemos e fizemos juntos todas as técnicas cirúrgicas e demais procedimentos dos protocolos, celebramos e sofremos juntos a cada passo e sem a qual esse trabalho não teria sido possível. Obrigado especial também à Bárbara, querida amiga que me iniciou no mundo da experimentação animal.

Aos colegas do Centro de Biologia da Reprodução...

À Profa. Dra. Vera Peters, Evelise, Lorena, Jéssica, Pedro, Luiz e demais funcionários e colegas da equipe do CBR.

Agradeço também ao Dr. Júlio Lovisi, Márcia KoiKe, Edgar Maquigussa e Marcos Cenedeze que doaram tempo e trabalho para colaborar com esta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Orson Moe, Ming-Chang Hu e Johanne Pastor por terem me recebido tão bem em seus laboratórios e demais pesquisadores e técnicos da University of Texas SouthWestern pela inestimável contribuição para minha formação como pesquisador.

Aos meus pais, por todo o amor que me deram, além da educação, ensinamentos e apoio.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, o meu muito obrigado!

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso,  
mas o que ele se torna com isso”

John Ruskin.

## RESUMO

**Introdução:** A miocardiopatia relacionada à Doença Renal Crônica - Miocardiopatia Urêmica – é a causa subjacente que faz da Morte Súbita Cardíaca a principal causa de óbito na diálise. Dentre os mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia, destaca-se o Distúrbio Mineral e Ósseo da DRC (DMO-DRC) através da presença de hiperfosfatemia, níveis elevados de FGF23 e baixos níveis de  $\alpha$ Klotho. Evidências sugerem que a reposição de  $\alpha$ Klotho teria efeito protetor sobre o miocárdio, porém por mecanismos ainda pouco compreendidos.

**Objetivo:** Avaliar, em um modelo experimental de DRC, o efeito da reposição de  $\alpha$ Klotho recombinante sobre a remodelação cardíaca e potenciais mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia.

**Métodos:** Estudamos 46 ratos Wistar machos com 12 semanas, divididos em 3 grupos: Controle (sham), DRC e DRC+KL. Os animais foram submetidos à cirurgia (sham ou nefrectomia 5/6) e tratados da 4<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semana com  $\alpha$ Klotho recombinante (0.01mg/kg, SC, 48/48h) ou veículo. Na 8<sup>a</sup> semana, foram realizados ecocardiograma e dosagem de creatinina, ureia, cálcio, fósforo, PTHi, FGF23, FGF21 e sKlotho. A remodelação miocárdica foi avaliada pela massa cardíaca, por parâmetros ecocardiográficos e de histomorfometria miocárdica. A expressão miocárdica de MHC $\beta$  e  $\alpha$ SMA foram avaliadas por imuno-histoquímica (IHC) e qRT-PCR, enquanto o efeito sobre a expressão miocárdica de TRPC6 e FGF21 por IHC, westernblot e qRT-PCR.

**Resultados:** Houve aumento da creatinina (Controle:  $0,24 \pm 0,04$  vs DRC:  $0,58 \pm 0,07$  e DRC+KL:  $0,62 \pm 0,06$ mg/dl;  $p < 0,0001$ ) e queda de sua depuração (Controle:  $2,0 \pm 0,5$  vs DRC:  $1,1 \pm 0,13$  e DRC+KL:  $1,0 \pm 0,13$ ml/min/100g;  $p < 0,0001$ ) nos grupos com DRC. Observamos também, nos grupos com DRC, aumento da fração excretada de fósforo (Controle:  $8,9 \pm 1,6$  vs DRC:  $20,08 \pm 3,8$  e DRC+KL:  $24,2 \pm 5,3\%$ ;  $p < 0,0001$ ); de PTHi (Controle:  $464,8 \pm 155,1$  vs DRC:  $1059,0 \pm 315,3$  e DRC+KL:  $1113,0 \pm 353,9$ pg/ml;  $p < 0,05$ ) e FGF23 (Controle:  $129,9 \pm 28,7$  vs DRC:  $208,8 \pm 33,9$  e DRC+KL:  $200,5 \pm 32,0$ mg/dl;  $p < 0,05$ ), e redução dos níveis séricos de  $\alpha$ Klotho (Controle:  $188,4 \pm 29,67$  vs DRC:  $36,2 \pm 21,3$  e DRC+KL:  $49,2 \pm 25,6$  pM;  $p < 0,0001$ ). Na avaliação da remodelação miocárdica, foi observado aumento da razão peso coração/tíbia (Controle:  $16,7 \pm 1,0$  vs DRC:  $20,2 \pm 1,0$ mg/mm;  $p < 0,0001$ ) e espessura das paredes do

VE: septo (Controle:  $1,41 \pm 0,1$  vs DRC:  $1,58 \pm 0,11$ mm;  $p=0,006$ ), parede posterior (Controle:  $1,45 \pm 0,1$  vs DRC:  $1,54 \pm 0,1$ mm;  $p=0,01$ ) e massa estimada do VE (Controle:  $736,5 \pm 123,4$  vs DRC:  $883,1 \pm 128,4$ mg;  $p=0,005$ ) nos grupos com DRC, porém com redução no grupo tratado com  $\alpha$ Klotho: coração/tíbia (DRC:  $20,2 \pm 1,0$  vs DRC+KL:  $17,8 \pm 0,9$  mg/mm;  $p < 0,0001$ ), septo (DRC:  $1,58 \pm 0,11$  vs DRC+KL:  $1,42 \pm 0,10$ mm;  $p=0,006$ ), parede posterior (DRC:  $1,54 \pm 0,1$  vs DRC+KL:  $1,42 \pm 0,1$ mm;  $p=0,01$ ) e massa de VE (DRC:  $883,1 \pm 128,4$  vs DRC+KL:  $750,4 \pm 114,8$ mg;  $p=0,005$ ). Observou-se também redução do diâmetro dos cardiomiócitos (DRC:  $21,4 \pm 0,8$  vs DRC+KL:  $17,7 \pm 1,0$   $\mu$ m;  $p < 0,0001$ ) e da área de fibrose intersticial (DRC:  $4,0 \pm 0,53$  vs DRC+KL:  $2,35 \pm 0,3$  %;  $p < 0,0001$ ) no grupo tratado em relação ao DRC sem tratamento, assim como redução na expressão de MHC $\beta$ (IHC) (DRC:  $28,4 \pm 2,4$  vs DRC+KL:  $22,8 \pm 4,0$ %;  $p=0,002$ ) e  $\alpha$ SMA(IHC) (DRC:  $7,2 \pm 2,7$  vs DRC+KL:  $2,6 \pm 0,4$ %;  $p=0,0001$ ). Houve redução no grupo tratado da expressão de TRPC6 na membrana dos cardiomiócitos (DRC:  $15,5 \pm 3,72$  vs DRC+KL:  $9,77 \pm 1,84$  %área;  $p=0,001$ ) e aumento da expressão miocárdica de FGF21 tanto a nível de mRNA (DRC:  $0,73 \pm 0,19$  vs DRC+KL:  $0,96 \pm 0,26$ ;  $2^{\Delta\Delta CT}$ ,  $p=0,03$ ) como proteico (DRC:  $1,25 \pm 0,11$  vs DRC+KL:  $1,46 \pm 0,22$ ; UA,  $p=0,03$ ) em relação ao grupo DRC sem tratamento.

**Conclusão:** Concluímos que, em modelo experimental de DRC com perda moderada de função renal e hipertrofia cardíaca, a reposição de rKlotho, na dose e via utilizados e com racional terapêutico, apresentou efeito cardioprotetor, atenuando a remodelação miocárdica. O mecanismo deste efeito envolveu não só a redução da expressão de TRPC6 na membrana dos cardiomiócitos, como aumento da expressão miocárdica de FGF21, o que sugere a existência de um efeito do sKlotho sobre sua expressão.

Palavras-chave: Doença renal crônica, Miocardiopatia urêmica, Klotho, FGF23, FGF21.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic Kidney Disease (CKD) related cardiomyopathy - Uremic Cardiomyopathy - is the underlying reason that makes Sudden Cardiac Death the main mortality cause on dialysis. Among the mechanisms involved in its pathophysiology, the Bone and Mineral Disorder of CKD (BMD-CKD) stands out due to the presence of hyperphosphatemia, elevated levels of FGF23 and low levels of  $\alpha$ Klotho. Evidence suggests that  $\alpha$ Klotho replacement would have a protective effect on the myocardium, but the mechanisms are still poorly understood.

**Objective:** To evaluate, in an experimental model of CKD, the effect of recombinant  $\alpha$ Klotho replacement on cardiac remodeling and potential pathophysiological mechanisms involved.

**Methods:** We studied 46 male Wistar rats with 12 weeks, divided into 3 groups: Control (sham), DRC and DRC + KL. The animals were submitted to surgery (sham or nephrectomy 5/6) and treated from the 4th to 8th week with recombinant  $\alpha$ Klotho (0.01mg / kg, SC, 48 / 48h) or vehicle. At week 8, echocardiography and creatinine, urea, calcium, phosphorus, PTHi, FGF23, FGF21 and sKlotho were measured. Myocardial remodeling was evaluated by cardiac mass, echocardiographic parameters and myocardial histomorphometry. Myocardial expression of MHC $\beta$  and  $\alpha$ SMA were assessed by immunohistochemistry (IHC) and qRT-PCR, while the effect on myocardial expression of TRPC6 and FGF21 was determined by IHC, westernblot and qRT-PCR.

**Results:** There was an increase in creatinine (Control:  $0.24 \pm 0.04$  vs CKD:  $0.58 \pm 0.07$  and CKD+KL:  $0.62 \pm 0.06$ mg / dl,  $p < 0.0001$ ) and drop in its clearance (Control:  $2.0 \pm 0.5$  vs CKD:  $1.1 \pm 0.13$  and CKD+KL:  $1.0 \pm 0.13$  ml / min / 100g;  $p < 0.0001$ ) in the groups with CKD. In the CKD groups, there was an increase in the excreted fraction of phosphorus (Control:  $8.9 \pm 1.6$  vs CKD:  $20.08 \pm 3.8$  and CKD+KL:  $24.2 \pm 5.3\%$ ,  $p < 0.0001$ ); ( $P < 0.05$ ) and FGF23 (Control:  $129.9 \pm 28.7$  vs. CKD:  $208.8 \pm 33.9$  and CKD+KL:  $200.5 \pm 32.0$  mg / dL,  $p < 0.05$ ), and reduction of serum  $\alpha$ Klotho levels (Control:  $188.4 \pm 29.67$  vs. CKD:  $36.2 \pm 21.3$  and CKD+KL:  $49.2 \pm 25.6$  pM,  $p < 0.0001$ ). In the assessment of myocardial remodeling, an increase in the heart weight/tibia length ratio (Control:  $16.7 \pm 1.0$  vs. CKD:  $20.2 \pm 1.0$  mg / mm,  $p < 0.0001$ ) and LV walls thickness: septum (Control:  $1.41 \pm 0.1$  vs CKD:  $1.58 \pm 0.11$  mm,  $p = 0.006$ ), posterior

wall (Control:  $1.45 \pm 0.1$  vs CKD:  $1.54 \pm 0.1$ mm ;  $p = 0.01$ ) and estimated LV mass (Control:  $736.5 \pm 123.4$  vs CKD:  $883.1 \pm 128.4$  mg;  $p = 0.005$ ) in the CKD group, but with a reduction in the  $\alpha$ Klotho treated group: heart/tibia (CKD:  $20.2 \pm 1.0$  vs CKD+KL:  $17.8 \pm 0.9$  mg/mm,  $p < 0.0001$ ), septum (CKD:  $1.58 \pm 0.11$  vs. CKD+KL:  $1.42 \pm 0.10$  mm,  $p = 0.006$ ), posterior wall (CKD:  $1.54 \pm 0.1$  vs CKD+KL:  $1.42 \pm 0.1$ mm,  $p = 0.01$ ) and mass of VE (CKD:  $883.1 \pm 128.4$  vs. CKD+KL:  $750.4 \pm 114.8$ mg,  $p = 0.005$ ). It was also observed a reduction of cardiomyocyte diameter (CKD:  $21.4 \pm 0.8$  vs. CKD+KL:  $17.7 \pm 1.0$   $\mu$ m,  $p < 0.0001$ ) and of interstitial fibrosis area (CKD:  $4, 0 \pm 0.53$  vs. CKD+KL:  $2.35 \pm 0.3\%$ ,  $p < 0.0001$ ) in the treated group compared to untreated CKD group, as well as reduction in expression of MHC $\beta$  (IHC) (CKD:  $28, 4 \pm 2.4$  vs. CKD+KL:  $22.8 \pm 4.0\%$ ,  $p = 0.002$ ) and  $\alpha$ SMA (IHC) (CKD:  $7.2 \pm 2.7$  vs. CKD+KL:  $2.6 \pm 0.4$  %,  $p = 0.0001$ ). There was a reduction in the treated group of TRPC6 expression on cardiomyocyte membrane surface (CKD:  $15.5 \pm 3.72$  vs. CKD+KL:  $9.77 \pm 1.84\%$  area;  $p = 0.001$ ) and increased FGF21 myocardial expression at mRNA (CKD:  $0.73 \pm 0.19$  vs. CKD+KL:  $0.96 \pm 0.26$ ;  $2^{\Delta\Delta CT}$ ,  $p = 0.03$ ) and at protein level (CKD:  $1.25 \pm 0.11$  vs. CKD+KL:  $1.46 \pm 0.22$ , UA,  $p = 0.03$ ) in relation to the untreated CKD group.

**Conclusion:** We conclude that, in an experimental model of CKD with moderate loss of renal function and cardiac hypertrophy, the replacement of rKlotho, at the dose and route used and therapeutic rationale, showed cardioprotective effect, attenuating myocardial remodeling. The mechanism of this effect involved not only the reduction of TRPC6 expression in the cardiomyocyte membrane, but also an increase in the myocardial expression of FGF21, which suggests the existence of an effect of sKlotho on its expression.

Keywords: Chronic kidney disease, Uremic Cardiomyopathy, Klotho, FGF23, FGF21.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Taxa de evento cardiovascular por faixa de filtração glomerular.....	14
<b>Figura 2:</b> Taxa de mortalidade anual de pacientes com DRC dialítica ajustada (idade, sexo e raça) comparada à da população geral.....	15
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da interação entre os fatores de risco cardiovascular tradicionais e os relacionados à DRC.....	16
<b>Figura 4:</b> Frequências das causas identificadas de morte entre pacientes dialíticos.....	17
<b>Figura 5:</b> Fatores de risco para MSC na DRC dialítica.....	18
<b>Figura 6:</b> Sobrevida cumulativa de acordo com o ganho de massa ventricular ao ecocardiograma.....	19
<b>Figura 7:</b> Mecanismo pelo qual o fósforo causa a transformação fenotípica das células musculares lisas dos vasos em células osteoblasto-símiles.....	22
<b>Figura 8:</b> Ações do FGF23 na homeostase do fósforo.....	25
<b>Figura 9:</b> Mecanismo pelo qual o FGF23 induz HVE.....	27
<b>Figura 10:</b> Papel do receptor de FGF tipo 4 na HVE induzida pelo FGF23.....	28
<b>Figura 11:</b> Comparação entre camundongos selvagens (+/+) e camundongos <i>knockout</i> para $\alpha$ Klotho (kl/kl) .....	29
<b>Figura 12:</b> Proteínas Klotho.....	31
<b>Figura 13:</b> Ação da sKlotho em vias de sinalização extra e intracelulares.....	33
<b>Figura 14:</b> Possíveis mecanismos pelos quais a sKlotho modularia o efeito do excesso de FGF23 circulante na DRC.....	37
<b>Figura 15:</b> Possíveis formas através das quais a sKlotho poderia modular a sinalização do FGF23 em órgãos alvo como o miocárdio.....	38
<b>Figura 16:</b> A superfamília de FGFs.....	39
<b>Figura 17:</b> Efeitos do FGF21 como uma cardiomiocina protetora.....	42
<b>Figura 18:</b> Nefrectomia 5/6 por cauterização dos dois polos do rim esquerdo: A-Mesa cirúrgica; B-Rim esquerdo cauterizado; C-Aspecto final do rim após 8 semanas.....	48
<b>Figura 19:</b> Desenho Experimental.....	50
<b>Figura 20:</b> Punção da carótida e medida direta da pressão arterial.....	51

<b>Figura 21:</b> Toracotomia após perfusão com solução cardioplégica, demonstrando o coração perfundido (pálido) e em assistolia.....	52
<b>Figura 22:</b> Realização de ecocardiografia.....	54
<b>Figura 23:</b> Medida da espessura do septo interventricular.....	57
<b>Figura 24:</b> Medida da secção transversal (diâmetro) dos cardiomiócitos.....	58
<b>Figura 25:</b> Quantificação de área de fibrose perivascular.....	59
<b>Figura 26:</b> Curva de peso dos animais.....	66
<b>Figura 27:</b> Níveis pressóricos medidos por punção carotídea no dia da eutanásia..	66
<b>Figura 28:</b> Avaliação da função renal dos grupos estudados na 8ª semana de experimento.....	67
<b>Figura 29:</b> Parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo mineral e ósseo, avaliados na 8ª semana de experimento.....	68
<b>Figura 30:</b> Parâmetros hormonais relacionados ao metabolismo mineral e ósseo avaliados na 8ª semana de experimento.....	68
<b>Figura 31:</b> Avaliação da remodelação cardíaca: Pelas razões do peso cardíaco / peso do animal (A) e peso cardíaco / comprimento da tíbia (B) e por medida direta da espessura do septo interventricular (C). Fotos ilustrativas de cortes transversais do coração a nível equatorial e coradas com H&E, macro (D).....	70
<b>Figura 32:</b> Avaliação da remodelação miocárdica por histomorfometria: A–Medida do diâmetro dos cardiomiócitos e das áreas de fibrose intersticial e periarteriolar. B– Fotos ilustrativas de tecido miocárdico nas colorações H&E, 400x e Picrosirius, 200x.....	71
<b>Figura 33:</b> Avaliação da expressão tecidual de MHC $\beta$ e da relação MHC $\alpha$ /MHC $\beta$ . Avaliação da remodelação miocárdica através da expressão tecidual de $\beta$ MHC e da relação $\alpha$ MHC/ $\beta$ MHC. A – Expressão de $\beta$ MHC quantificada por IHC e B- por qRT-PCR. C – Relação da expressão de mRNA entre $\alpha$ MHC e $\beta$ MHC. D – Fotos ilustrativas de miocárdio com IHC com anti- $\beta$ MHC+DAB, 200x.....	72
<b>Figura 34:</b> Avaliação da expressão miocárdica de $\alpha$ SMA. A – Área ocupada por $\alpha$ SMA avaliada por IHC. B -Expressão relativa de mRNA por qRT-PCR. C – Fotos ilustrativas de tecido miocárdico com IHC com anti- $\alpha$ SMA+DAB, 200x.....	73
<b>Figura 35:</b> Avaliação da expressão miocárdica de TRPC6. A – Avaliação por IHC da expressão na membrana dos cardiomiócitos de canais catiônicos TRPC6. B – Expressão relativa de mRNA para TRPC6. C – Fotos ilustrativas de tecido miocárdico com IHC com anti-TRPC6 extracelular+DAB, 200x.....	74

**Figura 36:** Avaliação dos níveis séricos e expressão miocárdica de FGF21. A- Níveis séricos; B – Expressão a nível proteico por WB; C – Expressão a nível de mRNA por qRT-PCR; D – Foto ilustrativa da quantificação por WB.....75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Risco relativo de evento cardiovascular de acordo com a faixa de TFG...	14
<b>Tabela 2:</b> Fatores de risco cardiovascular na DRC.....	16
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre os fenótipos de deficiência de $\alpha$ Klotho primário e secundário à DRC.....	37
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros bioquímicos e hormonais.....	67
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros ecocardiográficos, avaliados na 8ª semana de experimento.	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** – 1,25 di-hidroxi vitamina D<sub>3</sub>

**αSMA** – α actina do músculo liso

**aa** – Aminoácidos

**AD** - Átrio direito

**ADAM 10/17** - *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 e 17*

**AKT** – Proteína quinase B

**ANP** – Peptídeo natriurético atrial

**ANZDATA** – Banco de dados de pacientes renais da Austrália e Nova Zelândia

**AT1R** – Receptor de angiotensina tipo 1

**AVE** – Acidente vascular encefálico

**BNP** – Peptídeo natriurético cerebral

**Cbfa-1** – Fator de transcrição de osteoblastos (*Core-binding factor alpha-1*)

**cDNA** – DNA complementar

**CICr** – *Clearance* de creatinina

**Cr** – Creatinina

**CT** – Ciclo de transcrição

**DAB** – Cromógeno Diaminobenzidina

**DAC** – Doença arterial coronária

**DCV** – Doença cardiovascular

**DDVE** – Diâmetro diastólico do VE

**DMO-DRC** – Distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica

**DRC** – Doença renal crônica

**DSVE** – Diâmetro sistólico do VE

**ELISA** - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**EPP** – Espessura da parede posterior do VE

**ERK ½** - *Extracellular signal-regulated kinases*

**ESIV** – Espessura do septo interventricular

**EUA** – Estados Unidos da América

**FA** – Fosfatase alcalina

**FE** – Fração de ejeção do VE

**FeP%** - Fração de excreção de fósforo

**FGF** – Fator de crescimento de fibroblasto  
**FGF-21** – Fator de crescimento de fibroblasto 21  
**FGFR (1c, 4)** - Receptor de FGF (1c, 4)  
**FGFs** – Fatores de crescimento de fibroblastos  
**FOXO3a** – Fator de transcrição "*Forkhead box protein O3*"  
**FRS2 $\alpha$**  – Substrato 2 $\alpha$  do receptor de FGF  
**HE** – Hematoxilina-eosina  
**HPRT** - *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*  
**HRP** - *Horseradish peroxidase*  
**HVE** – Hipertrofia ventricular esquerda  
**IAM** – Infarto agudo do miocárdio  
**ICC** – Insuficiência cardíaca congestiva  
**IGF-1** - *Insulin Growth Factor 1*  
**IL-6** – Interleucina 6  
**IP** - Intraperitoneal  
**IQR** – Intervalo interquartil  
**IRS** - *Insulin receptor substrate 1*  
**IS** – Indoxil sulfato  
**JNK** - *c-Jun N-terminal kinase*  
**kDa** – Kilo Daltons  
**KL** – gene Klotho  
**MHC ( $\beta$ ,  $\alpha$ )** – Cadeia pesada da miosina ( $\beta$ ,  $\alpha$ )  
**MSC** - Morte súbita cardíaca  
**NFAT** – Fator nuclear de células T ativadas  
**NF $\kappa$  $\beta$**  – Fator de transcrição  $\kappa\beta$   
**NOX2** – NADPH oxidase 2  
**NPC (NaPi 2a, 2c)** – Co-transportador sódio-fósforo  
**P38** - *Mitogen-activated protein kinase protein 38*  
**PAGE**- *Polyacrylamide gel electrophoresis*  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PI3K** - *Phosphatidylinositol 3-kinase*  
**PIT-1** – Co-transportador sódio-fósforo tipo 3  
**PLC $\gamma$**  – Fosfolipase C $\gamma$   
**PPAR $\alpha$**  – *Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$*

**PTHi** – Paratormônio intacto

**qRT-PCR** – PCR quantitativo em tempo real

**RAF-1** - *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma serine/threonine-specific protein kinases*

**Ras/MAPK** - *Mitogen-activated protein kinase pathway*

**ROMK-1** - *Renal outer medullary potassium channel*

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**SC** – Via subcutânea

**SDS** - *Sodium dodecyl sulfate*

**SIRT-1** - Sirtuin 1

**SMC** – Célula muscular lisa

**SOD2** – Superóxido dismutase 2

**STATs** - *Signal transducer and activator of transcription family*

**TBST** - *Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20*

**TFG** – Taxa de filtração glomerular

**TGF- $\beta$**  – *Transforming Growth Factor beta*

**TGF $\beta$ R2** – Receptor tipo 2 do TGF- $\beta$

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**TRPC6** – *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*

**TRPV5** - *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5*

**TRS** – Terapia renal substitutiva

**UP3** – *Uncoupling protein 3*

**Ur** – Ureia

**USRDS** – Banco de dados de pacientes renais Americano

**VE** – Ventrículo esquerdo

**WNT** - *Int/Wingless protein family (secreted lipid-modified signaling glycoproteins)*

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 – REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1 – A DOENÇA CARDIOVASCULAR NA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	14
2.2 – MIOCARDIOPATIA RELACIONADA À DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	19
2.2.1 – A Evolução do conceito.....	19
2.2.2 – <i>Papel do DMO-DRC na Miocardiopatia Relacionada à DRC</i> .....	21
2.2.3 – <i>Papel do FGF23 no DMO-DRC e Miocardiopatia Relacionada à DRC</i> .....	24
2.3 – KLOTHO.....	29
2.3.1 – <i>O Gene Klotho e seus Produtos</i> .....	30
2.3.2 – <i>Expressão e Funções</i> .....	31
2.3.3 – <i>Efeito Protetor sobre o Miocárdio</i> .....	34
2.3.4 – <i>A DRC como um Estado de Deficiência de Klotho</i> .....	36
2.4 – <i>FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 21</i> .....	38
2.4.1 – <i>O FGF-21 como uma Cardiomiocina</i> .....	40
<b>3 – JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b> .....	44
<b>4 - HIPÓTESE DO ESTUDO</b> .....	45
<b>5 – OBJETIVO</b> .....	46
5.1 – OBJETIVO GERAL.....	46
5.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>6 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
6.1 – ANIMAIS.....	47
6.2 – MODELO EXPERIMENTAL DE DRC.....	47
6.3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
6.4 – ECOCARDIOGRAMA.....	53
6.5 – PARÂMETROS AVALIADOS.....	55
6.5.1 – <b>Peso</b> .....	55
6.5.2 – <b>Dosagens no Soro e Urina</b> .....	52
6.5.3 – <b>Função Renal</b> .....	55
6.5.4 – <b>Avaliação do peso do coração</b> .....	56
6.5.5 – <b>Análise histomorfométrica do coração</b> .....	56
6.5.6 - <b>Imunohistoquímica</b> .....	59

6.5.7 – Dosagem de $\alpha$ Klotho por Imunoprecipitação-imunoblot.....	61
6.5.8 – Westernblot de proteínas de interesse no miocárdio.....	63
6.5.9 - PCR quantitativo em Tempo Real.....	64
6.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....	65
<b>7 – RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
7.1–SOBREVIDA DOS ANIMAIS, CURVA DE PESO E PRESSÃO ARTERIAL.....	65
7.2 – AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E PERFIL MINERAL E ÓSSEO .....	67
7.3 – AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS .....	69
7.4 – AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA PELO PESO CARDÍACO E PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS .....	69
7.5 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO MIOCÁRDICA ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE HIPERTROFIA E FIBROSE .....	71
7.6 – AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO MIOCÁRDICA DE FGF21 .....	74
<b>8 – DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>9 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>86</b>
<b>10 - REFERÊNCIAS.</b> ....	<b>86</b>
<b>11- APÊNDICE (artigos publicados)</b> .....	<b>99</b>
<b>12 – ANEXOS</b> .....	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa de morbimortalidade na população de pacientes renais crônicos (Go *et al.*, 2004). Nesta população, a Hipertrofia Ventricular Esquerda (HVE) é a anormalidade cardíaca mais prevalente e a que apresenta maior correlação com a mortalidade (Parfrey *et al.*, 1990; Parfrey *et al.*, 1996). Este achado deve-se ao desenvolvimento de uma miocardiopatia relacionada à doença renal crônica (DRC), a qual foi denominada de “Miocardiopatia Urêmica” (Nik-Akhtar *et al.*, 1978). A patogênese desta miocardiopatia é multifatorial e permanece não totalmente compreendida e, como consequência, o tratamento apresenta resultados modestos (London *et al.*, 1987).

Desta forma, apesar de todos os avanços na terapia dialítica propriamente dita, no controle da hipertensão, da hipervolemia, da anemia e do distúrbio mineral e ósseo da DRC (DMO-DRC), a remodelação miocárdica continua ocorrendo nos pacientes com DRC, resultando em altas taxas de mortalidade cardiovascular (Alhaj *et al.*, 2013).

Recentemente, ganharam destaque na literatura a participação do hormônio fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23) e a proteína  $\alpha$ Klotho na fisiopatologia da miocardiopatia urêmica, sendo o FGF23 com efeitos deletérios sobre o miocárdio e a  $\alpha$ Klotho com múltiplos efeitos pleiotrópicos protetores (Faul *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015). Além disto, passaram a ser descritas substâncias expressas no miocárdio em situações patológicas, conhecidas como cardiomiocinas, que tanto podem ter ação deletéria como protetora, entre elas o fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) que apresenta efeitos protetores semelhantes aos descritos para a  $\alpha$ Klotho (Planavila *et al.*, 2013; Planavila, Redondo-Angulo, Ribas, *et al.*, 2015), o que nos faz especular a existência de uma relação entre ambos.

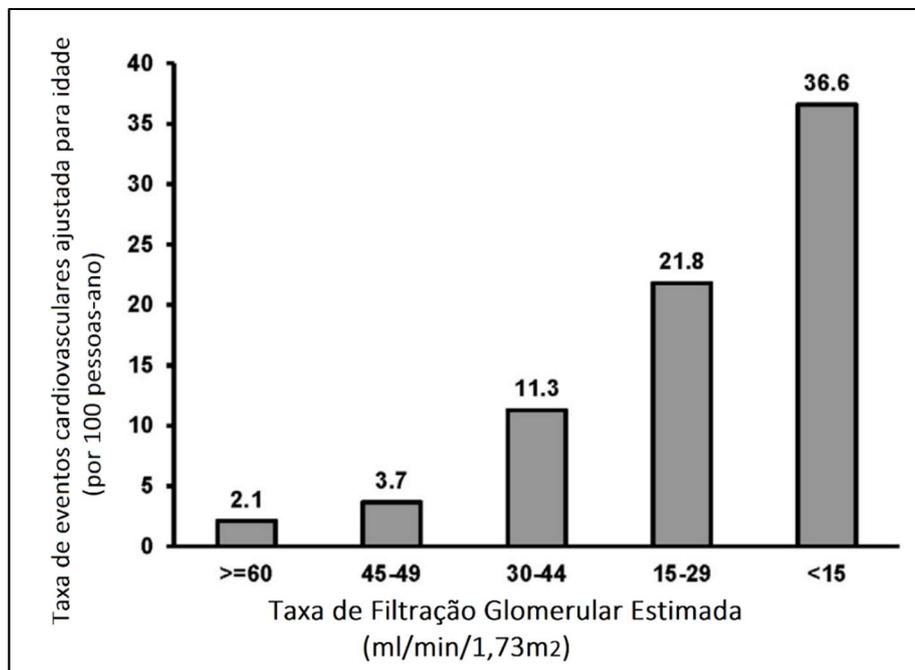
Todos estes avanços no entendimento da fisiopatologia da miocardiopatia urêmica, abrem caminho para novas possibilidades terapêuticas mais específicas, no intuito de reduzir a excessiva mortalidade desta população de pacientes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- A DOENÇA CARDIOVASCULAR NA DOENÇA RENAL CRÔNICA.

Apesar dos recentes avanços na prevenção e tratamento da doença cardiovascular (DCV), esta continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade na população de pacientes com DRC (Go, 2016). O risco de morte por qualquer causa ou de ocorrência de evento cardiovascular aumenta progressivamente à medida que cai o ritmo de filtração glomerular de modo que apenas um terço dos pacientes com DRC sobrevive até chegar à diálise (Figura 1 e Tabela 1) (Go *et al.*, 2004).

**Figura 1:** Taxa de evento cardiovascular por faixa de filtração glomerular.



Modificado de Go, 2016.

**Tabela 1:** Risco relativo de evento cardiovascular de acordo com a faixa de TFG.

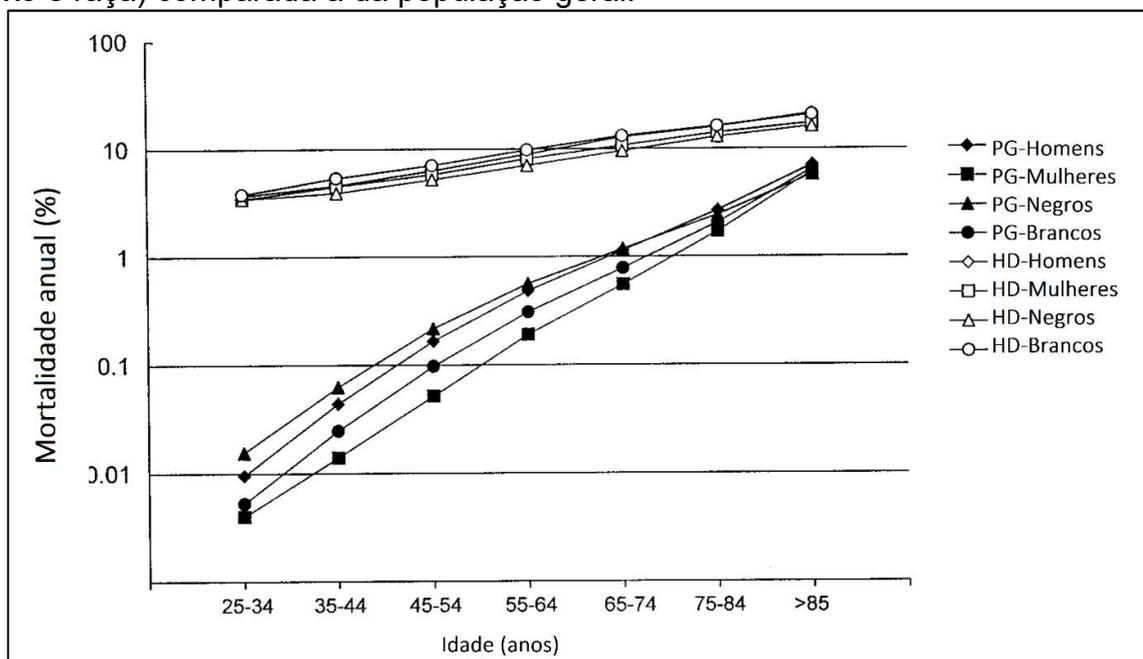
TFG estimada (ml/min/1,73m²)	Categoria DRC	Risco relativo (95% IC)
≥60		Grupo de referência
59-45	3a	1,4(1,4 – 1,5)
44-30	3b	2,0(1,9 – 2,1)
29-15	4	2,8(2,6 – 2,9)
≤15	5	3,4(3,1 – 3,8)

Abreviações: TGF – taxa de filtração glomerular. DRC – doença renal crônica. Modificado de Go, 2016.

Após o início da terapia de reposição renal (TRS), esta situação parece se agravar ainda mais como evidenciado por Foley et al. em seu clássico estudo no qual demonstra que um paciente com DRC dialítica na faixa etária entre 25 a 34 anos tem risco de morte comparável a pessoas da população geral na faixa etária entre 75 a 84

anos, ou seja, um risco mais de 100 vezes maior que o esperado para a sua faixa etária (Figura 2) (Foley *et al.*, 1998). Mesmo após mais de uma década de avanços no manejo do paciente com DRC dialítica, esta tendência permaneceu praticamente inalterada, como evidenciado por Roberts *et al.* em análise do Registro ANZDATA publicado em 2011 (Roberts *et al.*, 2011), evidenciando que há outros fatores fisiopatológicos ainda não controlados.

**Figura 2:** Taxa de mortalidade anual de pacientes com DRC dialítica ajustada (idade, sexo e raça) comparada à da população geral.



Abreviações: DRC- doença renal crônica, PG – população geral, HD – hemodiálise. Modificado de Foley *et al.*, 1998.

A causa deste grande aumento do risco cardiovascular na DRC já foi amplamente abordada por diversos autores e recai sobre novos fatores de risco relacionados à DRC que se associam aos fatores de risco cardiovasculares clássicos, muitos destes alterados pela DRC, resultando em um grande sinergismo entre eles e, tendo como consequência final, a elevada taxa de eventos e mortalidade cardiovasculares ( Tabela 2 e Figura 3) (Parfrey e Foley, 1999; Liu *et al.*, 2014).

Dentre os fatores de risco relacionados à DRC, o DMO-DRC ganhou grande destaque nas duas últimas décadas com o surgimento de evidências demonstrando: a participação ativa do fósforo na calcificação vascular (Jono *et al.*, 2000) e sua estreita relação com a mortalidade cardiovascular, o efeito direto do FGF23 sobre o

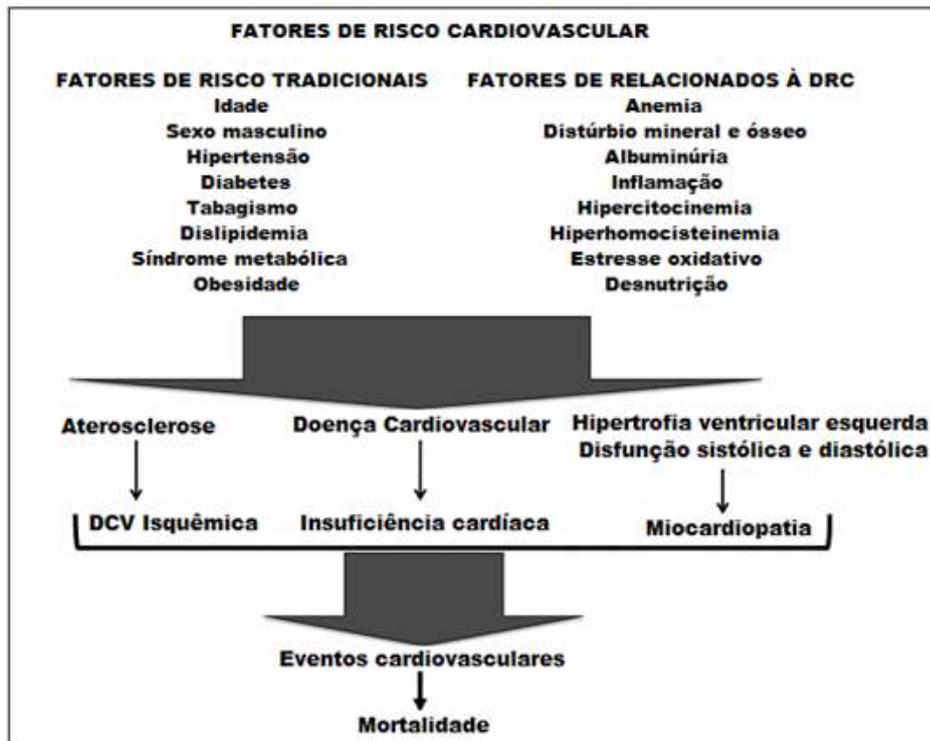
miocárdio induzindo hipertrofia (Faul *et al.*, 2011) e o efeito protetor da  $\alpha$ Klotho solúvel sobre o miocárdio (Hu *et al.*, 2015) e vasos (Hu *et al.*, 2011).

**Tabela 2:** Fatores de risco cardiovascular na DRC.

Fatores de risco tradicionais	Fatores de risco alterados pela DRC	Fatores de risco relacionados à DRC
Hipertensão arterial	Dislipidemia	Hipervolemia
Dislipidemia	Lipoproteína A elevada	Anemia
Diabetes Mellitus	Fatores protrombóticos	Estresse oxidativo
Tabagismo	Hiperhomocisteinemia	Inflamação
Sedentarismo	Hiperuricemia	Toxinas urêmicas
História familiar	Resistência insulínica	DMO – DRC
Sexo masculino		Acidose metabólica
Obesidade		Hipo ou hiperpotassemia

Abreviações: DRC – doença renal crônica, DMO-DRC – distúrbio mineral e ósseo da DRC. Modificado de Parfrey e Foley, 1999.

**Figura 3:** Representação esquemática da interação entre os fatores de risco cardiovascular tradicionais e os relacionados à DRC.

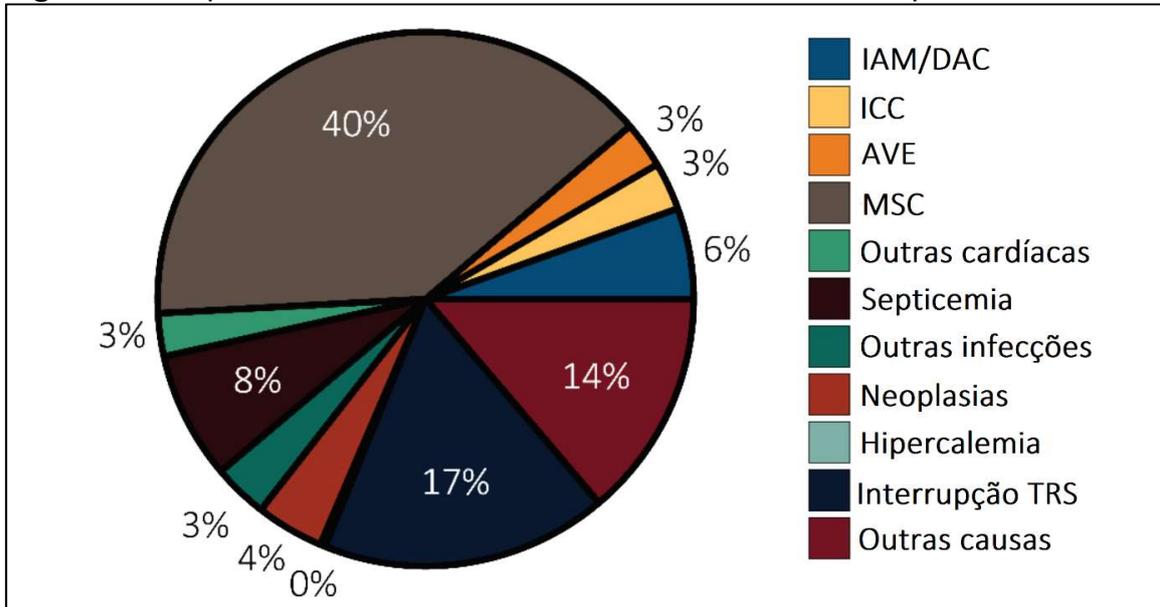


Modificado de Liu *et al.*, 2014.

Quando se avalia separadamente as causas cardiovasculares de óbito na DRC, chama a atenção o predomínio da morte súbita cardíaca, correspondendo a 40% de todas as causas de óbito na população dialítica pelos dados do Registro Americano

de Pacientes Renais (USRDS), superando a insuficiência cardíaca, o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico (Figura 4) (Saran *et al.*, 2018).

**Figura 4:** Frequências das causas identificadas de morte entre pacientes dialíticos.

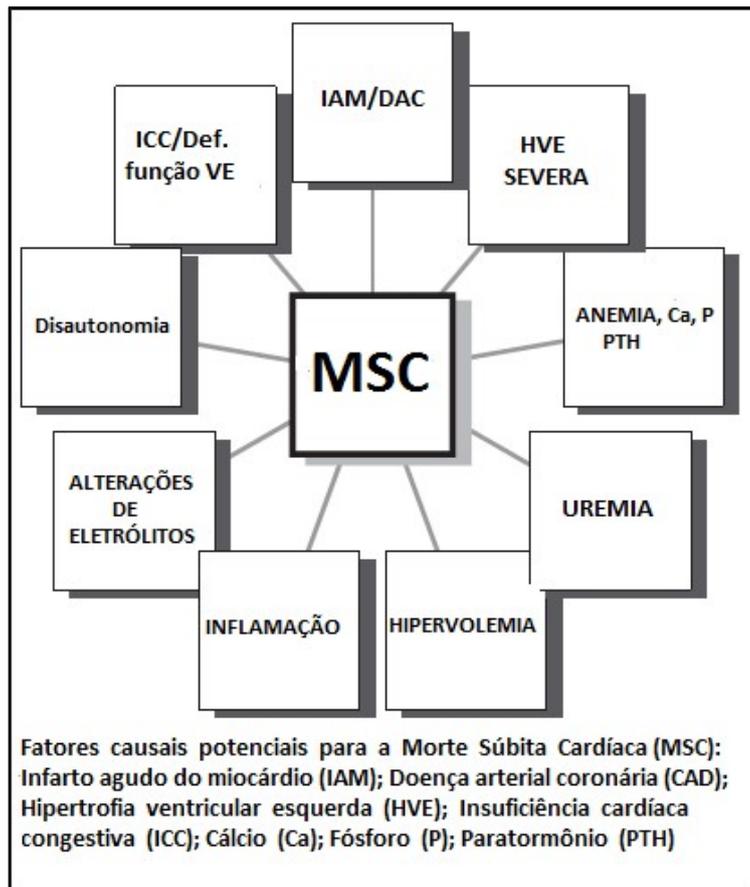


Abreviações: IAM – Infarto agudo do miocárdio, DAC – doença arterial coronária, AVE – acidente vascular encefálico, MSC – morte súbita cardíaca. **Fonte:** *United States Renal Data System. 2017 USRDS annual data report*

A Morte Súbita Cardíaca (MSC) é definida como morte inesperada por uma causa cardíaca que ocorre dentro de uma hora após o início dos sintomas (presenciada) ou dentro de 24 horas após a última observação em saúde normal de um indivíduo (Abhilash e Namboodiri, 2014). Sabe-se que a maior parte destes eventos se devem a arritmias ventriculares, sobretudo taquicardia ventricular e fibrilação ventricular (Herzog *et al.*, 2008; Israel, 2014).

Apesar da MSC poder ocorrer em indivíduos com miocárdio estruturalmente normal, a maioria ocorre em pacientes portadores de uma miocardiopatia subjacente que serve de substrato para a atuação de um gatilho, resultando em uma arritmia fatal (Herzog *et al.*, 2008). Na população geral, o gatilho mais frequente é a isquemia miocárdica aguda, porém na DRC dialítica uma série de outros gatilhos, ou fatores de risco, podem ser identificados. Dentre eles, podemos destacar: a anemia, fatores relacionados ao DMO-DRC (elevação do paratormônio (PTH), hipo ou hipercalemia e hiperfosfatemia), rápidas variações eletrolíticas, sobrecarga crônica de volume, inflamação, doença arterial coronariana, disfunção autonômica (hiperatividade simpática e disfunção do barorreflexo), fibrilação atrial, insuficiência cardíaca com disfunção sistólica e a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (Figura 5) (Alpert, 2011).

**Figura 5:** Fatores de risco para MSC na DRC dialítica.



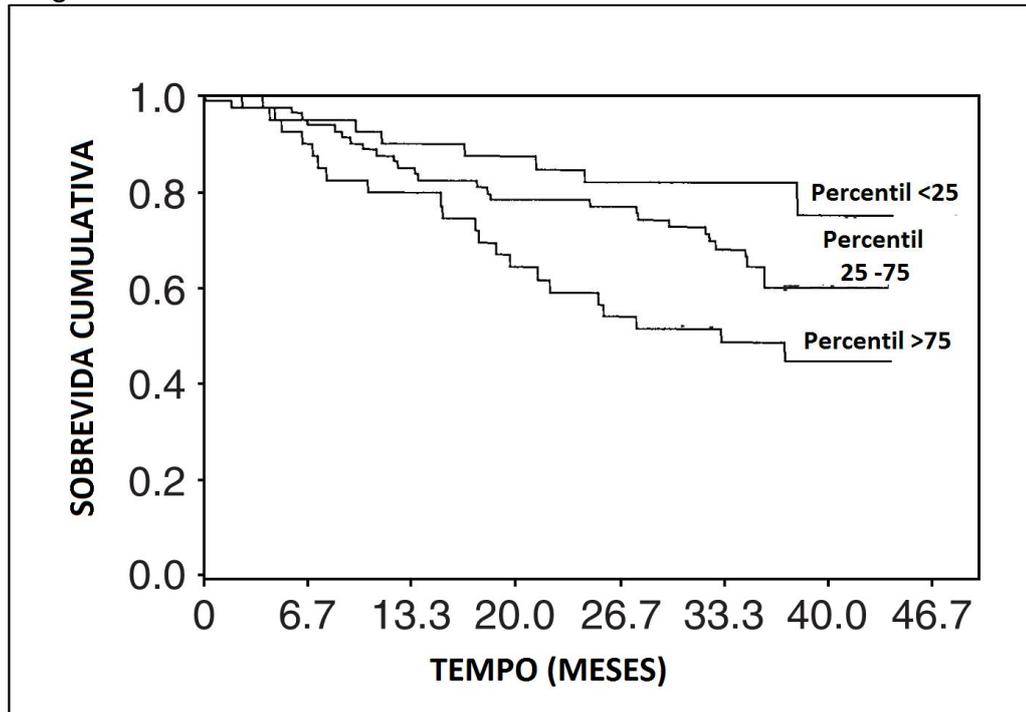
Modificado de Herzog et al., 2008.

Ao se avaliar na DRC a presença de um substrato miocárdico arritmogênico, ou seja, uma miocardiopatia, o que primeiro atrai a atenção é a alta prevalência de HVE. Nesta população, a HVE está presente mesmo em estágios bastante precoces da doença, podendo chegar a 65% dos pacientes na pré-diálise. Além disso, assim como o risco cardiovascular, a prevalência de HVE aumenta com a queda da filtração glomerular. No início da diálise, 75% dos pacientes adultos e 69% dos pacientes pediátricos apresentam HVE, podendo chegar a praticamente 100% dos pacientes após cinco anos em diálise (Parfrey *et al.*, 1990; Foley *et al.*, 1995; Foley *et al.*, 2000).

O impacto negativo da HVE na sobrevivência da população em diálise é muito elevado. Vários estudos que utilizaram avaliação ecocardiográfica seriada no acompanhamento de pacientes em TRS, evidenciaram forte correlação positiva entre a presença e gravidade da HVE e morbimortalidade cardiovascular (Parfrey *et al.*, 1990; Foley *et al.*, 1995; Parfrey *et al.*, 1996; Foley *et al.*, 2000). Em estudo prévio, Zoccali *et al.* demonstraram que a progressão da HVE, ou seja, o incremento na massa ventricular em pacientes dialíticos está associado a mortalidade e eventos

cardiovasculares, independente da massa ventricular basal e de fatores de risco cardiovasculares. Desta forma, pacientes que apresentaram maior incremento na massa ventricular, também apresentaram pior prognóstico (Figura 6) (Zoccali *et al.*, 2004).

**Figura 6:** Sobrevida cumulativa de acordo com o ganho de massa ventricular ao ecocardiograma.



Modificado de Zoccali *et al.*, 2004.

Este achado observacional provavelmente reflete o que está acontecendo a nível do tecido miocárdico dos pacientes renais crônicos, sendo a HVE o reflexo do processo fisiopatológico subjacente que leva ao desenvolvimento de uma miocardiopatia característica de pacientes renais crônicos e, por conseguinte, denominada de “Miocardiopatia Urêmica” (Zoccali *et al.*, 2004).

## 2.2 – MIOCARDIOPATIA RELACIONADA À DRC (MIOCARDIOPATIA URÊMICA)

### 2.2.1 – A Evolução do conceito.

Em 1967, Bailey *et al.* publicaram o primeiro estudo descrevendo a presença em quatro pacientes de uma provável miocardiopatia relacionada à uremia,

destacando a presença de importante cardiomegalia e a sua possível reversibilidade com restrição proteica. Tratava-se de pacientes muito urêmicos, com níveis de creatinina e ureia muito elevados (em média 25mg/dl e 338mg/dl respectivamente) mantidos em tratamento conservador (George L. Bailey, 1967).

Quase uma década depois, em 1975, Ianhez, Lowen e Sabbaga, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, publicaram o relato de sete casos de pacientes renais crônicos que apresentaram quadro sugestivo de miocardiopatia e pericardite que melhoraram após o início de hemodiálise ou transplante renal (Ianhez *et al.*, 1975).

Após esses relatos de casos de disfunção miocárdica em pacientes urêmicos, foi cunhado o termo “coração urêmico” ou “miocardiopatia urêmica”, criando-se um grande debate sobre a existência ou não desta entidade e sobre quais seriam os mecanismos fisiopatológicos envolvidos (Nik-Akhtar *et al.*, 1978; Drueke *et al.*, 1980; Hung *et al.*, 1980; Lubbecke *et al.*, 1986; Grollier *et al.*, 1990). Dentre os fatores aventados àquela época como participantes da fisiopatologia da miocardiopatia urêmica, destacaram-se as toxinas urêmicas em conjunto, a hipervolemia crônica, a anemia, o excesso de catecolaminas circulantes, a deficiência de L-carnitina e o hiperparatireoidismo secundário (Drueke e Le Pailleur, 1986; London *et al.*, 1987).

Avaliando estes estudos históricos, pode-se observar que o termo miocardiopatia urêmica foi cunhado na época em que a TRS estava começando e na qual o quadro clínico de franca uremia era o usual. Nestes pacientes, observava-se uma cardiomegalia severa, muitas vezes associada a pericardite e predomínio de disfunção sistólica (Nik-Akhtar *et al.*, 1978). Na histologia do miocárdio obtido de necropsias ou de biopsias miocárdicas *post mortem*, observava-se sobretudo hipertrofia e “degeneração” de cardiomiócitos, com edema e fibrose intersticial (Nik-Akhtar *et al.*, 1978).

Com o aperfeiçoamento da terapia dialítica, observou-se melhora clínica importante dos pacientes, com melhora da função cardíaca e aumento da sobrevida (Hung *et al.*, 1980). O tratamento dialítico proporcionara a atenuação da uremia propriamente dita, correção da hipervolemia, dos distúrbios hidroeletrólíticos e ácido-base e a melhora nutricional dos pacientes, com correção parcial da anemia (Hung *et al.*, 1980). Entretanto, mesmo após a correção desses fatores que provavelmente participam da fisiopatologia da HVE em pacientes dialíticos, esta continua muito prevalente e precoce nos pacientes com DRC. Compreende-se, portanto, que a

patogenia da miocardiopatia relacionada à DRC é multifatorial e que, além desses fatores controlados pela diálise, persistem outros com papéis fisiopatológicos ainda não totalmente conhecidos (London *et al.*, 1987; Alhaj *et al.*, 2013).

### 2.2.2 - Papel do DMO-DRC na Miocardiopatia relacionada à DRC.

Com os avanços no tratamento do paciente urêmico e, como mencionado acima, com a correção das alterações mais evidentes relacionadas à uremia, o DMO-DRC passou a ganhar destaque na fisiopatologia da miocardiopatia urêmica, passando a ser fortemente relacionada a eventos e mortalidade cardiovasculares.

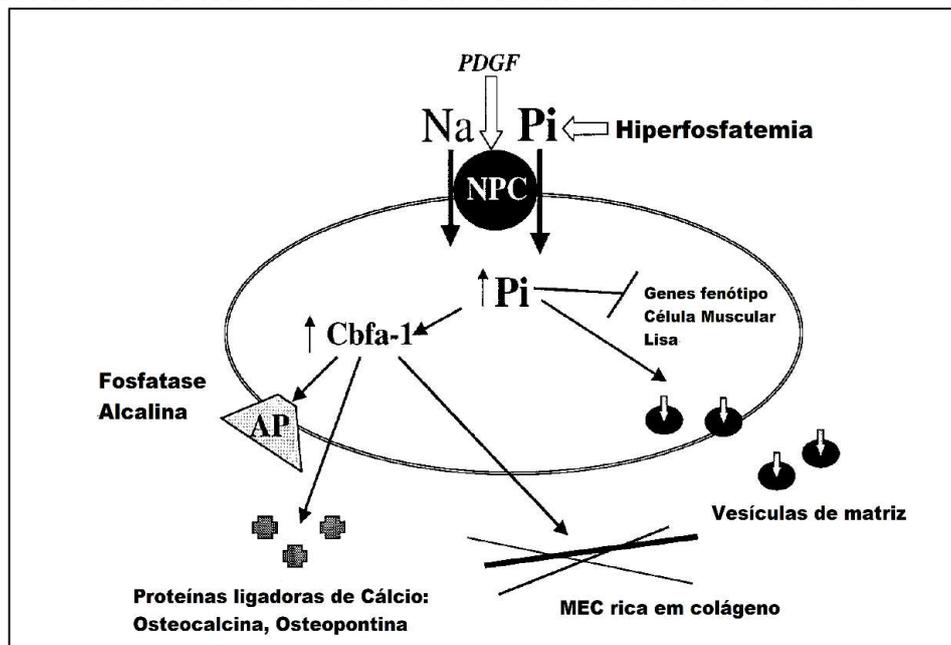
Primeiramente, observou-se que o hiperparatireoidismo secundário se associava não só com a calcificação vascular, mas também com a presença de hipertrofia miocárdica e disfunção cardíaca (London *et al.*, 1987). Atualmente, sabe-se que estas alterações podem ocorrer mesmo no hiperparatireoidismo primário, no qual foi observada correlação entre os níveis elevados de PTH e baixos de vitamina D com a massa ventricular e o grau de disfunção diastólica, sendo estes achados reversíveis após o tratamento cirúrgico e correção dos níveis de PTH (Walker *et al.*, 2010). As prováveis explicações fisiopatológicas apoiam-se na observação de maior incidência de hipertensão arterial sistêmica em pacientes com hiperparatireoidismo primário, além da demonstração *in vitro* de aumento no influxo de cálcio para cardiomiócitos e *in vivo* de elevação dos níveis séricos de aldosterona com consequente ativação dos receptores mineralocorticoides no cardiomiócito (Andersson *et al.*, 2004; Tomaschitz *et al.*, 2012; Tomaschitz *et al.*, 2014). Custódio *et al.* em elegante estudo experimental em ratos submetidos simultaneamente à nefrectomia 5/6 e paratireoidectomia, conseguiram individualizar em diferentes grupos o grau de reposição de PTH e o conteúdo de fósforo da ração e, deste modo, demonstraram que tanto os níveis de PTHi como sobrecarga de fósforo participam de forma independente da remodelação miocárdica (Custodio *et al.*, 2012)

Recentemente, com o melhor entendimento do papel ativo da sobrecarga de fósforo na calcificação vascular, induzindo a transformação fenotípica das células musculares lisas dos vasos em células osteoblasto-símile (Jono *et al.*, 2000), o fósforo passou a ter papel central na fisiopatologia do DMO-DRC e a ele ser imputada grande parte da responsabilidade pela mortalidade cardiovascular (Tentori *et al.*, 2008;

Naves-Diaz *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 2011; Gonzalez-Parra *et al.*, 2012; Ritter e Slatopolsky, 2016). Atualmente, a calcificação vascular é vista como um processo regulado por células em que ocorre deposição ectópica de matriz óssea e sais de cálcio e fósforo, sobretudo na camada muscular das artérias e válvulas cardíacas (Jono *et al.*, 2000).

Neste processo, os níveis elevados de fósforo no extracelular ativaria co-transportadores sódio-fósforo tipo 3 (PIT-1 e PIT-2) das células musculares lisas da camada média das artérias, elevando os níveis intracelulares de fósforo e induzindo a expressão de uma série de genes relacionados à formação óssea (Figura 7) (Giachelli *et al.*, 2001).

**Figura 7:** Mecanismo pelo qual o fósforo causa a transformação fenotípica das células musculares lisas dos vasos em células osteoblasto-símiles.



Abreviações: PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas, NPC – Co-transportador sódio-fósforo, Na – Sódio, Pi – Fósforo inorgânico, Cbfa-1 - *Core-binding factor alpha-1*. Modificado de Giachelli *et al.*, 2001.

Além de estar relacionada a calcificação vascular e espessamento da parede das artérias, demonstrou-se que a hiperfosfatemia também apresenta toxicidade para as células endoteliais, causando disfunção endotelial, liberação de micropartículas derivadas da membrana com ação pró-coagulante e apoptose das mesmas, sendo este efeito sobre as células endoteliais também dependente dos co-transportadores sódio-fósforo tipo 3 (PIT-1 e PIT-2) (Di Marco *et al.*, 2008; Shuto *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2014).

A sobrecarga de fósforo sistêmica também exerce citotoxicidade através da formação de nanopartículas com cálcio e fetuína-A, referidas como partículas calciproteicas (CPPs). CPPs são partículas altamente bioativas que podem induzir várias respostas celulares, inclusive participar da transformação osteogênica de células musculares lisas vasculares e da morte celular no endotélio vascular e epitélio tubular renal. Além disso, evidências sugerem que as CPPs possam ativar macrófagos e induzir resposta inflamatória não só local, mas também sistêmica (Kuro, 2013).

Por outro lado, ainda não há evidência suficiente que implique efeito direto da sobrecarga de fósforo sobre a hipertrofia miocárdica. No entanto, vários estudos observacionais demonstraram associação positiva entre a hiperfosfatemia e HVE na DRC (Patel *et al.*, 2009; Chue *et al.*, 2012). Mesmo na população geral há uma correlação positiva entre a sobrecarga de fósforo e HVE, assim como maior mortalidade (Dhingra *et al.*, 2007; Foley *et al.*, 2009). Experimentalmente, foi demonstrado hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose miocárdica em animais expostos à sobrecarga de fósforo (Amann *et al.*, 2003). Além disso, a hiperfosfatemia induz *in vitro* a apoptose de cardiomiócitos e aumenta a capacidade de migração de células musculares lisas, ou seja, favorece a sua transformação em miofibroblastos, podendo *in vivo* corresponder a translocação dessas células da parede dos vasos para o interstício miocárdico (Rangrez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Porém em todos estes estudos não foram levados em conta os níveis de FGF23 e  $\alpha$ Klotho circulantes.

Em resumo, a sobrecarga de fósforo na DRC induz diretamente calcificação vascular coronária e sistêmica, calcificação de válvulas cardíacas e disfunção e apoptose de células endoteliais, podendo indiretamente levar a HVE. Por outro lado, a hiperfosfatemia pode induzir a apoptose de cardiomiócitos o que levaria a hipertrofia secundária dos cardiomiócitos remanescentes. Além disso, pode aumentar fibrose miocárdica por induzir a migração de células musculares lisas dos vasos miocárdicos e sua transformação em miofibroblastos, o que pode justificar as áreas de fibrose perivascular comumente vista na miocardiopatia relacionada à DRC (Amann *et al.*, 2003; Rangrez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Além do mais, a sobrecarga de fósforo induz alterações hormonais compensatórias que favorecem o desenvolvimento de miocardiopatia, através da elevação dos níveis circulantes de FGF23 e redução dos níveis de 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) (Gonzalez-Parra *et al.*, 2012).

### 2.2.3 - Papel do FGF23 no DMO-DRC e Miocardiopatia relacionada à DRC.

O FGF23 foi primeiramente descrito como fator patogênico em uma rara síndrome clínica denominada Raquitismo Hipofosfatêmico Autossômico Dominante (ADHR). Nesta síndrome, os níveis séricos inapropriados de FGF23 causam perda renal excessiva de fosfato, conseqüente hipofosfatemia, níveis muito baixos de 1,25-(OH)2-D3 e osteomalácia (Consortium, 2000). No extremo oposto, na síndrome da Calcínose Tumoral Familiar, há perda da atividade do FGF23 com conseqüente hiperfosfatemia, níveis elevados de 1,25-(OH)2-D3, calcificações ectópicas e vasculares e morte prematura (Saito e Fukumoto, 2009). Estas duas síndromes clínicas raras forneceram as primeiras evidências do papel fisiológico do FGF23, sendo, através de estudos posteriores, demonstrado que o FGF23 é o principal hormônio fosfatúrico e responsável pela homeostase dos níveis séricos de fósforo, independente de variações na ingesta diária (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013).

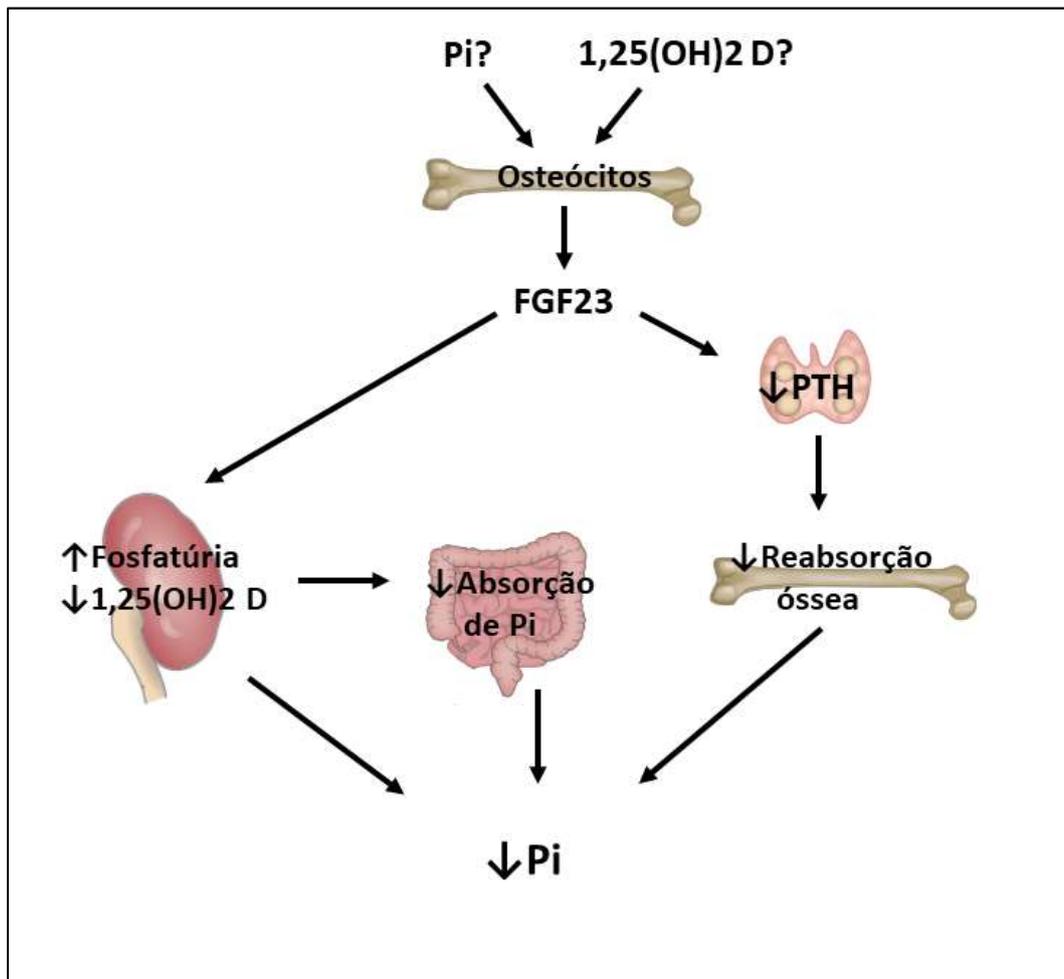
O FGF23 pertence à família dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) endócrinos e é expresso a partir do gene de mesmo nome presente no cromossomo 12 em humanos. É transcrito na forma de um peptídeo de 251 aminoácidos (32-kDa) e secretado, sobretudo pelos osteócitos, na forma de um glicopeptídeo com 227 aminoácidos. Sua sequência peptídica pode ser dividida em um domínio N-terminal (177aa) que tem grande homologia com os demais FGFs e um domínio C-terminal único (72aa) com grande afinidade pelo seu co-receptor. Entre estes dois domínios há um local de clivagem proteolítica que leva a inativação do FGF23. Sendo uma característica dos FGFs endócrinos, o FGF23 não possui na sua cadeia peptídica a região de ligação de heparan sulfato, que é o co-receptor dos receptores de FGFs parácrinos, o que confere baixa afinidade pelos mesmos. Desta forma, após ser secretado, o FGF23 não se liga aos receptores das células vizinhas, alcançando a circulação e agindo a distância, em tecidos onde há a expressão de seu co-receptor  $\alpha$ Klotho, principalmente rins e paratireoides (Saito e Fukumoto, 2009).

O FGF23 atua principalmente através da sua ligação no receptor de FGF tipo 1c (FGFR1c) associado ao seu co-receptor  $\alpha$ Klotho que torna este receptor altamente específico para o FGF23. Sem a presença do co-receptor  $\alpha$ Klotho, a afinidade do FGF23 pelo receptor é muito baixa (Urakawa *et al.*, 2006). Nos rins, após a ligação do FGF23 ao complexo  $\alpha$ Klotho/FGFR1c e indução da sinalização intracelular, ocorre o bloqueio da externalização dos co-transportadores sódio-fósforo tipo 2a e 2c (NaPi-

2a e 2c) na membrana das células da borda em escova dos túbulos proximais, o que bloqueia a reabsorção de fósforo do filtrado, resultando em aumento da fosfatúria (Urakawa *et al.*, 2006; Saito e Fukumoto, 2009).

Além do efeito fosfatúrico, o FGF23 bloqueia a atividade da  $1\alpha$ -hidroxilase renal e aumenta a atividade da 24-hidroxilase, bloqueando a síntese de  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$  e aumentando a sua degradação, resultando na diminuição dos níveis séricos de  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ , o que leva à diminuição da absorção intestinal de fósforo. Por fim o FGF23 reduz os níveis séricos de PTH por bloquear a sua secreção, reduzindo assim a reabsorção óssea e a liberação de fósforo na circulação (Figura 8) (Saito e Fukumoto, 2009).

**Figura 8:** Ações do FGF23 na homeostase do fósforo.



Abreviações: Pi – fosfato inorgânico,  $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$  – 1,25-diidroxicolecalciferol, FGF23 – Fator de crescimento de fibroblasto 23, PTH – paratormônio. Fonte: (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013)

Na DRC, à medida que o número de néfrons é reduzido e tende a ocorrer balanço positivo de fósforo no organismo, os níveis séricos de FGF23 se elevam compensatoriamente para aumentar a fosfatúria, diminuir a absorção intestinal e liberação óssea de fosfato. Desta forma só observamos hiperfosfatemia em fases avançadas da DRC, enquanto os níveis séricos de FGF23 se elevam precocemente e chegam a níveis extremamente elevados na fase dialítica (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013).

A elevação compensatória dos níveis séricos de FGF23 na DRC para manter a homeostase do fósforo no organismo que a princípio supõe-se benéfico, contrapõe-se aos múltiplos estudos observacionais que correlacionam positivamente estes níveis elevados de FGF23 com maior mortalidade geral e cardiovascular, sobretudo na população em diálise. Além disso, essa maior mortalidade ocorre de forma independente dos níveis séricos de fósforo, sugerindo um efeito deletério direto do FGF23 (Gutierrez *et al.*, 2008; Jean *et al.*, 2009; Isakova *et al.*, 2011).

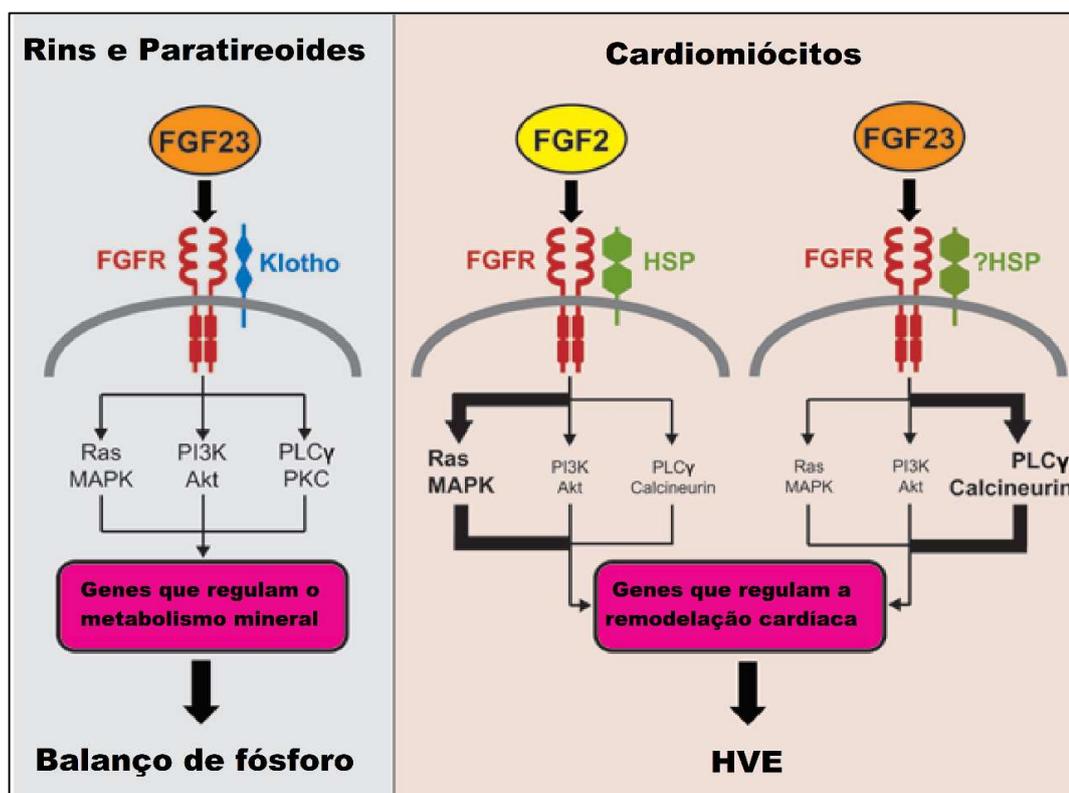
Após a observação da associação dos níveis circulantes de FGF23 com mortalidade na DRC, também foi observada associação positiva entre os níveis séricos de FGF23 e a prevalência de HVE, tanto em pacientes em tratamento conservador como em diálise (Hsu e Wu, 2009; Canziani *et al.*, 2011). Além disso, O estudo EVOLVE demonstrou que o tratamento com cinacalcet diminui significativamente os níveis séricos de FGF23, associando-se com menores taxas de eventos e morte cardiovascular (Moe *et al.*, 2015). Essa associação pôde então sugerir a hipótese de causalidade, ou seja, a hipótese de que o FGF23 pode induzir a HVE e por isso aumentar a mortalidade.

Em 2011, Faul *et al.* demonstraram *in vitro* que o FGF23 causa hipertrofia de cardiomiócitos isolados pela ativação da via de sinalização calcineurina / NFAT. Embora mediada por um receptor de FGF, esta ação era independente do co-receptor  $\alpha$ Klotho. Além disso, foi demonstrado *in vivo* que a injeção de FGF23 resultou em HVE. Esses achados revelaram um papel causal do FGF23 na patogênese da HVE na DRC e sugerem que níveis cronicamente elevados de FGF23 em pacientes em diálise podem contribuir para o desenvolvimento de HVE e mortalidade nessa população (Figura 9) (Faul *et al.*, 2011).

Em 2012, Shalhoub *et al.* analisaram o efeito a longo prazo da neutralização de FGF23 através do uso anticorpo monoclonal anti-FGF23 em um modelo experimental de DRC. Surpreendentemente, embora a neutralização do FGF23 tenha melhorado os níveis de PTH sérico e 1,25-di-hidroxivitamina D, não houve impacto nos

parâmetros relativos a hipertrofia miocárdica. Além disso, animais tratados apresentaram hiperfosfatemia, aumento da calcificação vascular e maior mortalidade (Shalhoub *et al.*, 2012). Neste estudo, por causa da alta eficiência do anticorpo monoclonal utilizado, os níveis circulantes de FGF23 foram drasticamente reduzidos para níveis “sub-fisiológicos”, o que pode explicar os resultados negativos desta estratégia terapêutica. Desta forma, pode-se concluir que mesmo podendo apresentar efeito deletério sobre o miocárdio quando em níveis muito elevados (má adaptação), o FGF23 ainda apresenta efeito benéfico para o organismo (níveis compensatórios), protegendo-o de um efeito ainda pior que seria o da sobrecarga de fósforo.

**Figura 9:** Mecanismo pelo qual o FGF23 induz HVE.



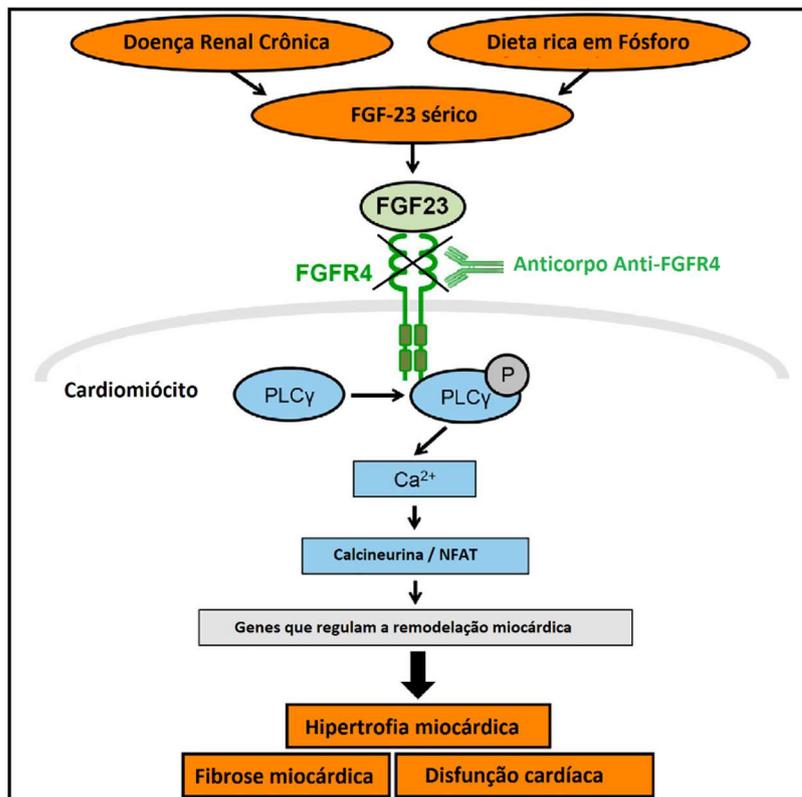
Abreviações: FGF23 – fator de crescimento de fibroblasto-23, HVE – hipertrofia ventricular esquerda, FGFR – Receptor de fator de crescimento de fibroblasto, HSP – Heparan sulfato, FGF2 – fator de crescimento de fibroblasto-2, Ras-MAPK – via da *Mitogen-activated protein kinase*, PI3K-AKT – via da proteína quinase B, PLCγ -PKC – via da proteína quinase C. Modificado de Faul *et al.*, 2011.

Recentemente, Grabner *et al.* demonstraram que o FGF23 atua sobre o miocárdio ativando o receptor de FGF tipo 4 (FGFR4) de forma independente do co-receptor  $\alpha$ Klotho, ativando a via PLC $\gamma$ /Calcineurina/NFAT e que o bloqueio deste receptor com uso de anticorpo monoclonal protege da indução de HVE pelo FGF23 (Figura 10) (Grabner *et al.*, 2015).

Estudos recentes indicam que o FGF23 também pode ser expresso no coração, sobretudo em vários cenários clínicos e experimentais de remodelamento e insuficiência cardíaca. No miocárdio, o FGF23 pode ser expresso não só em cardiomiócitos como em outras células, incluindo fibroblastos cardíacos, músculo liso vascular e células endoteliais em artérias coronárias e em macrófagos inflamatórios. Desta forma, o FGF23 localmente produzido pode, além de induzir hipertrofia dos cardiomiócitos, induzir vias pró-fibróticas e pró-inflamatórias, agindo de forma autócrina/parácrina (Leifheit-Nestler *et al.*, 2016; Leifheit-Nestler e Haffner, 2018).

Deste modo, o FGF23 apresenta não só um efeito fisiológico compensatório importante no controle da sobrecarga de fósforo na DRC, mas também um papel importante na fisiopatologia da miocardiopatia relacionada à DRC através da ligação aos FGFR4 miocárdicos, podendo o bloqueio dos mesmos representar um alvo terapêutico promissor. Por outro lado, sendo a DRC uma situação de deficiência de  $\alpha$ Klotho circulante e sabendo-se que o miocárdio não expressa  $\alpha$ Klotho, o efeito da reposição de  $\alpha$ Klotho na modulação do efeito do FGF23 sobre o miocárdio também merece ser avaliado.

**Figura 10:** Papel do receptor de FGF tipo 4 na HVE induzida pelo FGF23.



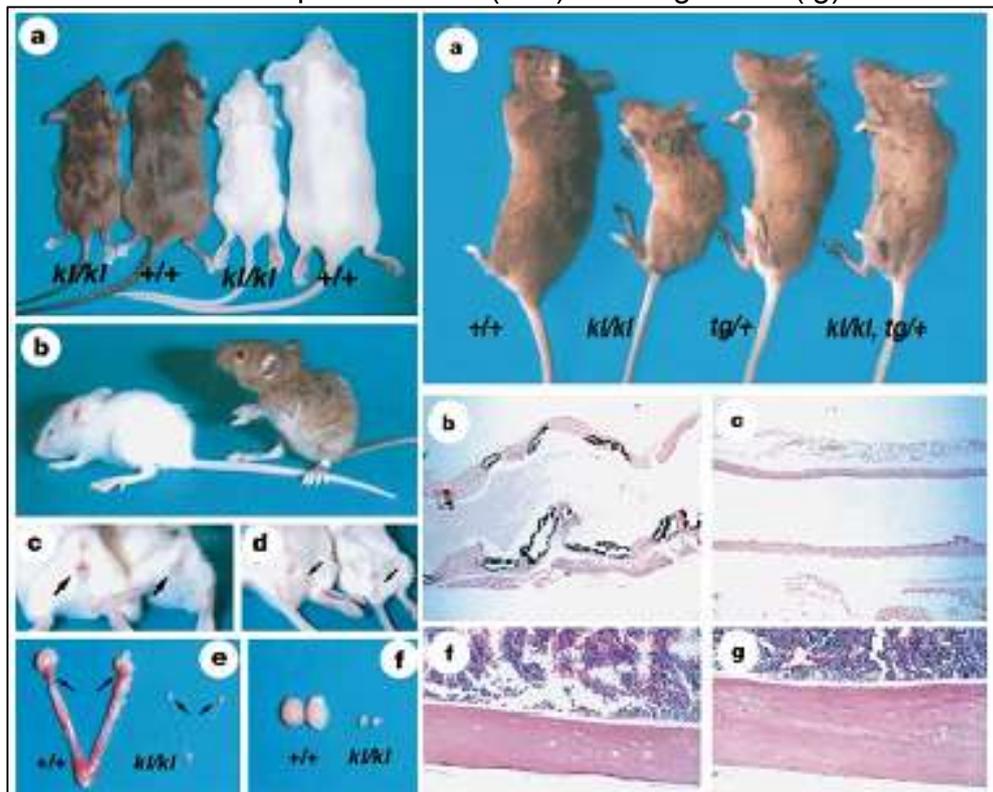
Abreviações: FGFR4 – receptor 4 do fator de crescimento de fibroblasto, PLC $\gamma$  - fosfolipase C $\gamma$ , NFAT – Fator de transcrição NFAT. Modificado de Grabner *et al.*, 2015.

### 2.3 – KLOTHO

O gene Klotho foi identificado acidentalmente por Makoto Kuro-o em 1997 durante tentativa de gerar uma linhagem de camundongos transgênicos espontaneamente hipertensos. Após a microinjeção do transgene, este não se expressou, porém, a sua integração no genoma do camundongo, acabou por alterar a região do *promoter* de outro gene, bloqueando a sua expressão (Kuro-O *et al.*, 1997).

Estes animais transgênicos não apresentaram alterações fenotípicas até a terceira ou quarta semanas, porém a partir daí, desenvolveram múltiplas alterações fenotípicas que se assemelhavam ao envelhecimento precoce. Estas alterações incluíam: retardo do crescimento, hipogonadismo hipogonadotrófico, rápida atrofia do timo, atrofia da pele, sarcopenia, calcificações vasculares, osteopenia, enfisema pulmonar, déficit cognitivo, perda de audição, degeneração do neurônio motor e morte prematura com 2 meses de vida, ou seja, apresentavam 5-6% da sobrevivência do camundongo selvagem (Figura 11) (Kuro-O *et al.*, 1997).

**Figura 11:** Comparação entre camundongos selvagens (+/+) e camundongos knockout para  $\alpha$ Klotho (kl/kl) e transgênicos (tg).



Abreviações: kl/kl – camundongo *knockout* para o gene klotho, TG – camundongo transgênico para klotho.  
 Fonte: (Kuro-O *et al.*, 1997)

Em contraste, o camundongo transgênico que hiperexpressava este gene, vivia cerca de 30% a mais que o selvagem. Por isso este gene ficou inicialmente registrado como um gene regulador do processo de envelhecimento, aumentando o tempo de vida quando hiperexpresso e diminuindo quando bloqueado. A este gene foi dado o nome de uma das três deusas da mitologia grega responsáveis por tecer, medir e cortar o fio da vida, no caso o nome da deusa Klotho que seria a responsável por tecer o fio da vida (Kuro-O *et al.*, 1997).

### 2.3.1- O gene Klotho e seus produtos.

O gene Klotho (KL) é composto de cinco éxons, que transcreve um mRNA com 3042 nucleotídeos e codifica a proteína de mesmo nome Klotho ( $\alpha$ Klotho). O gene KL está localizado no cromossomo 5 nos camundongos, no cromossomo 12 nos ratos e no 13 em humanos e apresenta grande homologia entre as espécies (Xu e Sun, 2015). Após a identificação do gene KL, foram identificadas no *GenBank* sequências homólogas que levaram a clonagem e identificação de dois outros genes que codificam proteínas da mesma família: o  $\beta$ Klotho e  $\gamma$ Klotho (Ito *et al.*, 2000). Das três proteínas da família Klotho, a  $\alpha$ Klotho é a mais estudada (Figura 12).

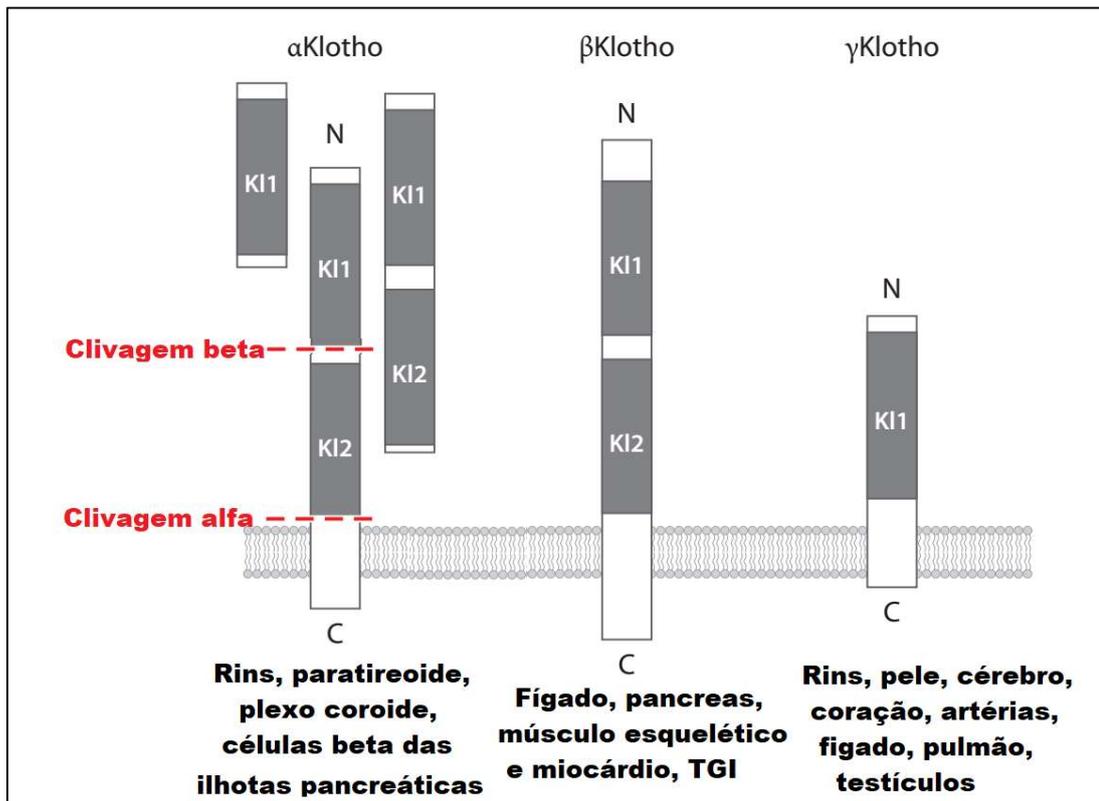
Foram descritos três formas de  $\alpha$ Klotho:  $\alpha$ Klotho transmembrana “*full-length*”,  $\alpha$ Klotho solúvel (sKlotho) e  $\alpha$ Klotho secretada. Todas as três proteínas foram detectadas em humanos e camundongos, mas apenas a forma transmembrana completa e a forma solúvel foram detectadas em ratos (Kuro-O, 2010).

A  $\alpha$ Klotho “*full-length*” é uma proteína transmembrana tipo1 com única passagem pela membrana e que apresenta 1014 aminoácidos e  $\approx$ 130kDa. A sua porção N-terminal (1-33aa) é hidrofóbica e induz a sua translocação do citosol para a membrana. A porção transmembrana apresenta 20aa, permanecendo uma pequena porção intracelular de 9aa sem atividade funcional conhecida. A porção extracelular é composta por duas subunidades KL1 e KL2 ( $\approx$ 65kDa) com homologia entre si (Wang e Sun, 2009; Kuro-O, 2010; Sopjani *et al.*, 2015).

Esta forma completa ligada a membrana pode ser clivada por proteases ancoradas na membrana (ADAM10, ADAM17, BCL1) liberando a forma solúvel da  $\alpha$ Klotho. A clivagem tipo “alfa” libera o fragmento completo de  $\approx$ 130kDa contendo as subunidades KL1 e KL2, enquanto a clivagem tipo “beta”, libera fragmento com apenas a subunidade KL1 (Wang e Sun, 2009; Kuro-O, 2010; Sopjani *et al.*, 2015).

A terceira forma da proteína  $\alpha$ Klotho, a secretada, é fruto de “*splicing*” alternativo do mRNA do gene KL, sendo composta apenas da subunidade KL1 com  $\approx 68$ kDa e parece ser fruto de erro no processamento de RNA mensageiro em situações de doença renal, podendo significar mais um mecanismo implicado na redução de  $\alpha$ Klotho solúvel (Chen *et al.*, 2018).

**Figura 12:** Proteínas Klotho.



Modificado de Hu, Shiizaki et al., 2013.

### 2.3.2- Expressão e funções.

A proteína  $\alpha$ Klotho é expressa em poucos tecidos e órgãos, incluindo os rins, as glândulas paratireoides, o plexo coroide, as ilhotas do pâncreas, gônadas, glândula pituitária e o nó sinoatrial (Hu, Kuro-O, *et al.*, 2013).

Os rins são o local onde mais se expressa  $\alpha$ klotho assim como é a fonte sistêmica de sKlotho tanto sanguínea como urinária. Além disso o rim é também o principal responsável pela depuração da sKlotho circulante (Hu, Kuro-O, *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016).

Tanto o túbulo contorcido proximal como o distal expressam  $\alpha$ Klotho em abundância na sua face basolateral. No entanto, para que desempenhe sua função como co-receptor do FGF23, é necessário que a proteína  $\alpha$ Klotho de membrana forme um complexo binário com o FGFR1c (Hu *et al.*, 2016).

Desta forma, como já mencionado, após a ligação do FGF23 ao complexo FGFR1c/ $\alpha$ Klotho na face basolateral das células dos túbulos contorcidos proximais, desencadeia-se a sinalização intracelular pela via FRS2 $\alpha$ /MAPK/ERK1/2, resultando na menor expressão de co-transportadores NaPi tipo 2a e 2c (NaPi2a e NaPi2c) na borda em escova da face luminal das células tubulares, levando a menor absorção de fosfato do filtrado glomerular e, conseqüentemente, aumento da fosfatúria (Sopjani *et al.*, 2015).

Além dos efeitos relacionados ao metabolismo mineral desempenhados pelo  $\alpha$ Klotho transmembrana como co-receptor do FGF23, após clivagem, a  $\alpha$ Klotho na sua forma solúvel passa a ter inúmeras ações pleiotrópicas independentes do FGF23, atuando de forma autócrina, parácrina e mesmo endócrina (Erben, 2016).

Nos rins, tanto a sKlotho como a  $\alpha$ Klotho transmembrana expressa nas células tubulares são eliminadas na urina através de transcitose transepitelial, ou seja, passam da face basolateral para a luminal por via transcelular. Uma vez na luz tubular, a  $\alpha$ Klotho solúvel modula a função de canais iônicos como TRPV5, favorecendo a reabsorção de cálcio, de transportadores como ROMK1, aumentando o efluxo de potássio, e dos co-transportadores NaPi 2a e 2c já expressos na membrana, diminuindo a absorção de fosfato (Cha *et al.*, 2009; Erben, 2016; Sopjani e Dermaku-Sopjani, 2016).

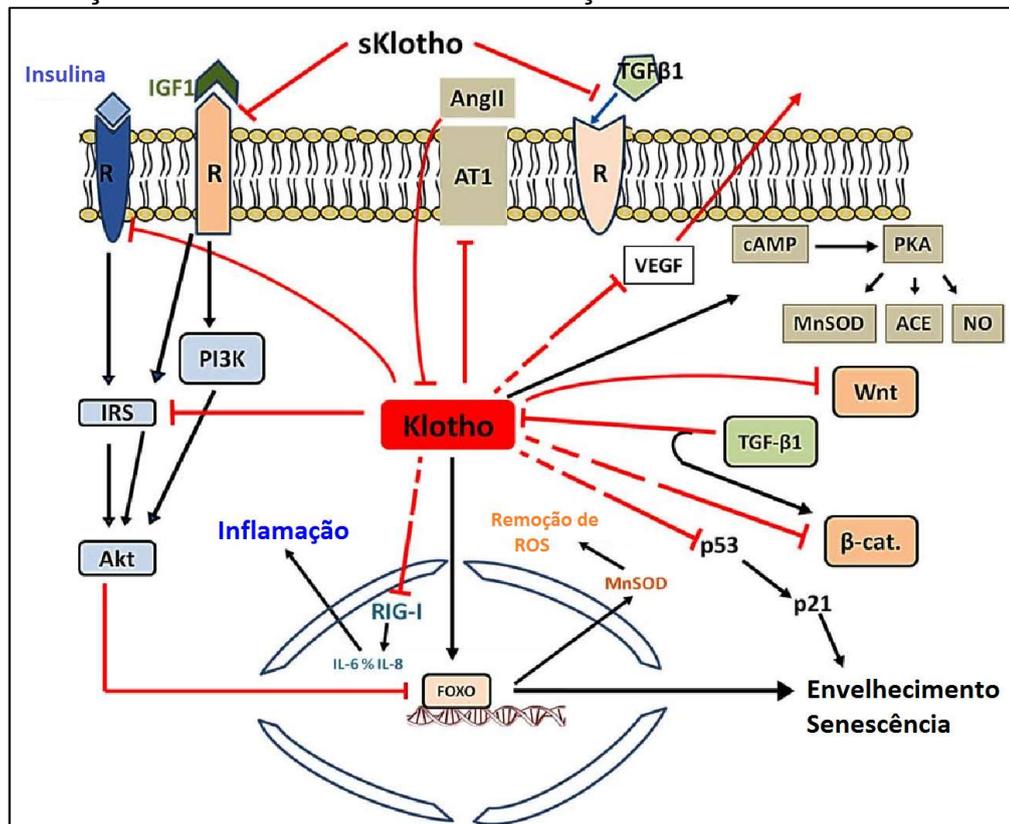
Quanto aos efeitos endócrinos da sKlotho podemos citar: inibição da via de sinalização da insulina/IGF-1, inibição da via de sinalização do TGF- $\beta$ , inibição da via de sinalização do WNT, inibição da via de sinalização da angiotensina II e proteção contra o estresse oxidativo (Wang e Sun, 2009; Hu, Kuro-O, *et al.*, 2013; Sopjani *et al.*, 2015; Xu e Sun, 2015).

Em relação a via de sinalização da insulina/IGF-1, os animais knockout para  $\alpha$ Klotho (Klotho<sup>-/-</sup>) são hipoglicêmicos, apresentam níveis mais baixos de insulina e são extremamente sensíveis a esse hormônio, enquanto os animais que hiperexpressam  $\alpha$ Klotho (TgKlotho) são resistentes à insulina. A sKlotho parece não se ligar diretamente ao IGF-1, sendo o mecanismo de inibição ainda não esclarecido. Especula-se que a  $\alpha$ Klotho solúvel tenha alta afinidade por um receptor ainda não

conhecido e que esta ligação ativa vias de sinalização intracelular que modulam a via do IGF-1, talvez por diminuir a expressão de receptores na membrana. A inibição moderada da via do IGF-1, sabidamente aumenta o tempo de vida em animais (Figura 13) (Wang e Sun, 2009; Sopjani *et al.*, 2015; Xu e Sun, 2015).

Quanto a via do TGF- $\beta$ , a sKlotho pode se ligar diretamente aos receptores tipo II do TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ R2) na superfície das células alvo, bloqueando assim a ligação do TGF $\beta$  ao seu receptor e ativação da via de sinalização intracelular. Este mecanismo parece ser importante na diminuição da fibrogênese como a que ocorre na progressão da fibrose renal e no bloqueio da transição epitélio-mesenquimal induzida pelo TGF $\beta$ 1, um importante mecanismo relacionado a metástases (Sopjani *et al.*, 2015).

**Figura 13:** Ação da sKlotho em vias de sinalização extra e intracelulares.



Abreviações: IGF1 – Fator de crescimento *insulin-like* 1, AngII – Angiotensina II, TGF $\beta$ 1 – Fator de crescimento transformador- $\beta$ 1, R – receptores, AT1 – Receptor tipo 1 da AngII, VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular, cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico, PKA -Proteína quinase A, MnSOD – Manganês superóxido dismutase, ACE -Enzima conversora de angiotensina, NO – Óxido nítrico, PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase, IRS – Substrato do receptor da insulina, Wnt – Via de sinalização Wnt, Akt – Proteína quinase B, β-cat. – βCatenina, RIG-1 - Retinoic acid-inducible gene I, ROS – Espécies reativas de oxigênio, p53 – proteína 53, p21 – Proteína 21, IL-6/8 – Interleucinas 6 e 8, FOXO – Fatores de transcrição da família *Forkhead box*. Fonte: (Sopjani *et al.*, 2015)

A proteína  $\alpha$ Klotho solúvel também pode se ligar a vários membros da família de proteínas WNT e assim inibir a sua atividade biológica. Sendo a via do WNT importante em mecanismos de hipertrofia, fibrose e metástases, a ação inibitória da

sKlotho protege contra vários dos fenótipos encontrados nos animais *Klotho*<sup>-/-</sup>. Da mesma forma, a sKlotho é capaz de regular para baixo a expressão de receptores AT1 da angiotensina II, e impedir a ativação da via WNT/ $\beta$ -catenina por ela mediada (Sopjani *et al.*, 2015; Xu e Sun, 2015; Yu *et al.*, 2016).

Por fim, a sKlotho aumenta a fosforilação do fator de transcrição FOXO3a e, conseqüentemente, sua atividade. Sendo este fator de transcrição importante na regulação da expressão de UP3 e SOD2 que controlam a produção de ROS mitocondrial, a ação da sKlotho protege contra o estresse oxidativo. Além disso, a sKlotho parece regular para baixo a NADPH oxidase 2 (Nox2) e reduzir a geração de ROS relacionada a ativação da angiotensina II (Wang e Sun, 2009; Xu e Sun, 2015; Yu *et al.*, 2016).

Até o momento, nenhum receptor específico para sKlotho foi identificado. Portanto, o mecanismo pelo qual sKlotho age como um “hormônio” é mal compreendido. Recentemente, foi demonstrado a impossibilidade de sKlotho exibir atividade enzimática, o que era esperado devido à sua alta homologia com  $\beta$ -glicosidases. Conseqüentemente, acredita-se que seus efeitos endócrinos sejam devidos à sua capacidade de se ligar a várias proteínas e receptores, modulando sua função sem ação enzimática (Chen *et al.*, 2018).

Recentemente, Dalton *et al.* demonstraram que sKlotho é capaz de se ligar aos monossialogangliosídeos presentes em regiões superespecializadas da membrana celular conhecidas como “*lipid rafts*” alterando a organização lipídica local, o que altera a capacidade de endocitose e exocitose. Foi demonstrado que este mecanismo de ação concede sKlotho a capacidade de reduzir a externalização do canal catiônico TRPC6 (*Transient receptor potential cation channel subfamily C member 6*) na membrana de cardiomiócitos (Dalton *et al.*, 2017). No entanto, como hipótese, pode-se especular que através deste mecanismo a sKlotho seja capaz de modular várias outras vias de sinalização por alterar a expressão de receptores na membrana.

### **2.3.3 – Efeito protetor da $\alpha$ Klotho sobre o miocárdio.**

Apesar do miocárdio não expressar  $\alpha$ Klotho, há grande expressão miocárdica de receptores de FGFs, sendo que a ativação dos mesmos por FGFs parácrinos, sabidamente induz hipertrofia e fibrose miocárdica. Como mencionado anteriormente,

o FGF23 pode agir de forma independente do  $\alpha$ Klotho, ativando os receptores FGFR4 e induzindo hipertrofia miocárdica pela ativação da via da calcineurina/NFAT. No entanto, essa ação parece não ocorrer na presença de níveis normais de sKlotho (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013).

Em 2012, Xie *et al.* publicaram o primeiro trabalho demonstrando efeito protetor do  $\alpha$ Klotho recombinante (rKlotho), fazendo o papel de sKlotho, sobre a hipertrofia e fibrose em modelo de HVE induzida por isoproterenol. Neste trabalho foi demonstrado o efeito da rKlotho em reduzir a expressão de TRPC6 na membrana dos cardiomiócitos. Os TRPC6 são canais de cálcio que são ativados pelo estresse da parede do cardiomiócito, funcionando como mecano-sensores, e induzindo hipertrofia através da ativação da via da calcineurina (Xie *et al.*, 2012). Além disso, Song *et al.* em 2013, usando o mesmo modelo de HVE induzida por isoproterenol, demonstraram que a reposição de rKlotho reduz a apoptose de cardiomiócitos induzida pelo isoproterenol, através do bloqueio das vias de sinalização da MAPK/p38 e JNK quinases (Song *et al.*, 2013).

Após estes trabalhos demonstrando ação protetora da rKlotho sobre o miocárdio em modelo experimental de HVE sem DRC, dois trabalhos foram publicados simultaneamente, demonstrando ação protetora da rKlotho sobre o miocárdio em modelo experimental de DRC em animais *knockout* e transgênicos para  $\alpha$ Klotho. Foi demonstrado que, na deficiência de sKlotho, a hiperfosfatemia, o FGF23 e a idade se correlacionaram com HVE, porém mesmo corrigindo a hiperfosfatemia por restrição dietética e, conseqüentemente, reduzindo os níveis de FGF23, a HVE persistia nos animais com DRC e deficientes em sKlotho, levando a crer que exista um efeito protetor da sKlotho, independente dos níveis de fosfato e FGF23. Foi também demonstrada ação protetora da rKlotho sobre a hipertrofia e fibrose induzidas por TGF- $\beta$ 1 e angiotensina II (Hu *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015).

Em trabalho mais recente, Yang *et al.* observaram uma correlação inversa entre os níveis circulantes de sKlotho e de indoxil sulfato (IS), uma das principais toxinas urêmicas com efeito vascular e cardiotoxico, assim como uma correlação positiva entre os níveis de IS e HVE, tanto em pacientes renais crônicos como em modelo experimental murino de DRC. Além disso, demonstraram que a reposição de rKlotho preveniu a HVE em camundongos com DRC e bloqueou a hipertrofia induzida por IS de cardiomiócitos *in vitro*, por bloquear o estresse oxidativo e inibir a via de sinalização da MAPK (Yang *et al.*, 2015).

Yu et al. demonstraram em estudos *in vitro* que rKlotho também é capaz de inibir a hipertrofia cardiomiócitos induzida por angiotensina II através da regulação negativa dos receptores AT1 e supressão da via de sinalização AT1R/ $\beta$ -catenina (Yu et al., 2016).

Em trabalho recém publicado, Poelzl et al. demonstraram pela primeira vez de forma inequívoca que, diferente de roedores, em humanos o miocárdio pode expressar a forma completa de  $\alpha$ Klotho, sobretudo em situações patológicas de miocardiopatia, um achado compatível com funções parácrinas ainda não elucidadas (Poelzl et al., 2018).

#### **2.3.4 – DRC como um estado de deficiência em Klotho.**

Sendo os rins a principal fonte de  $\alpha$ Klotho, tanto na forma ligada à membrana como na forma solúvel circulante, com a redução do número de néfrons ocorre progressivo declínio dos níveis circulantes de sKlotho (Hu et al., 2016). Desta forma, a DRC em estágio avançado e, sobretudo, na fase dialítica se comporta como um estado de deficiência sistêmica de  $\alpha$ Klotho, apresentando muitas das alterações clínicas e laboratoriais do animal Klotho<sup>-/-</sup>, entre elas: elevados níveis de FGF23 circulantes, hiperfosfatemia, calcificação vascular, HVE, doença óssea, envelhecimento precoce e alta mortalidade (Tabela 3) (Hu et al., 2011; Hu, Shiizaki, et al., 2013). Sabidamente, na hemodiálise, níveis mais baixos de sKlotho se correlacionam com complicações cardiovasculares e maior mortalidade (Otani-Takei et al., 2015; Abdallah et al., 2016; Marcais et al., 2017; Kim et al., 2018).

Devido a DRC constituir uma situação clínica onde há a deficiência crônica e progressiva de  $\alpha$ Klotho, questiona-se se esse fato não seria a alteração primordial no DMO-DRC, desencadeando as demais. Grande parte dos estudos mais importantes que avaliaram o efeito do FGF23 sobre o miocárdio e vasos não incluíram dosagens dos níveis circulantes de sKlotho. Porém baseado nos estudos de proteção miocárdica em animais Klotho<sup>-/-</sup> e TgKlotho ou por estudos *in vitro*, pode-se intuir que existe uma interação entre o FGF23 circulante e sKlotho na qual o segundo pode modular o efeito do primeiro de três possíveis maneiras: a primeira seria que ambos tivessem efeitos independentes sobre o miocárdio, porém sendo o FGF23 deletério e a sKlotho protetora. Essa hipótese apesar de suportada por vários trabalhos que demonstraram ações pleiotrópicas da sKlotho, não parece ser suficiente uma vez que sabidamente

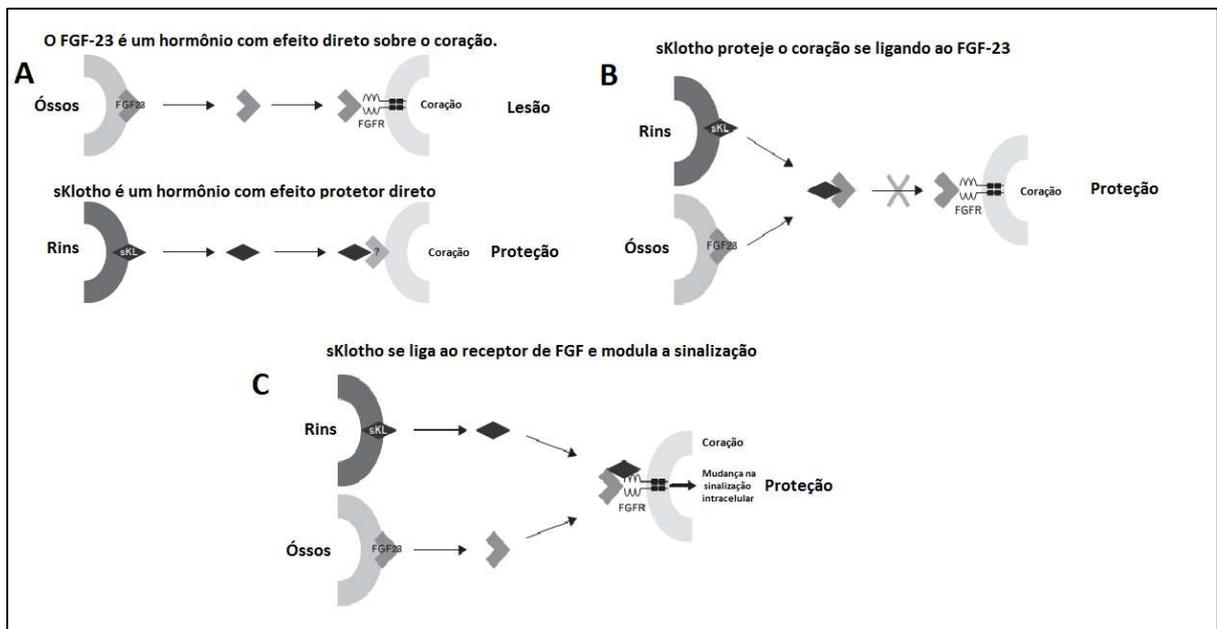
a  $\alpha$ Klotho e o FGF23 fazem parte da mesma via fisiológica (Figura 14) (Grabner e Faul, 2016).

**Tabela 3:** Comparação entre os fenótipos de deficiência de  $\alpha$ Klotho primário e secundário à DRC.

	Animal $\alpha$ Klotho <sup>-/-</sup>	Doença Renal Crônica
$\alpha$ Klotho renal	Ausente	Diminuído
$\alpha$ Klotho solúvel	Ausente	Diminuído
FGF23 circulante	Muito elevado	Muito elevado
Fósforo sérico	Muito elevado	Elevado
Peso	Diminuído	Diminuído
Crescimento	Retardado	Retardado em crianças
Fertilidade	Diminuída	Diminuída
Coração	Hipertrofia e fibrose	Hipertrofia e fibrose
Vasos	Cacificação vascular	Calcificação vascular
Ossos	Osteoporose	Osteoporose
Sobrevida	Pequena	Alta mortalidade

Fonte: (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013)

**Figura 14:** Possíveis mecanismos pelos quais a sKlotho modularia o efeito do excesso de FGF23 circulante na DRC.



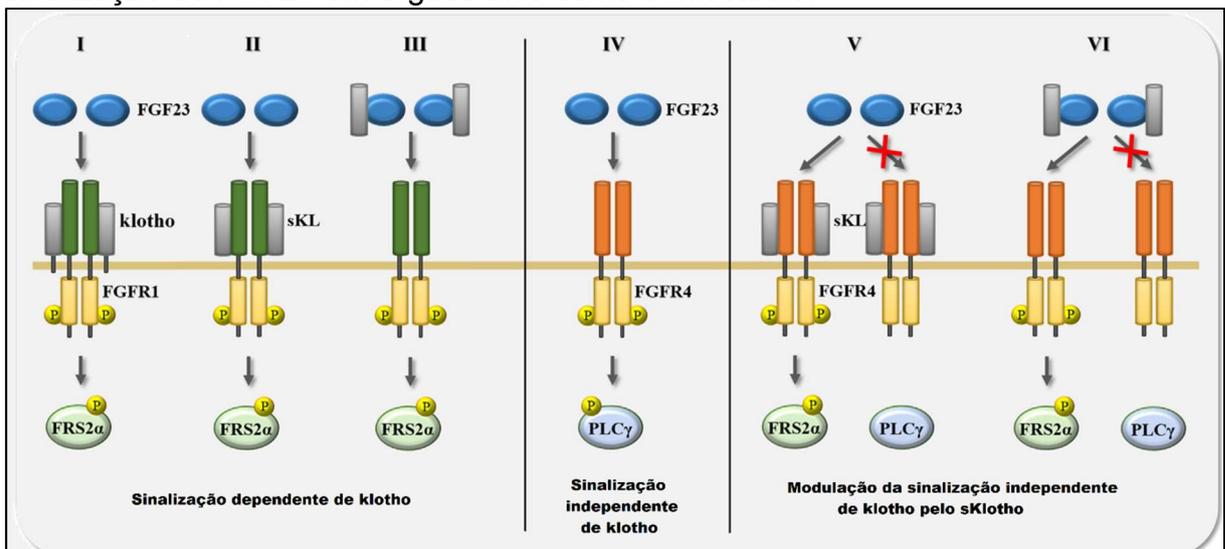
Abreviações: FGF-23 – Fator de crescimento de fibroblasto-23, sKL – Klotho solúvel, FGFR- Receptor de fator de crescimento de fibroblasto. Modificado de Grabner e Faul, 2016.

A segunda hipótese seria a de que a sKlotho, por ter afinidade pelo FGF23, ligue-se ao FGF23 circulante e, por inativá-lo ou aumentar sua depuração renal, resulte no bloqueio do seu efeito deletério sobre o miocárdio. Neste caso a sKlotho

apresentaria a função de um “receptor isca” se ligando ao excesso de FGF23 circulante e evitando os seus efeitos deletérios (Grabner e Faul, 2016).

Por fim, a terceira hipótese seria a de que a sKlotho possa servir como um co-receptor circulante para receptores de FGFs em tecidos que não expressem  $\alpha$ Klotho transmembrana. Desta forma, a sKlotho formaria complexos com os receptores de FGFs miocárdicos, mudando a sinalização intracelular após a ligação com o FGF23 circulante (Figura 15) (Grabner e Faul, 2016; Richter e Faul, 2018). Esta hipótese foi fortalecida por estudo publicado recentemente que demonstrou que a sKlotho pode servir como um co-receptor verdadeiro para apoiar a sinalização de FGF23 em túbulos proximais renais (Chen *et al.*, 2018).

**Figura 15:** Possíveis formas através das quais a sKlotho poderia modular a sinalização do FGF23 em órgãos alvo como o miocárdio.



Abreviações: FGF23 – Fator de crescimento de fibroblasto 23, sKL – Klotho solúvel, FGFR1 e 4 – Receptores de fatores de crescimento de fibroblasto 1 e 4, FRS2 $\alpha$  – Substrato 2 $\alpha$  do receptor de FGF, PLC $\gamma$  – Fosfolipase Cy. Modificado de Richter e Faul, 2018.

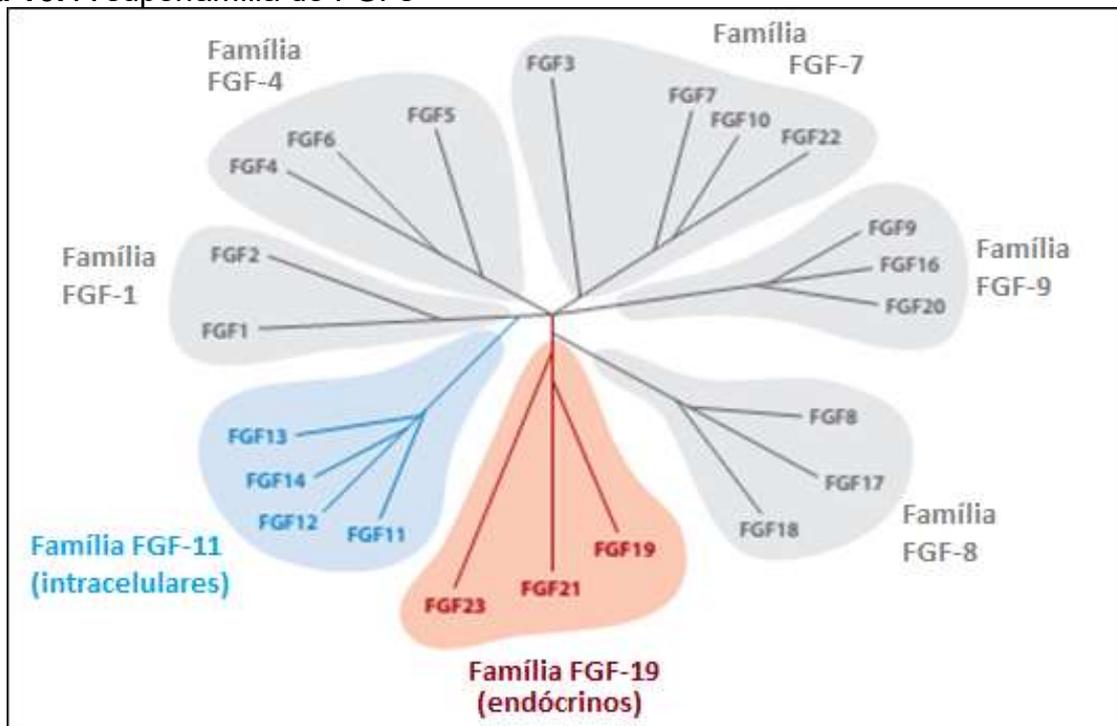
#### 2.4- FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 21 – FGF21.

O FGF21, outro membro da família dos FGFs endócrinos, tem ganhado grande destaque atualmente não só por suas ações metabólicas, mas também por crescentes evidências sugerindo, de forma diversa do FGF23, ações cardioprotetoras (Planavila, Redondo-Angulo e Villarroya, 2015).

O FGF21 foi primeiramente descrito por Nishimura *et al.* em 2000, que determinaram a sua maior expressão hepática, mas foi apenas em 2005 que ele foi

reconhecido como um novo regulador metabólico por induzir captação de glicose em adipócitos e aumentar a oxidação de ácidos graxos (Nishimura *et al.*, 2000; Kharitonov *et al.*, 2005). O FGF21 foi classificado como um FGF, assim como os demais, por conter um domínio comum à família de FGFs na sua estrutura peptídica. Esta família, em mamíferos, consiste atualmente de 22 membros divididos em sete subfamílias, baseado nas semelhanças estruturais e mecanismos de ação (Figura 16) (Itoh e Ornitz, 2011).

**Figura 16:** A superfamília de FGFs



Abreviações: FGF 1-23 – Fatores de crescimento de fibroblasto 1 – 23. Modificado de Itoh e Ornitz, 2011.

A maioria dos FGFs agem de forma autócrina ou parácrina como fatores que regulam o crescimento e diferenciação celular. Entretanto os membros da família dos FGF19 que compreende o FGF15/19, o FGF21 e o FGF23, diferem dos demais em dois importantes aspectos. Primeiramente, eles apresentam nenhum ou apenas um pequeno efeito mitogênico e segundo, apresentam efeitos semelhantes a hormônios por agirem a distância. Por isso, passaram a ser chamados de FGFs endócrinos (Itoh e Ornitz, 2011).

Deste modo, o FGF19 (ortólogo do FGF15 murino) é principalmente expresso no intestino e regula a síntese de bile no fígado. O FGF23 que é produzido

principalmente nos ossos e regula a homeostase de fosfato, atuando sobretudo nos rins, e o FGF21 é predominantemente expresso no fígado e age como um regulador metabólico atuando no metabolismo de glicose e lipídeos em vários tecidos metabolicamente ativos como tecido adiposo e músculo esquelético (Angelin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

O gene FGF21 humano está localizado no cromossoma 19 e codifica uma proteína de 209 amino com uma porção sinalizadora N-terminal que, após sua clivagem, resulta em uma proteína de 181 aminoácidos ( $\approx 21$ kDa). O FGF21 de camundongo e humano compartilham 75% de homologia entre os aminoácidos (Li *et al.*, 2013).

O FGF21 também age através de receptores de FGFs ligados à membrana com domínio intracelular com atividade de tirosina quinase, que conduz à ativação de vias de sinalização intracelulares a jusante. Assim como o FGF23, o FGF21 age principalmente através do receptor FGFR1c, mas também não consegue interagir diretamente com o mesmo, uma vez que possui baixa afinidade, necessitando de um co-receptor para se ligar e ativar FGFR de forma eficiente. Para o FGF21 o co-receptor também pertence à família de proteínas Klotho, sendo no entanto, ao invés de  $\alpha$ Klotho, a  $\beta$ Klotho (Kharitononkov *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013).

Vários estudos demonstraram que todos os efeitos metabólicos do FGF21 são perdidos em animais *knockout* para  $\beta$ Klotho. Da mesma forma, os efeitos de sensibilização agudam à insulina são perdidos em animais com *knockout* seletiva da  $\beta$ Klotho no tecido adiposo. Desta forma, foi demonstrado que a  $\beta$ Klotho é o co-receptor necessário para os efeitos do FGF21, determinando como tecido alvo aquele onde ocorre sua expressão e formação de complexo com o FGFR1c. Esta é uma das características dos FGFs endócrinos, ter como co-receptor a proteína Klotho transmembrana ao invés de heparan sulfato,  $\alpha$ Klotho para o FGF23 e  $\beta$ Klotho para o FGF19 e 21 (Adams *et al.*, 2012).

#### **2.4.1- O FGF21 como uma Cardiomiocina.**

O termo cardiomiocina foi cunhado em 2010 em analogia ao termo adipocinas que se refere a uma série de substâncias secretadas pelo tecido adiposo que apresentam ação autócrina, parácrina ou mesmo endócrina. Da mesma forma, o miocárdio tem sido recentemente identificado como fonte de substâncias que são

liberadas em situações de estresse fisiológico ou patológico e que podem apresentar ações locais ou a distância. As mais conhecidas talvez sejam os peptídeos natriuréticos (ANP e BNP), mas atualmente já foram descritas mais 30 substâncias, entre elas: Endotelina-1, TNF $\alpha$ , IL-6, FGF1, FGF2 e FGF21 entre outras. Estas substâncias podem ser liberadas tanto pelo cardiomiócito como pelas células do interstício cardíaco, sobretudo os fibroblastos (Doroudgar e Glembotski, 2011; Planavila *et al.*, 2017).

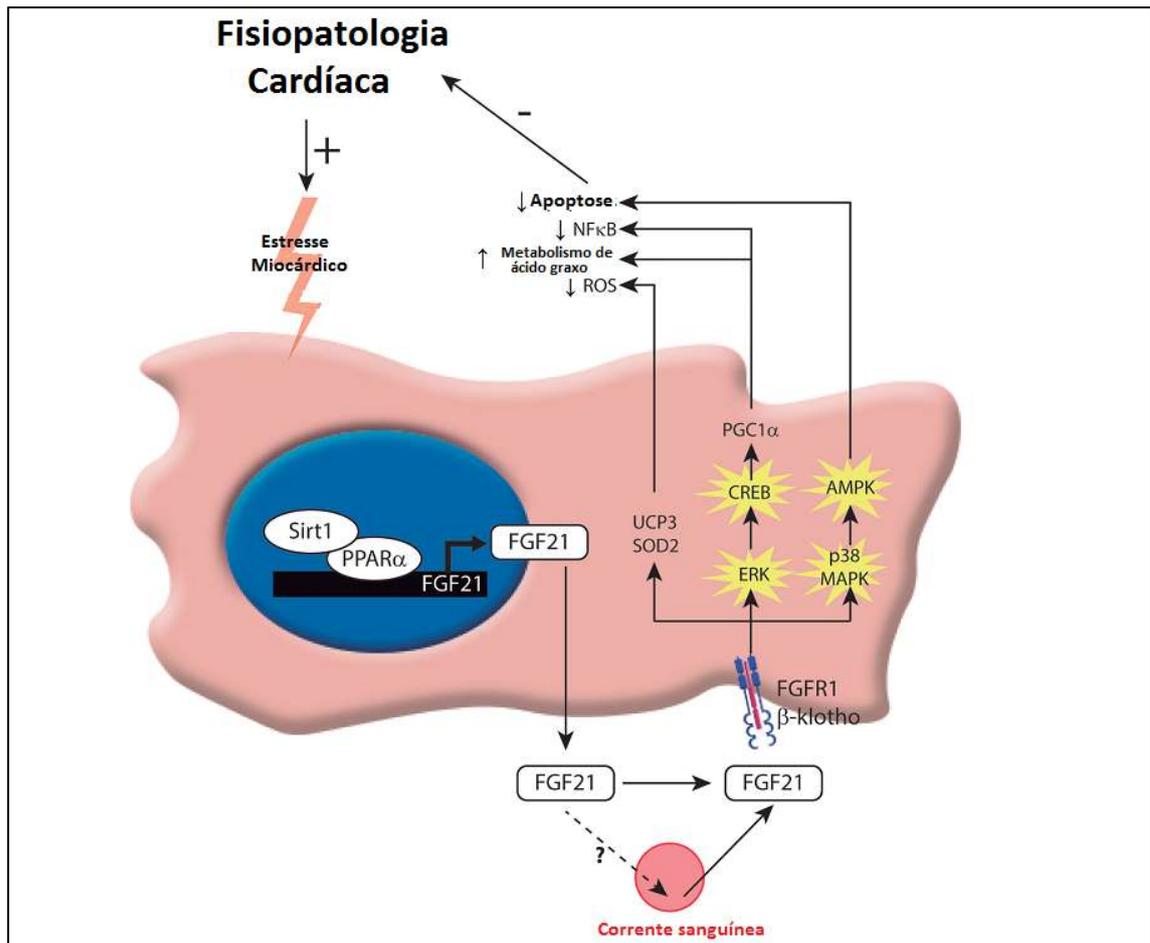
Apesar do FGF21 atuar no metabolismo principalmente de forma endócrina após liberado pelo fígado, ele pode também atuar de forma autócrina e parácrina, sendo desta forma que atua como uma cardiomiocina, podendo a via endócrina ter alguma relevância em situações especiais como no infarto agudo do miocárdio (Planavila *et al.*, 2017).

A primeira evidência de ação do FGF21 sobre o miocárdio foi demonstrada por Planavila *et al.* que, estudando camundongos *knockout* para FGF21 (FGF21<sup>-/-</sup>), observaram a predisposição destes animais a desenvolverem HVE espontaneamente e de forma intensa quando sob estresse farmacológico com isoproterenol, sendo este efeito deletério do isoproterenol revertido nos animais FGF21<sup>-/-</sup> pela reposição de FGF21 recombinante (rFGF21) (Planavila *et al.*, 2013).

Em trabalhos subsequentes, passou-se a entender melhor o mecanismo da ação protetora do FGF21 sobre o miocárdio. O FGF21 tem sua expressão aumentada pelos cardiomiócitos em situações de estresse miocárdico através da ação de fatores de transcrição PPAR $\alpha$  e SIRT1. O FGF21 expresso é então secretado pelo cardiomiócito no meio extracelular, agindo de forma autócrina e parácrina através da ativação do complexo FGFR1c/ $\beta$ Klotho que é expresso pelo cardiomiócito (Patel *et al.*, 2014; Domouzoglou *et al.*, 2015; Planavila, Redondo-Angulo, Ribas, *et al.*, 2015).

Após a ativação do seu receptor, ocorre o acionamento de três principais vias de sinalização intracelular: a primeira seria a ativação da via da ERK1/2 que levaria a aumento da oxidação de ácidos graxos pelo cardiomiócitos e inibição do fator de transcrição NF $\kappa$ B, bloqueando vias pró-inflamatórias. No caso da miocardiopatia diabética, onde a principal fonte de energia usada pelo miocárdio passa a ser a glicose ao invés de ácidos graxos o que resulta em acúmulo de lipídeos e disfunção miocárdica, o tratamento com rFGF21 em modelos experimentais leva a correção deste “desvio” metabólico, resultando em regressão da miocardiopatia (Figura 17) (Planavila, Redondo-Angulo e Villarroya, 2015).

**Figura 17:** Efeitos do FGF21 como uma cardiomiocina protetora.



Abreviações: NFκβ – Fator de transcrição κβ, ROS – Espécies reativas de oxigênio, Sirt1 – Sirtium 1, PPARα – Receptor ativado por proliferador de peroxissomo α, FGF21 – Fator de crescimento de fibroblasto 21, UCP3 - *Uncoupling Protein 3*, SOD2 – Superóxido dismutase 2, ERK – Extracellular signal-regulated kinase, MAPK/p38 – Via da *mitogen activated protein kinase/proteína 38*, AMPK - Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato, CREB - *cAMP response element-binding*, PGC1α – Coativador 1α do PPARγ. Modificado de Planavila, 2015.

Uma segunda via ativada é a da p38/MAPK que, apesar de poder se relacionar à hipertrofia em outras situações, protege o cardiomiócito da apoptose. Por último, mas não menos importante, o FGF21 protegeria o cardiomiócito do estresse oxidativo, por aumentar a expressão de agentes de vias antioxidantes como a *Uncoupling protein 3* (UP3) e superóxido dismutase 2 (SOD2). O aumento da produção de ROS intracelular normalmente acompanha a disfunção mitocondrial e estas duas proteínas mitocondriais evitam a liberação de ROS no citosol, protegendo a célula (Planavila, Redondo-Angulo e Villarroya, 2015).

Como se pode observar por tudo que foi exposto, o FGF23 e o FGF21, parecem ter ações antagônicas sobre o miocárdio e muitos dos efeitos atribuídos a αKlotho sobre o miocárdio poderia ser mediado pelo FGF21. Desta forma, é uma hipótese plausível imaginar que na DRC exista um desequilíbrio miocárdico entre as ações do

FGF23 e FGF21, relacionadas à deficiência de  $\alpha$ Klotho e que parte dos efeitos protetores do sKlotho no miocárdio possam ser mediados pelo FGF21, através da modulação da sinalização do FGF23 pelo sKlotho.

### **3- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO:**

Apesar de ter sido recentemente demonstrado o efeito cardioprotetor do  $\alpha$ Klotho em estudos *in vitro* ou agindo preventivamente em modelos experimentais de DRC com animais geneticamente modificados, o seu efeito terapêutico ainda não foi comprovado, assim como seu mecanismo de ação permanece incerto.

**4- HIPÓTESE DO ESTUDO:**

A reposição de rKlotho de forma terapêutica pode modular a remodelação miocárdica na DRC, agindo de forma inibitória sobre vias relacionadas à HVE e/ou estimulando vias protetoras.

## **5-OBJETIVOS:**

### **5.1 – OBJETIVO GERAL:**

Avaliar o efeito terapêutico da reposição de rKlotho na remodelação miocárdica em modelo animal de DRC por nefrectomia 5/6 e explorar potenciais mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia.

### **5.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1- Avaliar o impacto da reposição de rKlotho sobre os parâmetros ecocardiográficos e histológicos de remodelação miocárdica secundários à miocardiopatia da DRC.
- 2- Investigar o efeito da reposição de rKlotho sobre a expressão miocárdica de marcadores de hipertrofia e fibrose.
- 3- Investigar o efeito da reposição de rKlotho sobre a expressão miocárdica de TRPC6.
- 4- Avaliar o efeito da reposição de rKlotho sobre os níveis séricos e miocárdicos de FGF21.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. ANIMAIS.

Foram utilizados 46 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com idade de 12 semanas, pesando de 250g a 300g. Os animais foram obtidos a partir das colônias do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução na Universidade Federal de Juiz de Fora, onde os experimentos foram conduzidos. Após o desmame, os animais foram acondicionados em grupos de até cinco animais em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha e alojados em estantes climatizadas (Alesco Indústria e comércio Ltda., Monte Mor, Brasil). A água e a ração foram oferecidas *ad libitum* e a temperatura mantida ao redor de 22°C, com iluminação mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h. A ração utilizada apresentava conteúdo normal de fósforo de 0,6% (NUVILAB CR1®, Nuvital Nutrients Ltda. Colombo, Brasil).

Os procedimentos necessários para a realização do trabalho estiveram de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme certificados em anexo com protocolos n°: 042/2013, 044/2014, 02/2015 e 039/2015.

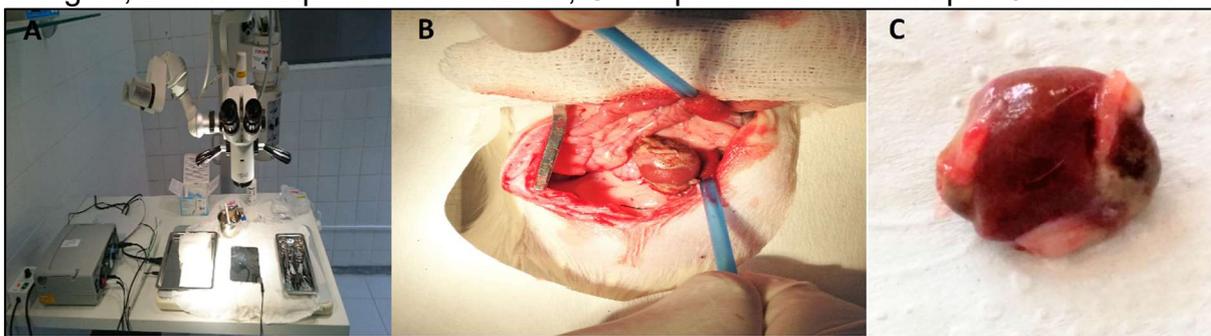
### 6.2. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC.

O modelo experimental de DRC utilizado foi o modelo de nefrectomia 5/6 por cauterização (Ormrod e Miller, 1980). Neste modelo foi feita a nefrectomia do rim direito, seguida da retirada da cápsula do rim esquerdo e cauterização com bisturi eletrônico na modalidade coagulação e potência 7 (BP plus 100®, EMEI-TRANSMAI, Ltda, Reg. na ANVISA AM n° 80052640008) dos dois polos deste rim, no intuito de preservar apenas 1/3 da massa renal esquerda. A escolha pela ablação com utilização do bisturi eletrônico, deveu-se a observação em estudo piloto de grande variação na massa renal residual com o modelo clássico de nefrectomia 5/6 através da ligadura de dois ramos da artéria renal esquerda, o que também se mostrou mais difícil do ponto de vista técnico.

No pré-operatório, os animais foram anestesiados com a combinação cetamina 90mg/kg (Cloridrato de cetamina 10%, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e Xilazina 10mg/kg (Xilazin 2%, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) por via intraperitoneal e, em seguida, foi feita a aplicação de Enrofloxacino 5mg/kg (Flotril® 2,5%, MSD, Cruzeiro, SP, Brasil) por via subcutânea e Meloxicam 0,5mg/kg (Maxican® 0,2%, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) por via intramuscular. A seguir, foi feita a tricotomia do abdome e antissepsia com degermante a base de clorexidina (Riohex® 2%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Com auxílio de microscópio cirúrgico com aumento 10x, os procedimentos foram realizados por laparotomia em único tempo, sendo feita a ligadura do pedículo vascular do rim direito com fio de seda 4-0 (Technofio, Goiânia, GO, Brasil), seguida da exérese do rim. Quanto à cauterização, para propiciar um contato adequado do dorso do animal à placa neutra, foi feita a tricotomia de pequena área no dorso de 4cm<sup>2</sup> e umidificação com solução salina. Após a nefrectomia e cauterização, o abdome foi fechado com fio de seda 4-0 (Technofio, Goiânia, GO, Brasil), sendo o plano muscular com sutura contínua com pontos festonados e o plano cutâneo com ponto contínuo simples (Figura 18).

**Figura 18:** Nefrectomia 5/6 por cauterização dos dois polos do rim esquerdo. A - Mesa cirúrgica; B - Rim esquerdo cauterizado; C - Aspecto final do rim após 8 semanas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Como cuidados intra-operatórios, os animais foram operados sobre placa aquecida a 38°C, as alças intestinais manipuladas com cotonete umidificado em salina estéril (cloreto de sódio 0,9%, Eurofarma, Itapevi, SP, Brasil) e protegidas em gazes estéreis também umidificadas. Antes do fechamento da cavidade abdominal, esta era irrigada com 3ml de solução salina estéril aquecida (cloreto de sódio 0,9%, Eurofarma, Itapevi, SP, Brasil).

No pós-operatório, os animais receberam analgesia com Tramadol 12,5mg/kg/dose (Laboratório Teuto, Anápolis, Goiás, Brasil) por via subcutânea no primeiro dia, seguida de Tramadol manipulado na forma de biscoito com 3mg/biscoito (PetFarma, Juiz de Fora, MG, Brasil) e Paracetamol (Tylenol® 32mg/ml, Johnson&Johnson, São Paulo, Brasil) 1mg/ml na água de beber por 48 horas. Neste período os animais foram mantidos em gaiolas individuais aquecidas até estarem completamente despertos. Além disso, os animais foram mantidos por uma semana em gaiolas individuais, para recuperação e cicatrização da ferida cirúrgica antes de retorná-los para gaiolas coletivas.

Na cirurgia “*Sham*” realizada nos animais do grupo controle, todos os procedimentos pré e pós-operatórios, assim como a técnica cirúrgica foram os mesmos, exceto por não haver nefrectomia ou cauterização. Ao invés disso, foi realizado a retirada da cápsula de ambos os rins.

### 6.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para os objetivos descritos, os animais foram divididos em 3 grupos (Figura19):

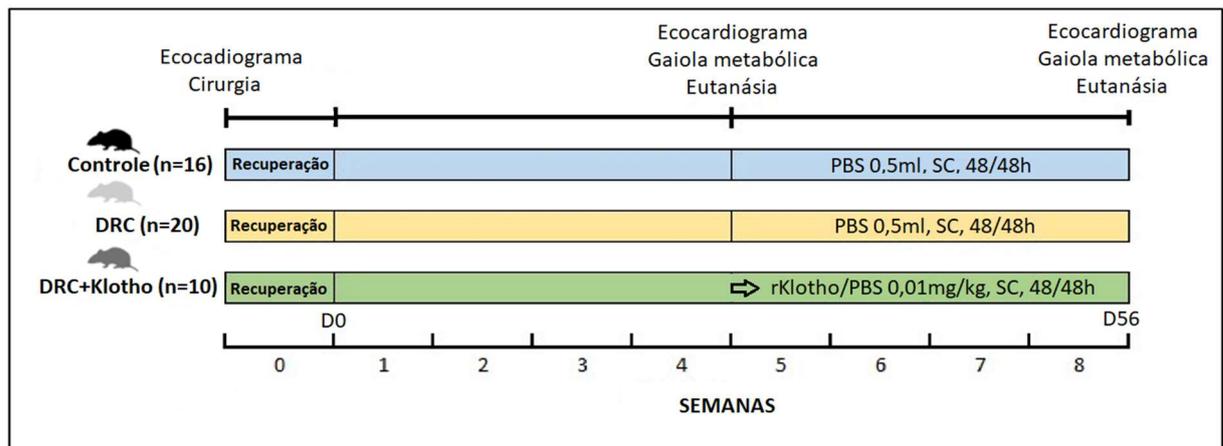
**CONTROLE (n=16)**: Os animais foram submetidos à cirurgia “*Sham*” e, após a semana de recuperação, foram incluídos no protocolo, sendo 8 animais submetidos a eutanásia na quarta semana e 8 animais na oitava semana. Da quinta a oitava semana, os animais receberam 0,5ml de solução tamponada fosfato-salina (PBS) estéril por via subcutânea a cada 48h.

**DRC (n=20)**: Os animais foram submetidos à nefrectomia 5/6 como descrito previamente e foram submetidos a eutanásia em grupos de 10 animais na quarta e oitava semanas. Da quinta a oitava semana, os animais receberam 0,5ml de PBS estéril por via subcutânea a cada 48h.

**DRC-KL (n=10)**: Neste grupo os animais foram submetidos à nefrectomia 5/6 e tratados com rKlotho murino (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) em PBS estéril, na dose de 0,01mg/kg em dias alternados por via subcutânea, da quinta a oitava semana, quando foram submetidos a eutanásia (Doi *et al.*, 2011).

Vale a pena ressaltar que o rKlotho reposto foi a forma “full length” produzido em células de mamífero (*Chinese hamster ovary cells* - CHO) e com atividade biológica comprovada (R&D System Inc., Minneapolis, USA). Além disso, a definição da reposição por via subcutânea ocorreu após estudo piloto onde foram comparados os níveis séricos de  $\alpha$ Klotho após dose de 0,01mg/kg de rKlotho por via intraperitoneal ou subcutânea, nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (em anexo). Neste estudo piloto foi observado primeiramente que, apesar de o rKlotho ser uma molécula de  $\approx$ 130kD, foi absorvido por via subcutânea e secundariamente que, enquanto a via IP proporcionava um nível sérico muito elevado após 30 minutos com retorno aos níveis basais após 120 minutos, a via SC proporcionava uma elevação mais gradual e prolongada dos níveis séricos de  $\alpha$ Klotho. Além disso, a via SC é mais segura que a IP, sobretudo para aplicações repetidas e por um período prolongado de 4 semanas.

**Figura 19:** Desenho Experimental.

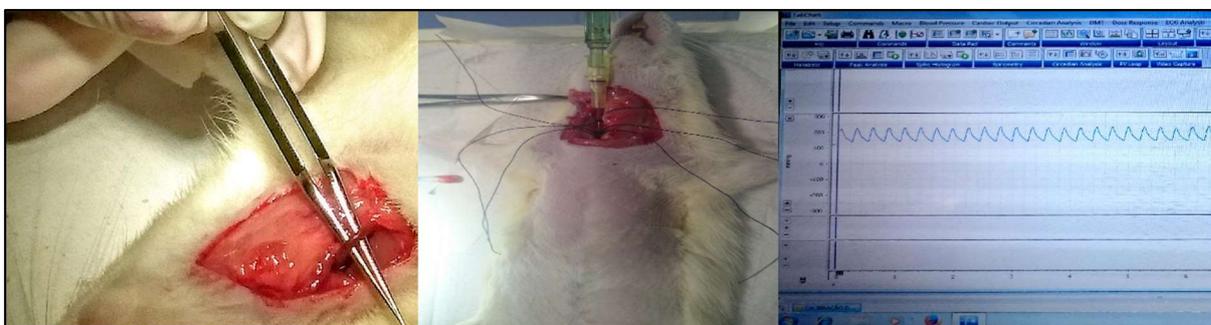


Durante o experimento o peso do animal foi avaliado semanalmente. Para avaliação da HVE, foi realizado ecocardiograma em média dois dias antes da cirurgia e antes da eutanásia. No dia anterior à eutanásia, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, para coleta de urina de 24 horas. As amostras de urina foram centrifugadas à 3.000rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA) e separadas em alíquotas estocadas à -80°C até análise.

Para a eutanásia os animais foram pesados e anestesiados com a associação de Xilazina (Xilazin® 2%, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) na dose de 10mg/kg e cetamina (Cetamin® 10%, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) na dose de 90mg/kg, aplicados por via intraperitoneal.

Após atingirem plano anestésico adequado, os animais tiveram a carótida dissecada e puncionada com cateter intravenoso de Teflon 24G heparinizado (Descarpack, São Paulo - SP) e a pressão arterial medida diretamente através de transdutor de pressão conectado ao equipamento PowerLab® 4/35 e analisado pelo software LabChart® 7.0 (ADInstruments Ltd, New South Wales, Austrália). Após a punção e conexão ao transdutor de pressão, aguardava-se 5 minutos sem manipulação do cateter, para a estabilização da pressão arterial e da frequência cardíaca.

**Figura 20:** Punção da carótida e medida direta da pressão arterial.



Fonte: Arquivo pessoal.

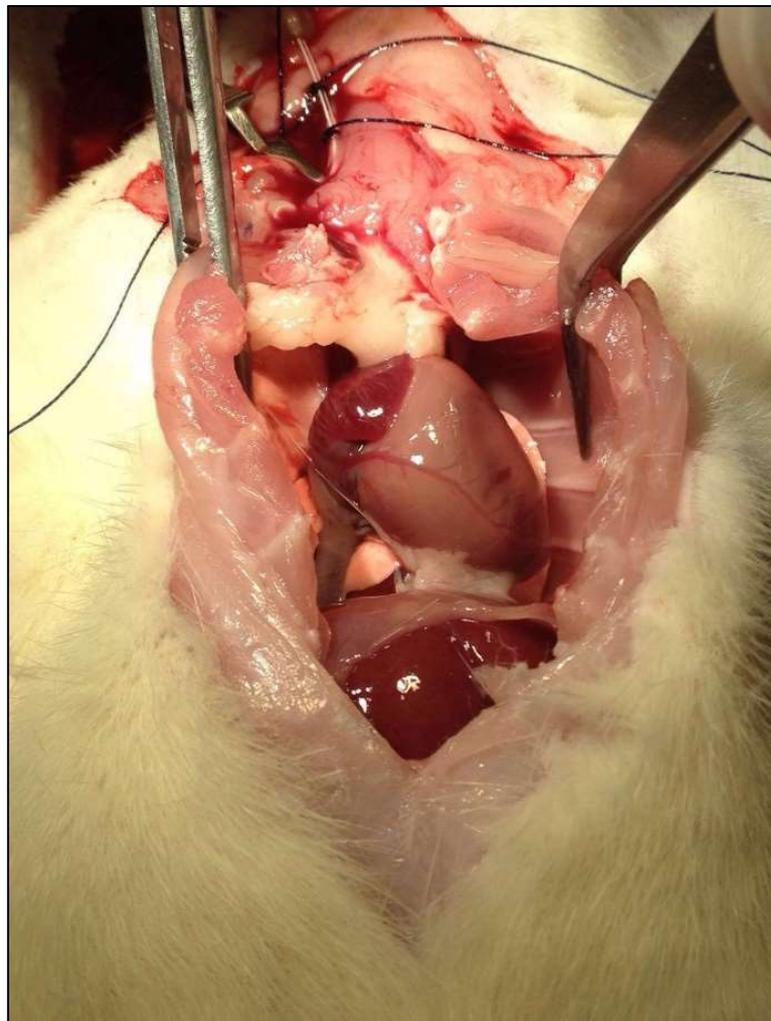
Após a medida direta da pressão arterial, os animais tiveram o sangue coletado pelo cateter da carótida e, em seguida, foram perfundido retrogradamente com 10 ml de solução cardioplégica gelada (solução de St. Thomaz modificada), para induzir a assistolia e preservação celular (Robinson *et al.*, 1984).

O sangue coletado para hemograma foi processado imediatamente, enquanto que para obtenção de soro, permanecia por 30 minutos em temperatura ambiente até a formação de coágulo, sendo em seguida centrifugado em centrífuga refrigerada por 10 minutos a 3000rpm para precipitação do coágulo, sendo então o soro separado em alíquotas. Ambas as amostras (urina e soro) foram acondicionadas em tubos criogênicos sob refrigeração a  $-80^{\circ}\text{C}$  em ultra freezer vertical (Thermo Scientific, Suwanee, EUA) para posterior análise.

Terminada a eutanásia, os tórax dos animais foram abertos e o coração e aorta torácicas retiradas, colocados em placa de Petri estéril e levada imediatamente para uma capela de fluxo unidirecional vertical (MicroFlow, Filtracon, Valinhos, SP, Brasil). O coração e aorta foram irrigados com salina isotônica gelada e separados. O coração foi processado primeiro, sendo retirados os átrios e em seguida pesado em balança

analítica digital com precisão de 0,0001g (Mettler-Toledo Ind. e Com. Ltda., Barueri – SP). Em seguida, o coração foi seccionado transversalmente a nível equatorial e o segmento apical fracionado em quatro, sendo acondicionados em dois criotubos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. O restante do coração foi então colocado em formol tamponado a 10% (Indalabor – Laboratório Farmacêutico Ltda, Dores do Indaiá, MG) para posterior processamento histológico.

**Figura 21:** Toracotomia após perfusão com solução cardioplégica, demonstrando o coração perfundido (pálido) e em assistolia.



Fonte: Arquivo pessoal.

Por fim a aorta foi limpa e seccionada em dois segmentos, sendo o distal dividido em quatro fragmentos, colocados em criotubos e congelados em nitrogênio. O outro segmento foi fixado em formol tamponado para processamento histológico.

Além disso, foi medida e anotada o comprimento da tíbia direita do animal com uso de paquímetro digital (Yin *et al.*, 1982).

#### 6.4. ECOCARDIOGRAMA

O ecocardiograma foi realizado em dois momentos, em média dois dias antes do início do experimento e em média dois dias antes da eutanásia, por médico ecocardiografista experiente. Foi utilizado equipamento de ultrassonografia portátil Logiq-e® (GE Healthcare, General Electric Company, US) acoplado a transdutor linear tipo hockey-stick L8-18i-RS de 18MHz (GE Healthcare, General Electric Company, US) e software de doppler tecidual (GE Healthcare, General Electric Company, US). Foi utilizado o *preset* cardiológico pediátrico como base para criação de *preset* próprio para animais de pequeno porte como mudança da escala para milímetros e aumento da velocidade de varredura.

Como preparo para o exame, o animal era previamente sedado com a combinação de Xilazina 10mg/kg (Xilazin® 2%, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) intraperitoneal e Fentanil (Festanest® 0,05mg/ml, Cristália, Itapira, SP) 0,025mg/kg intramuscular (Stein *et al.*, 2007). Em seguida foi feita a tricotomia do tórax do animal e o mesmo posicionado em decúbito dorsal com inclinação para esquerda sobre suporte de espuma e fixado com fita adesiva na região da axila e abdome (Figura 22).

Os seguintes parâmetros ecocardiográficos foram medidos (Watson *et al.*, 2004; Rottman *et al.*, 2007; Leopoldo *et al.*, 2010):

- 1- Aorta: o diâmetro e a espessura da parede (expresso em mm) foram medidos no final da diástole em corte longitudinal da aorta e a 0,5mm da válvula aórtica (porção reta).
- 2- Frequência cardíaca (batimentos por minuto - bpm): calculada pelo aparelho dado o intervalo obtido a partir do pico da onda E do ciclo da válvula mitral no modo M.
- 3- Espessuras das paredes do ventrículo esquerdo (VE): medidas em modo M a espessura diastólicas do septo interventricular (ESIV) e parede posterior (EPP), sendo expresso em milímetros.
- 4- Diâmetro cavitário do VE: medido na sístole (DSVE) e diástole (DDVE) em modo M em janela paraesternal e plano longitudinal ao nível dos músculos papilares.

- 5- Diâmetro do átrio esquerdo: medido imediatamente antes da abertura da válvula mitral.
- 6- Função sistólica do VE: calculada a fração de encurtamento do VE ( $\Delta D$ ) e a fração de ejeção pela fórmula de Teicholz, automaticamente calculada pelo aparelho.
- 7- Função diastólica: em corte apical 4 câmeras, foram medidas as velocidades E e A de fluxo transmitral de enchimento do VE, avaliada pelo doppler com o volume de amostra posicionado na ponta dos folhetos da válvula mitral, e as velocidades E' e A' de deslocamento muscular da base do septo interventricular. Com esses valores foram calculadas as razões E/A, E'/A' e E/E'.
- 8- Massa estimada do VE: Estimada pela fórmula:  $\text{Massa-VE} = 1,04 [(DDVE+EDSIV+EDPP)^3 - DDVE^3]$ .

**Figura 22:** Realização de ecocardiografia.



Fonte: Arquivo pessoal.

## 6.5. PARÂMETROS AVALIADOS

### 6.5.1. Peso.

Foi realizada avaliação das alterações de peso registrando-se semanalmente o peso em gramas de cada animal, em balança analítica (Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, Brasil).

### 6.5.2. Dosagens no soro e urina.

No soro, foram realizadas dosagens da creatinina (Cr), ureia (Ur), fósforo (P), cálcio total (Ca) e fosfatase alcalina (FA). Na urina, foram dosadas a creatinina (uCr) e fósforo (uP). Foi utilizado o analisador automático Cobas c111 (Roche, F. Hoffmann-La Roche Ltda, Basel, Switzerland).

Além disso, foram realizadas as dosagens no soro dos animais de PTHi (Rat Intact PTH ELISA Kit, Immotopics, San Clemente, EUA), FGF23i (Rat intact FGF-23 ELISA Kit Immotopics, San Clemente, EUA) e FGF21 (Rat FGF-21ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, EUA) em leitora de ELISA Asys Expert Plus (Biochron Ltd, Cambridge, UK). As dosagens foram realizadas em duplicata segundo procedimentos especificados pelo fabricante, conforme descrito nas bulas em anexo.

### 6.5.3. Função renal e fração de excreção de fósforo.

A função renal foi avaliada pela creatinina sérica e pela depuração da creatinina (Clcr), calculada pela diferença entre o produto da creatinina urinária e o fluxo urinário de 24 horas, divididos pelo valor da creatinina sérica. Os valores do Clcr foram corrigidos para 100g de peso do animal e expressos em ml/min/100g (CASTRO et al., 2014).

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dl)} \times \text{fluxo urinário (ml/min)}}{\text{creatinina sérica (mg/dl)}}$$

A fração de excreção de fósforo (FeP%) foi calculada conforme a fórmula abaixo e expressa em percentagem.

$$\text{FeP\%} = \frac{(\text{fósforo urinário (mg/dL)} \times \text{creatinina sérica (mg/dL)})}{\text{fósforo sérico (mg/dL)} \times \text{creatinina urinária (mg/dL)}} \times 100$$

#### **6.5.4. Avaliação do peso do coração.**

Como mencionado previamente, após a perfusão com solução cardioplégica, o coração foi retirado e levado em placa de petri estéril para capela de fluxo laminar. Foi então lavado com salina 0,9% gelada e feita a exérese de átrios e aorta, deixando apenas os ventrículos que, após retirada do excesso de líquido intracavitário, foi pesado em balança analítica digital com precisão de 0,0001g (Mettler-Toledo Ind. e Com. Ltda., Barueri – SP). O peso do coração foi anotado em gramas e depois normalizado calculando-se as razões peso do coração / peso do animal (Pc/Pa em mg/g) e peso do coração / comprimento da tibia (Pc/T em mg/mm) (Yin *et al.*, 1982).

#### **6.5.5. Análise histomorfométrica do coração.**

Após o período de fixação em formol tamponado a 10% (Indalabor – Laboratório Farmacêutico Ltda, Dores do Indaiá, MG), as amostras de coração foram enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (INCOR-FMUSP, São Paulo, Brasil) onde o material foi processado. Após a inclusão em parafina e montagem dos blocos, as amostras foram submetidas a microtomia em secções de 5 µm, montadas as lâminas e coradas com hematoxilina-eosina (HE), e picrossírius (PS).

Para a análise histomorfométrica, foram avaliadas as lâminas com cortes transversais do coração ao nível da inserção dos músculos papilares (região equatorial do coração). Nas lâminas coradas por HE foi medida a espessura do septo interventricular e o diâmetro dos cardiomiócitos. Nas lâminas coradas por PS, foram medidas as áreas de fibrose intersticial e perivascular. As análises foram feitas pelo próprio pesquisador após treinamento específico e com as lâminas identificadas apenas com números (sem identificação de grupos) como descrito abaixo:

1- Espessura do septo interventricular: Após aquisição de fotos em modo “macro” das lâminas utilizando-se suporte em acrílico, mini-escalímetro (Trident, Itapuí, SP, Brasil) e câmera digital com resolução de 16Mpixels (Samsung Galaxy

Câmera®, Samsung Eletrônica da Amazônia LTDA, Manaus, AM, Brasil), as fotos forma analisadas com a utilização do software ImageJ versão 1.52h (National Institutes of Health, EUA). Com escala calibrada em milímetros, foram feitas 10 medidas da espessura do septo interventricular (EspSIV) em dois cortes transversais do coração de cada animal (total de 20 medidas). Foi tomada como medida da EspSIV para um determinado animal a média das 20 medidas (Figura 23) (Koike *et al.*, 2007).

**Figura 23:** Medida da espessura do septo interventricular.



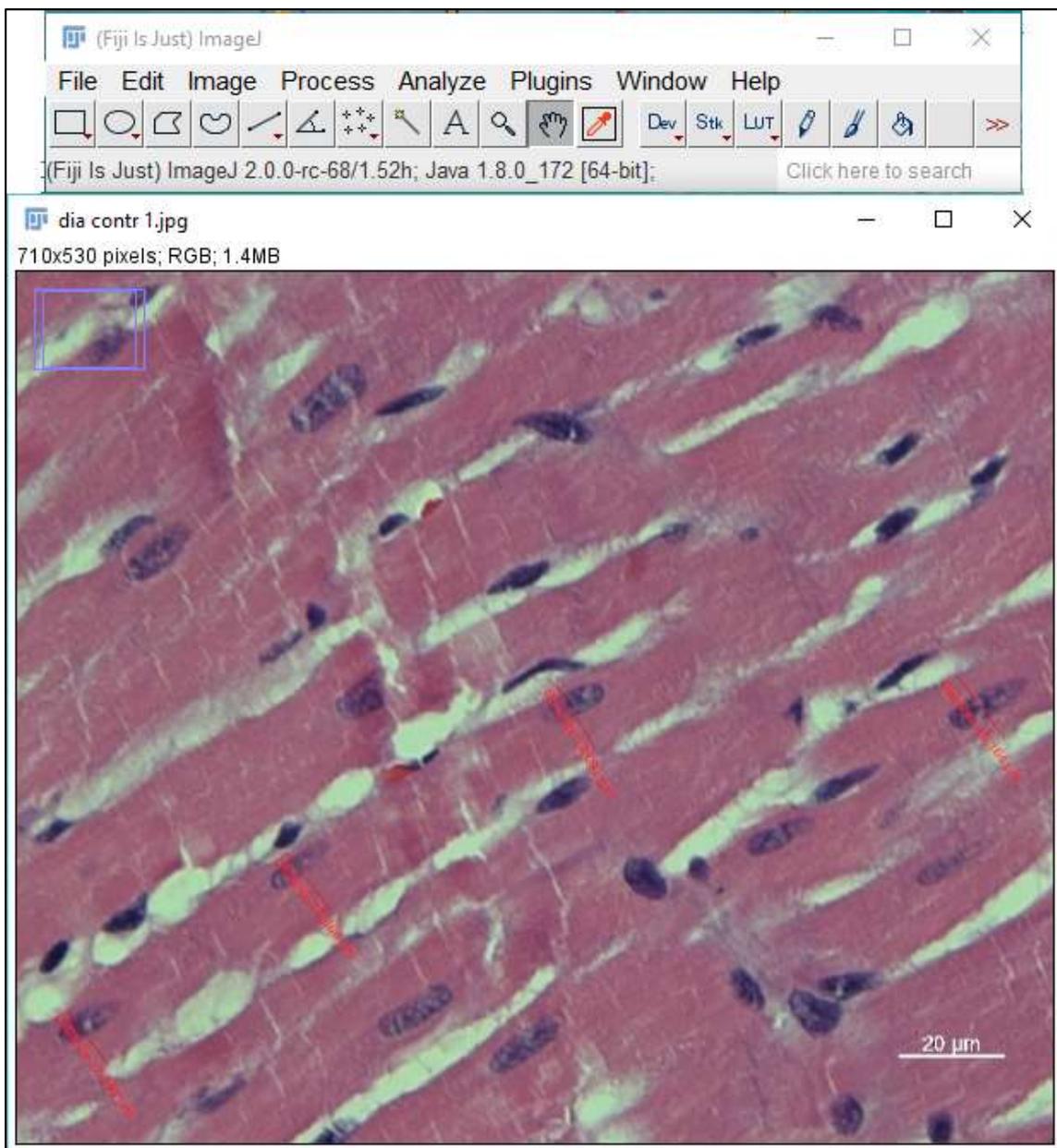
Fonte: Arquivo pessoal.

2- Diâmetro dos cardiomiócitos: Nas mesmas lâminas com cortes transversais do coração e na coloração HE, foi feita a captura das imagens com a utilização de microscópio Axio Scope A1 equipado com câmera digital Axio Cam 506c e *software* Axiovision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States). Foram feitas aquisição de 20 campos em dois cortes transversais do coração de cada animal com magnificação de 400x. Posteriormente, as imagens foram analisadas com a utilização do software ImageJ versão 1.52h (National Institutes of Health, EUA) e medido o diâmetro dos cardiomiócitos. Somente cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis foram analisados (aproximadamente 40 cardiomiócitos por animal), obtendo-se a medida da secção transversal de um limite ao outro da célula, passando pelo centro do núcleo (Figura 24) (Koike *et al.*, 2007; Custodio *et al.*, 2012).

3- Área de fibrose intersticial e perivascular: Nas mesmas lâminas com cortes transversais do coração, porém na coloração com PS, foi feita a captura das imagens com a utilização de microscópio Axio Scope A1 equipado com câmera digital Axio

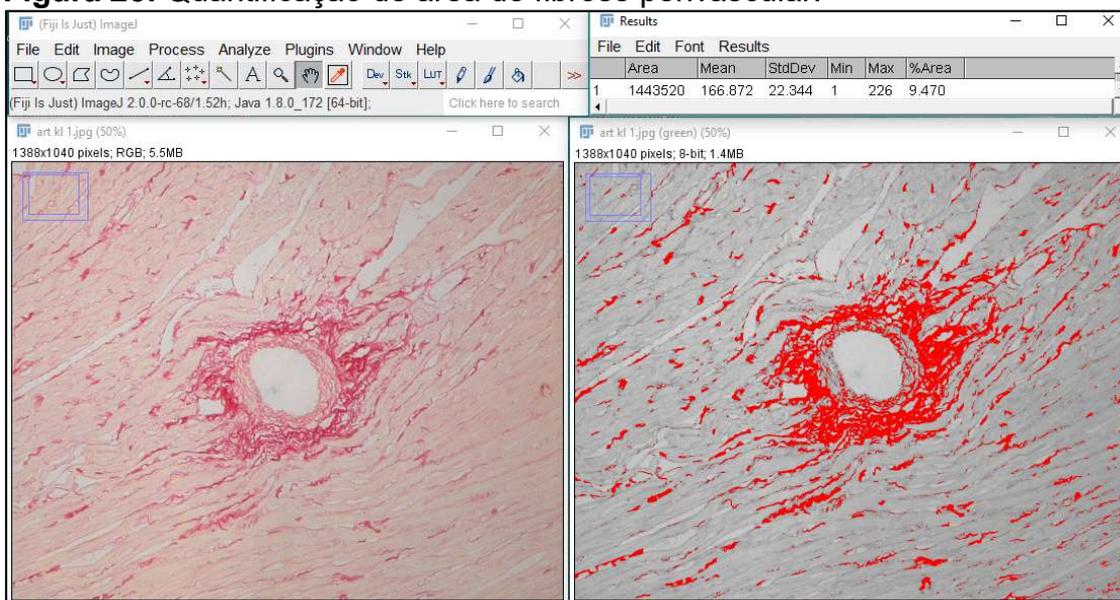
Cam 506c e *software* Axiovision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States). Foram feitas aquisição de 10 campos de miocárdio sem vasos e fotos das 4 principais artérias (descendente anterior, circunflexa, descendente posterior e septal) em dois cortes transversais do coração de cada animal com magnificação de 200x. Posteriormente, as imagens foram analisadas com a utilização do *software* ImageJ versão 1.52h (National Institutes of Health, EUA), sendo calculada a área com coloração vermelha utilizando-se da técnica de “*Threshold*” pelo método “*Default*” do programa (Figura 25) (Brilla *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2017).

**Figura 24:** Medida da secção transversal (diâmetro) dos cardiomiócitos.



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 25:** Quantificação de área de fibrose perivascular.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 6.5.6. Imuno-histoquímica.

Através da técnica de Imuno-histoquímica (IHC) foi avaliada a expressão tecidual de marcadores de hipertrofia e fibrose: MHC $\beta$  (*myosin heavy chain beta*) e  $\alpha$ SMA (*alpha-smooth muscle actin*). Além desses dois marcadores, foi também avaliada a expressão de TRPC6 na membrana dos cardiomiócitos. A técnica foi realizada no Laboratório de Patologia do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (INCOR-FMUSP, São Paulo, Brasil) e a análise feita pelo próprio pesquisador após treinamento específico em lâminas identificadas apenas por números.

Quanto à técnica de imuno-histoquímica, foram montadas lâminas em branco (sem coloração) com secções transversais de 5 $\mu$ m de coração em lâminas silanizadas (Easypath, Indaiatuba, Brasil). As secções de tecido foram então desparafinadas em 3 banhos de Xilol por 10 minutos cada e hidratadas passando por 2 banhos de Álcool 100°, 1 de Álcool 95°, 1 de Álcool 80° e 1 de Álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água deionizada.

Para os Anticorpos anti-MHC $\beta$  (MYH7 Monoclonal Antibody (TH81 (BGN/04/4481), Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) e anti- $\alpha$ SMA (Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibody (1A4asm-1), Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) foi feita a recuperação de antígeno mergulhando as lâminas em Tampão Citrato PH 6,0 (Diagnostic BioSystems) e colocadas em panela de pressão Pascal (Dako, Glostrup, Dinamarca) calibrada para alcançar pressão a 124°C por 1 minuto. Para o

anticorpo anti-TRPC6-extracelular ACC-120 (Alomone Labs, Jerusalém, Israel) não é necessária a recuperação de antígeno e essa etapa não foi feita.

Depois de retiradas da panela de pressão as lâminas foram resfriadas dentro do líquido sobre a bancada por 20 minutos. Logo após foram lavadas em água deionizada. Foi feito então o bloqueio da peroxidase endógena com o Bloqueador de Peroxidase (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US) pingando-se puro sobre as lâminas. Foram feitas 3 trocas de 5 minutos cada, sem lavar as lâminas entre as trocas. Depois disso as lâminas foram lavadas em água deionizada.

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de Tampão de lavagem TBS com Tween (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US) e feito o bloqueio proteico com Protein Block® (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US) pingando-o puro sobre as lâminas e deixado incubando por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois as lâminas não foram lavadas, apenas deixou-se escorrer o Protein Block® e, em seguida, foi pingado o anticorpo primário sobre as lâminas e deixado incubando *overnight* a 4°C em bandeja de acrílico umedecida. Os anticorpos primários foram preparados usando-se o Antibody Diluent® (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US) como diluidor. Os Anticorpos Primários foram preparados nas seguintes diluições: anti- $\alpha$ SMA: 1/800; anti-MHC $\beta$ : 1/800 e anti-TRPC6-extracelular: 1/250.

No dia seguinte escorreu-se o anticorpo primário e as lâminas foram lavadas em 3 banhos de TBS por 5 minutos cada. Depois foi usado o Sistema de Amplificação de IMH (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US) composto de complemento pronto para uso que foi pingado puro sobre as lâminas e deixado incubando por 10 minutos a temperatura ambiente, e de Conjugado HRP que foi pingado sobre as lâminas puro e deixado por 15 minutos, a temperatura ambiente. Não houve lavagem das lâminas entre os dois reagentes, apenas deixou-se escorrer o primeiro e pingou-se o segundo. Depois as lâminas foram lavadas em 3 banhos de TBS por 5 minutos cada.

A revelação da reação com DAB (Diaminobenzidina) foi feita com *Kit* contendo substrato e cromógeno (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, US). O DAB foi preparado com 1 ml de substrato e 1 gota de cromógeno. Após agitar bem a solução, pingou-se a mesma sobre as lâminas deixando-a agir por até 10 minutos a temperatura ambiente, observando-se a mudança de cor do tecido até o ponto ideal, quanto a reação foi então interrompida escorrendo-se o DAB em um recipiente contendo solução de Hipoclorito de Sódio 5 % e lavando as lâminas com vários banhos de água deionizada.

Na etapa seguinte, as lâminas foram coradas por 2 minutos com Hematoxilina de Harris, lavadas em água deionizada e passadas por 2 banhos de álcool 95°, 3 de álcool 100° e 3 de xilol. Depois as lâminas foram montadas com lamínulas com meio de montagem e observadas ao microscópio.

Na avaliação da imuno-histoquímica, foi usado um microscópio óptico (Axiophot HBO50, Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) dotado de câmera digital colorida para captura de imagens com resolução de 10 Mpixels (AmScope câmera MU100, United Scope LLC, California, USA) acoplado a um computador. Foram feitas capturas de até 10 campos consecutivos e não sobrepostos, cobrindo toda a circunferência do ventrículo esquerdo sob aumento de 200x. Em cada campo foi estimada a área corada por DAB com utilização do *software* ImageJ versão 1.52h (National Institutes of Health, EUA) conforme técnica previamente descrita (Helps *et al.*, 2012).

#### **6.5.7. Dosagem de $\alpha$ Klotho por Imunoprecipitação-ImunoBlot.**

A expressão do Klotho solúvel presente no soro foi avaliada pelo método de imunoprecipitação e posterior detecção por *western blotting*. As amostras de soro congeladas foram enviadas em gelo seco e analisadas no laboratório do Prof. Orson W. Moe (Charles Pak Center of Mineral Metabolism and Clinical Research, UTSW Medical Center, Dallas, Texas, EUA), segundo método previamente descrito (Barker *et al.*, 2015).

Neste método, após descongelar parcialmente as amostras em banho-maria a 37°C, as mesmas foram colocadas imediatamente em gelo e transferido 50µl de soro de cada amostra para tubos de polipropileno de baixa adesão de 1,5ml (USA Scientific Inc., Orlando, FL, EUA) previamente identificados e resfriados em gelo. Em seguida, foi acrescentado 400µl de tampão de Krebs gelado [25 mM HEPES–NaOH (pH 7.4), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], contendo 2µg do anticorpo anti- $\alpha$ Klotho SB106 (Creative-Biolabs, Shirley, NY, EUA) e incubados a 4°C *overnight* sob agitação.

Na manhã seguinte, adicionou-se 50 µL de *Sepharose beads* conjugadas com anticorpo anti-FLAG (50% M2-Flag-Tag beads, Sigma-Aldrich A2220I, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e incubou-se por duas horas a 4 °C sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados em micro centrífuga refrigerada a 4°C a 5000g por 60s para formação de “*pellet*”. Em seguida, aspirou-se o sobrenadante e lava-se

com 500 $\mu$ L de tampão de Krebs gelado, sendo esta etapa repetida 3 vezes. Por fim, aspirou-se o sobrenadante completamente com cautela e adicionou-se 50 $\mu$ L de tampão de amostra 2xSDS-DDT (Invitrogen® Novex®, NuPAGE-SDS Sample Buffer, Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA, EUA), sendo em seguida aquecido à 100°C por 3 minutos e depois resfriado em gelo e centrifugado 5000g por 60s. O sobrenadante ( $\approx$ 45 $\mu$ L) foi então gentilmente aspirado e transferido para novos tubos de 1,5ml previamente identificados. Desse sobrenadante, 20 $\mu$ L de cada amostra foi fracionada por eletroforese em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida pré-moldado (Invitrogen® Novex® NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Midi Protein Gels, Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA, EUA) a 150 volts por 1 hora. Teve-se o cuidado de se incluir em cada gel, além do marcador de peso molecular, pelo menos 3 padrões com concentrações conhecidas, para posterior quantificação.

Na etapa seguinte, após a eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Para a realização da transferência, a membrana foi colocada em contato com o gel de separação e envolta por folhas de papel filtro e esponja. O conjunto formado foi mergulhado no tampão de transferência (20% metanol e 80% do tampão composto por 25mM tris-base e 0,2M glicina) gelado. A transferência foi realizada durante 600 minutos (*overnight*) a 40 volts a 4°C.

No dia seguinte, o conjunto foi desfeito e a membrana contendo as proteínas foi então lavada com TBST (20mM tris-base pH=7,5, 0,5M NaCl e 0,05% Tween 20). A membrana de nitrocelulose foi então bloqueada com 5% de leite desnatado + 2% soro de cabra diluídos em TBST e filtrado em gaze, durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes em TBST em agitação durante 10 minutos e, na sequência, incubadas com o anticorpo primário anti- $\alpha$ Klotho KM2076 (TransGenic Inc., Tokyo, Japão) na diluição 1:10.000 em diluente específico (Dako # S3022, Carpinteria, CA, EUA) durante a noite, a 4°C e sob agitação contínua.

Na manhã seguinte, a solução com anticorpo primário foi recolhida para reaproveitamento e a membrana lavada 3 vezes por 10 minutos com TBST. Após término da lavagem, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG2a (NA935, GE Healthcare, EUA) na diluição de 1:20.000 na mesma solução de bloqueio e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida lavou-se 4 vezes por 10 minutos com TBTT.

Para quimiluminescência, cobriu-se a membrana com substrato de máxima sensibilidade Femto® (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), e incubou-se por 5 minutos, retirando-se o excesso em seguida e montou-se a mesma entre folhas de transparência em cassete para filme de raio x. Em câmara escura, colocou-se um filme de raio x dentro do cassete e expõe-se por 30-90s, sendo em seguida revelado em processadora automática.

Para quantificação, digitalizou-se o filme através de escâner e realizou-se a análise densitométrica da banda de 130-kD, utilizando-se do software Image Studio® Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA). Através dos padrões com concentrações conhecidas (20, 40 e 80µM), foi construída uma curva padrão e calculadas as concentrações das amostras.

#### **6.5.8 – WesternBlot de proteínas de interesse no miocárdio.**

A pesquisa de proteínas de interesse no miocárdio através da técnica de WesternBlot foram realizadas no laboratório da Profa. Dra. Mírian A. Boim (Disciplina de Nefrologia, UNIFESP, São Paulo)

Os fragmentos de coração foram homogeneizados utilizando um dispositivo homogeneizador Precellys 24 em tampão gelado [TRIS 50mM (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA), NaCl 150 mM (Labsynth, Diadema, Brasil), 1,0% nonidet-P-40 (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA, Estados Unidos), 0,5% de sódiodesoxicolato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 0,1%SDS, (pH 8,0; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)] contendo inibidores de protease (Coquetel Inibidor de Protease; SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA). A concentração total de proteínas foi quantificada usando-se o método de Lowry modificado (Bio-Rad DC reagente de ensaio proteico; Bio-Rad Laboratories). Amostras de proteína (50 µg) foram separados de acordo com o tamanho por eletroforese em 12% SDS-PAGE e transferidas em membranas de nitrocelulose (GE LifeSciences, Little Chalfont, Reino Unido). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários durante a noite a 4°C e, após lavagem 4x10min TBST, com anticorpos secundários conjugados com HRP por 1 h a temperatura ambiente. Foram usados s seguintes anticorpos primários: Anti-FGF21 1:1.000 (Invitrogen, PA5-44325), e Anti-αSMA 1:1.000 (Invitrogen, MA5-11547). Em seguida, as membranas foram incubadas com secundário anti-coelho IgG 1:30.000 (GE LifeCiências) conjugado com HRP. As bandas de proteínas foram visualizadas

usando o Immobilon Western Substrato de HRP (Millipore). As bandas obtidas foram quantificadas usando o software de análise Uvitec (Uvitec Limited, Cambridge, Reino Unido (Maquigussa *et al.*, 2018).

### 6.5.9 - PCR quantitativo em tempo real.

A pesquisa da expressão de genes de interesse no miocárdio através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Niels Olsen S. Câmara (LICE-Laboratório Imunologia clínica e Experimental, UNIFESP, São Paulo).

No qRT-PCR foi utilizado o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) de amplificação que se constitui de uma mistura comercial de reagentes utilizados para a PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix - Applied Biosystems) e *mix* de primers e sondas específicos “customizados” (Assay-on-demand® 20x - Applied Biosystems). No sistema TaqMan® o fluoróforo (FAM) que reporta a amplificação, encontra-se ligado à sonda e não aos primers. Em consequência, cada sonda que se hibridiza ao cDNA, com subsequente extensão, gera o sinal referente à amplificação de apenas uma molécula alvo.

Todas amostras foram feitas em triplicata, contendo um volume final de reação de 10µL, dos quais 5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1µL de cDNA de cada amostra, 0,5µL de *mix* de primers e sondas e por fim água ultrapura q.s.p. 10 µL.

Quanto à técnica, as reações foram realizadas em termocicladora 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystem, Cingapura). As condições de amplificação para o sistema TaqMan® são padronizadas e universais para qualquer amplificado. Uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT) foi usada para determinar a expressão gênica do gene alvo em relação ao gene controle HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* - proteína constitutiva) (Mn00443358\_m1). Para o nosso experimento, foram utilizados os *primers* para: TRPC6 (Rn00677559\_m1), FGF-21 (Rn00590706\_m1), βKlotho (Rn00580123\_m1), βMHC (Rn00691731\_m1), αMHC (Rn00691721\_g1), αActina (Rn01513700\_g1), Acta2 (Rn01759928\_g1) e Col3a1 (Rn01437681\_m1).

Para cada amostra, os valores (CT) dos genes alvo foram normalizados pelo seu respectivo gene controle, e o valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo através da expressão  $2^{-\Delta\Delta CT}$  previamente descrita (Livak e Schmittgen,

2001). Dessa maneira, níveis relativos de mRNA são expressos como uma diferença de “n” vezes em relação a uma amostra controle, em nosso caso sempre a mesma amostra na condição basal.

## 6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, mediana (IQR) ou porcentagem. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis. As comparações entre grupos foram realizadas usando ANOVA seguida do teste de Tukey para variáveis de distribuição normal e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnet para as variáveis não paramétricas. Foi considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ . Todos os cálculos estatísticos foram realizados com uso do SPSS 22.0® (Chicago, EUA) e Prism 7® (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 7. RESULTADOS

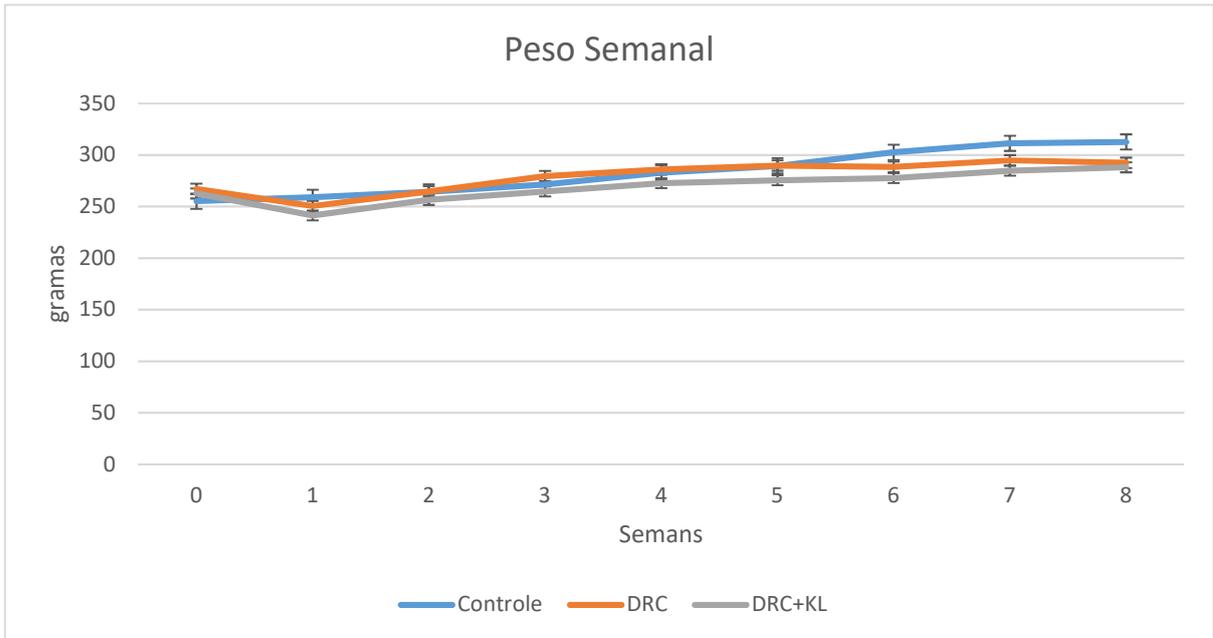
### 7.1. SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS, CURVA DE PESO APÓS NEFRECTOMIA 5/6 E PRESSÃO ARTERIAL.

Após a nefrectomia 5/6, foi observada mortalidade de 30% na primeira semana, não sendo observado óbitos no grupo controle submetido a cirurgia *Sham*. Além disso, foi observada uma redução de cerca de 10% do peso do animal na primeira semana de pós-operatório após a nefrectomia (semana de recuperação). A partir da segunda semana, todos os animais apresentaram curva ascendente de peso, não havendo diferença significativa de peso entre os grupos no final da oitava semana (Controle:  $312,6 \pm 30,5$  vs DRC:  $292,4 \pm 32,26g$ ,  $p = 0,98$  e Controle:  $312,6 \pm 30,5$  vs DRC+KL:  $288,1 \pm 35,2g$ ,  $p = 0,24$ ) (Figura 26).

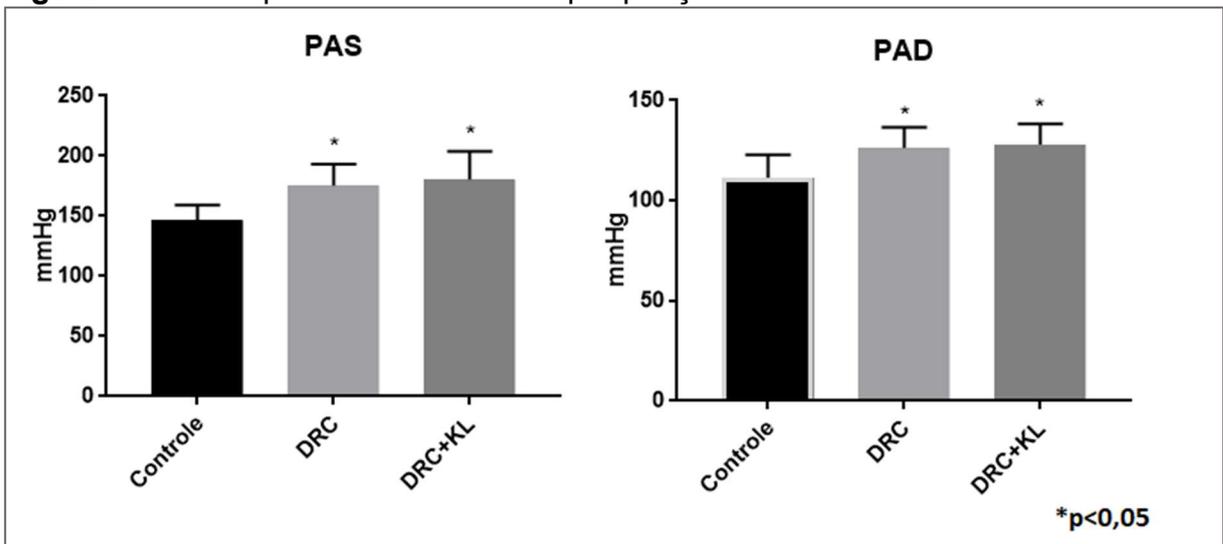
Os animais submetidos à nefrectomia 5/6 apresentavam níveis mais elevados tanto de pressão sistólica (Controle:  $146,7 \pm 12,43$  vs DRC:  $175,4 \pm 17,8mmHg$ ,  $p = 0,006$  e Controle:  $146,7 \pm 12,43$  vs DRC+KL:  $180,3 \pm 23,5mmHg$ ,  $p = 0,002$ ) como diastólica (Controle:  $111,4 \pm 11,56$  vs DRC:  $126,2 \pm 10,3mmHg$ ,  $p = 0,01$  e Controle:  $111,4 \pm 11,56$  vs DRC+KL:  $128,0 \pm 10,3mmHg$ ,  $p = 0,008$ ) em relação ao grupo controle, medida diretamente por punção carotídea no dia da eutanásia. Não houve diferença na

pressão arterial sistólica (DRC:  $175,4 \pm 17,8$  vs DRC+KL:  $180,3 \pm 23,5$  mmHg,  $p=0,81$ ) ou diastólica entre os animais nefrectomizados (DRC:  $126,2 \pm 10,3$  vs DRC+KL:  $128,0 \pm 10,3$  mmHg,  $p=0,92$ ) (Figura 27).

**Figura 26:** Curva de peso dos animais.



**Figura 27:** Níveis pressóricos medidos por punção carotídea no dia da eutanásia.

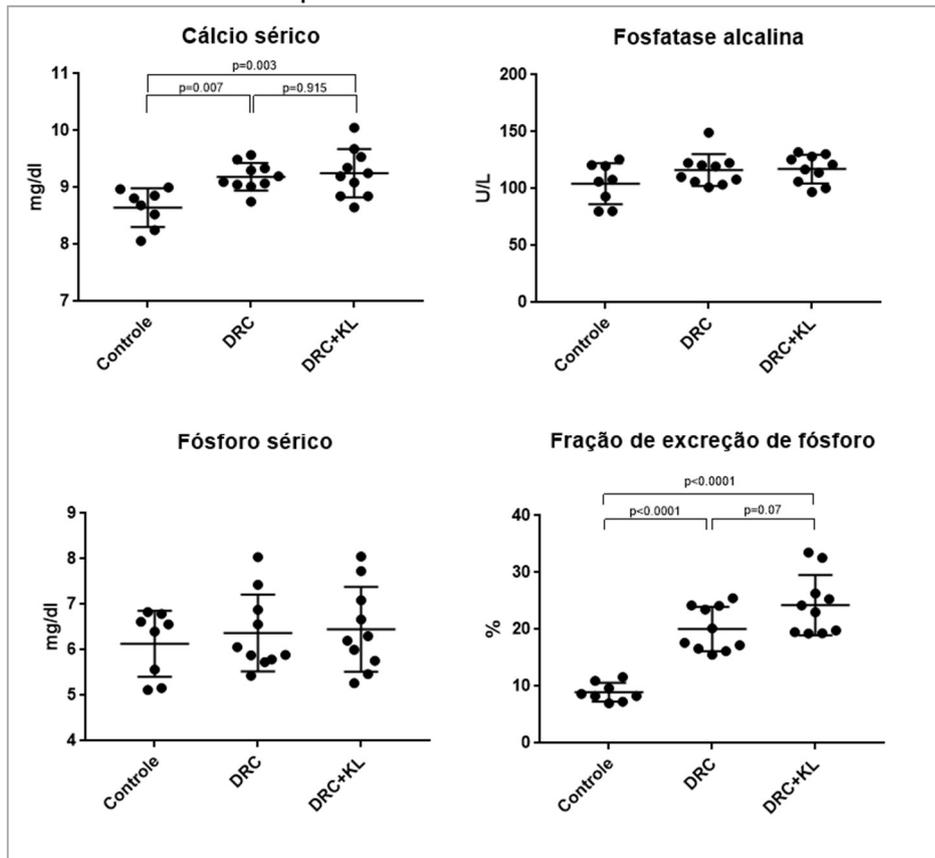


(\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle)

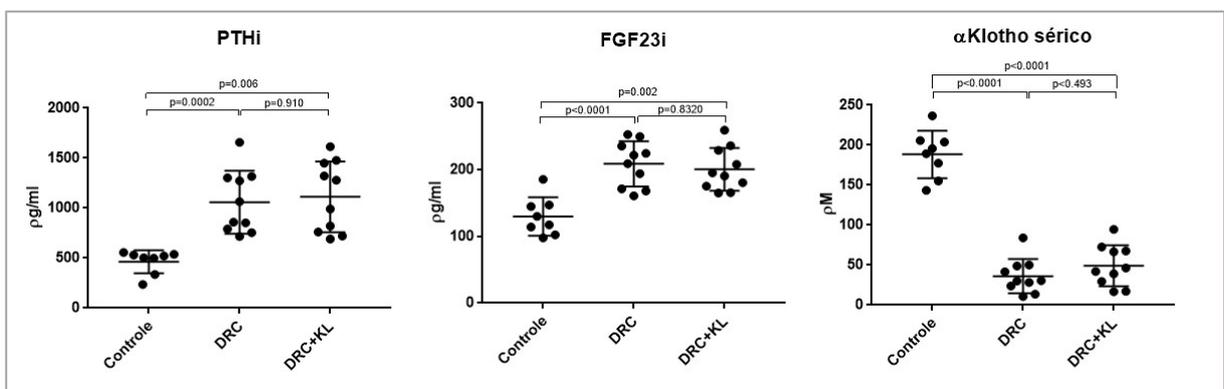


Da mesma forma, a nefrectomia 5/6 impactou no metabolismo mineral e ósseo, com elevações nos níveis séricos de cálcio, fração de excreção de fósforo (FeP), PTHi, FGF23 e diminuição dos níveis séricos de  $\alpha$ Klotho. Por outro lado não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos de fósforo e fosfatase alcalina (Tabela 4, Figuras 29 e 30).

**Figura 29:** Parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo mineral e ósseo, avaliados na 8ª semana de experimento.



**Figura 30:** Parâmetros hormonais relacionados ao metabolismo mineral e ósseo, avaliados na 8ª semana de experimento.



### 7.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS.

Na avaliação ecocardiográfica, foram observados no grupo DRC aumento significativo dos parâmetros indicativos de HVE tanto em relação ao grupo controle quanto em relação ao grupo tratado com rKlotho, sendo eles: espessura do septo interventricular, espessura da parede posterior e massa estimada do VE. No grupo tratado com rKlotho, não foi observada diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Não foram observadas alterações significativas na função sistólica avaliada pela fração de encurtamento do VE ( $\Delta D$ -VE) e pela fração de ejeção do VE (FE-VE) entre os 3 grupos. Quanto à função diastólica, tanto o diâmetro do átrio esquerdo como a relações E/E' se mostraram significativamente maiores, enquanto a relação E'/A' se mostrou significativamente menor nos animais nefrectomizados (DRC e DRC+KL) quando comparadas às encontradas no grupo controle (Tabela 5).

**Tabela 5:** Parâmetros ecocardiográficos, avaliados na 8ª semana de experimento.

Parâmetro	Controle	DRC	DRC+KL
Septo (mm)	1,41 ± 0,10	1,58 ± 0,11*	1,42±0,10
Parede post. (mm)	1,45 ± 0,07	1,54 ± 0,09*	1,42±0,08
Massa VE (mg)	736,5±123,4	883,1 ± 128,4*	750,4±114,8
$\Delta D$ -VE (%)	40,23 ± 2,47	38,87 ± 2,89	40,40±2,04
FE-VE (%)	76,16 ± 2,81	73,48 ± 3,63	76,41±2,19
Átrio esq.(mm)	4,72 ± 0,54	5,81 ± 0,46#	5,49±0,56#
E/A	2,29 ± 0,42	2,02 ± 0,35	2,08±0,36
E'/A'	3,20 ± 0,84	2,11 ± 0,39#	2,02±0,52#
E/E'	2,56 ± 0,69	3,48 ± 0,80#	3,81±0,69#

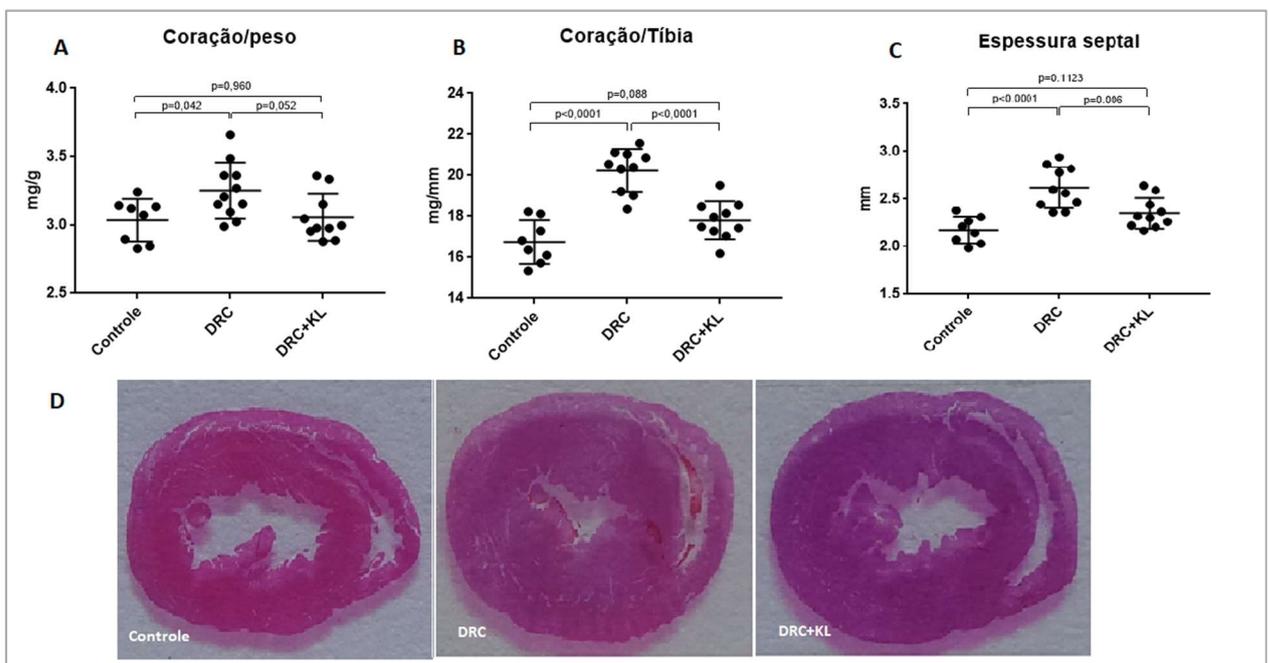
\*p<0,05 na comparação com os grupos Controle e DRC+KL. #p<0,05 na comparação com o grupo Controle.

### 7.4. AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA PELO PESO CARDÍACO E PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS.

A razão entre o peso do coração/peso do animal (Controle:3,03±0,15 vs DRC:3,25±0,20mg/g; p=0,04) e a razão entre peso do coração / comprimento da tíbia (Controle:16,75±1,06 vs DRC:20,24±1,04mg/mm; p<0,0001), foram mais elevadas no grupo DRC em relação ao grupo controle. Quanto ao grupo tratado com rKlotho, observamos redução da razão peso do coração/comprimento da tíbia em relação ao grupo DRC (DRC:20,24±1,04 vs DRC+KL:17,81±0,92; p<0,0001) (Figura 31B).

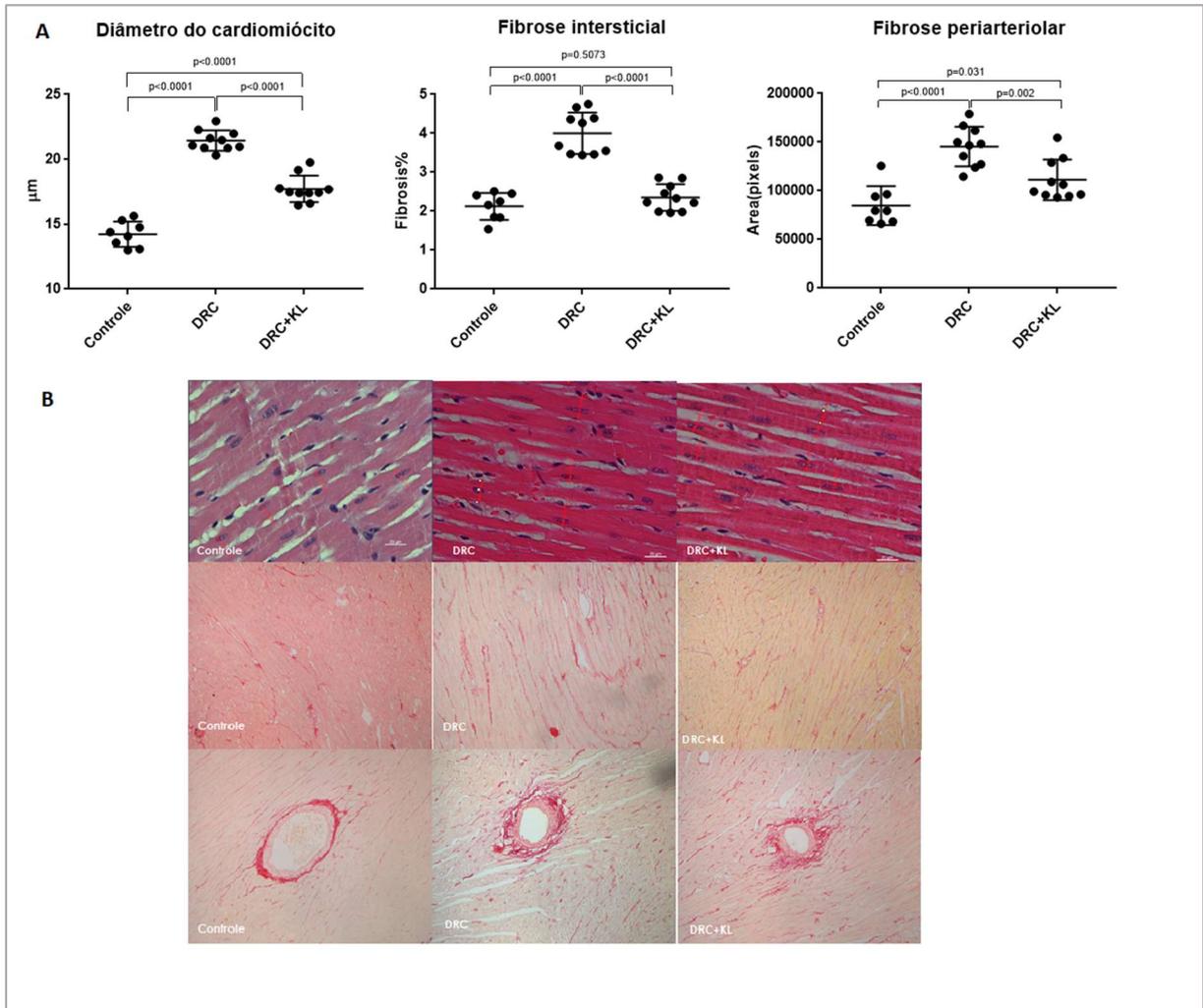
Ratificando o observado ao ecocardiograma, o septo interventricular se mostrou mais espessado no grupo DRC sem tratamento, quando medido diretamente na secção transversal do coração (Controle:  $2,17 \pm 0,14$  vs DRC:  $2,62 \pm 0,21$ mm;  $p < 0,0001$  e DRC:  $2,62 \pm 0,21$  vs DRC+KL:  $2,3 \pm 0,16$ mm;  $p = 0,006$ ) (Figura 31C).

**Figura 31:** Avaliação da remodelação cardíaca: Pelas razões do peso cardíaco / peso do animal (A) e peso cardíaco / comprimento da tíbia (B) e por medida direta da espessura do septo interventricular (C). Fotos ilustrativas de cortes transversais do coração a nível equatorial e coradas com H&E, macro (D).



Na avaliação dos parâmetros histomorfométricos foram observados aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos (Controle:  $14,23 \pm 0,98$  vs DRC:  $21,44 \pm 0,78 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ) e maior quantidade de fibrose, tanto intersticial (Controle:  $2,12 \pm 0,34$  vs DRC:  $4,0 \pm 0,53$  %área;  $p < 0,0001$ ) quanto periarteriolar (Controle:  $84.931 \pm 19.960$  vs DRC:  $145.411 \pm 20.356$  pixels-área;  $p < 0,0001$ ), no grupo DRC sem tratamento, enquanto que no grupo DRC com reposição de rKlotho foi observada uma atenuação destes mesmos parâmetros: diâmetro dos cardiomiócitos (DRC:  $21,44 \pm 0,78$  vs DRC+KL:  $17,71 \pm 1,02 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ), fibrose intersticial (DRC:  $4,0 \pm 0,53$  vs DRC+KL:  $2,35 \pm 0,34$  %área;  $p < 0,0001$ ) e fibrose periarteriolar (DRC:  $145.411 \pm 20.356$  vs DRC+KL:  $11.184 \pm 20.872$  pixels-área;  $p = 0,002$ ) (Figura 32).

**Figura 32:** Avaliação da remodelação miocárdica por histomorfometria: A – Medida do diâmetro dos cardiomiócitos e das áreas de fibrose intersticial e periarteriolar. B – Fotos ilustrativas de tecido miocárdico nas colorações H&E, 400x e Picrosírius, 200x.

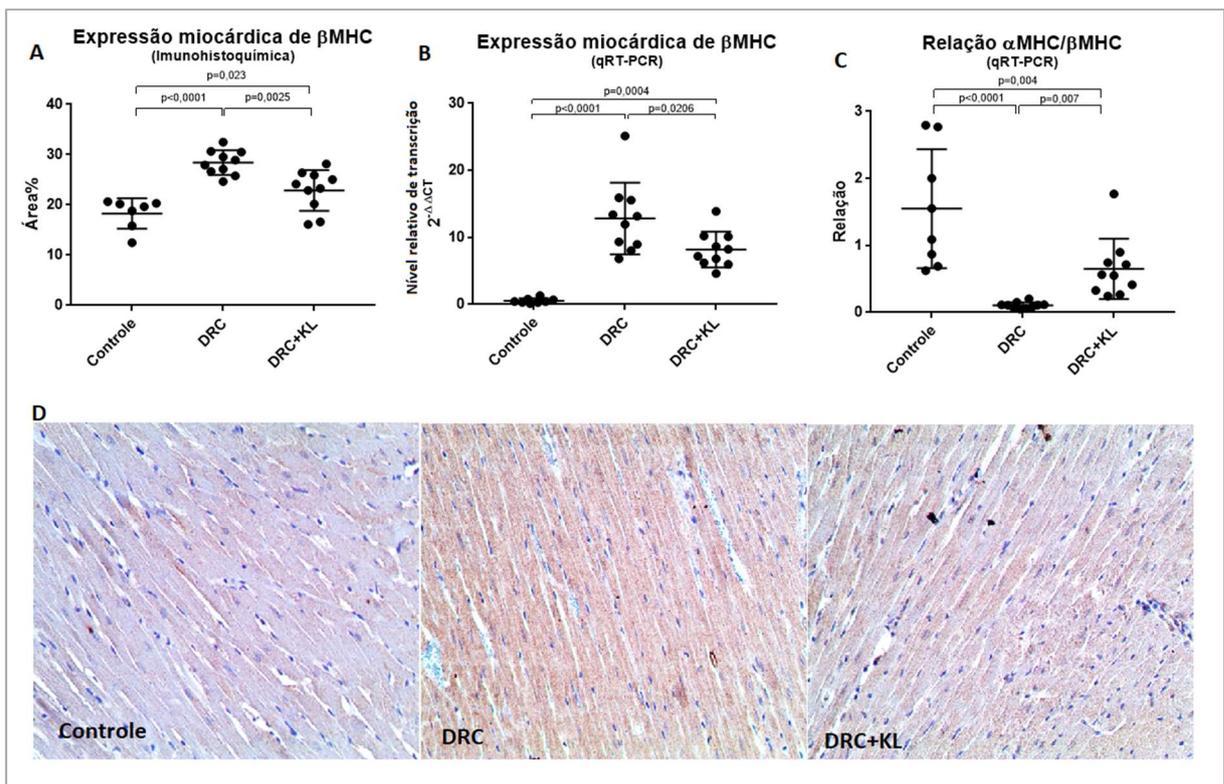


## 7.5. AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO MIOCÁRDICA ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE HIPERTROFIA E FIBROSE.

A hipertrofia miocárdica foi avaliada através da expressão tecidual da cadeia pesada- $\beta$  da miosina ( $\beta$ MHC) e sua relação com a expressão da cadeia pesada- $\alpha$  ( $\alpha$ MHC). Em situações onde há remodelação miocárdica, há aumento da expressão de  $\beta$ MHC em detrimento da  $\alpha$ MHC. Observamos elevação significativa na expressão tecidual de  $\beta$ MHC no grupo DRC tanto a nível de mRNA por qRT-PCR (Controle:  $0,54 \pm 0,37$  vs DRC:  $12,83 \pm 5,33$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p < 0,0001$ ) quanto a nível proteico por IHC (Controle:  $18,28 \pm 3,03$  vs DRC:  $28,42 \pm 2,44$  %área;  $p < 0,0001$ ), porém, com

atenuação no grupo tratado com rKlotho em relação ao grupo sem tratamento: por IHC (DRC:28,42±2,44 vs DRC+KL:22,87±4,05 %área,  $p=0,002$ ) e por qRT-PCR (DRC:12,83±5,33 vs DRC+KL:8,19±2,68  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,02$ ) (Figura 33 A e B). A relação MHC $\alpha$ /MHC $\beta$  foi avaliada a nível de expressão de mRNA por qRT-PCR, sendo observado redução significativa da relação no grupo DRC em relação ao controle (Controle:1,55±0,88 vs DRC:0,10±0,04  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p<0,0001$ ), e recuperação parcial no grupo tratado em relação ao DRC sem tratamento (DRC:0,10±0,04 vs DRC+KL:0,65±0,45  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,007$ ) (Figura 33C).

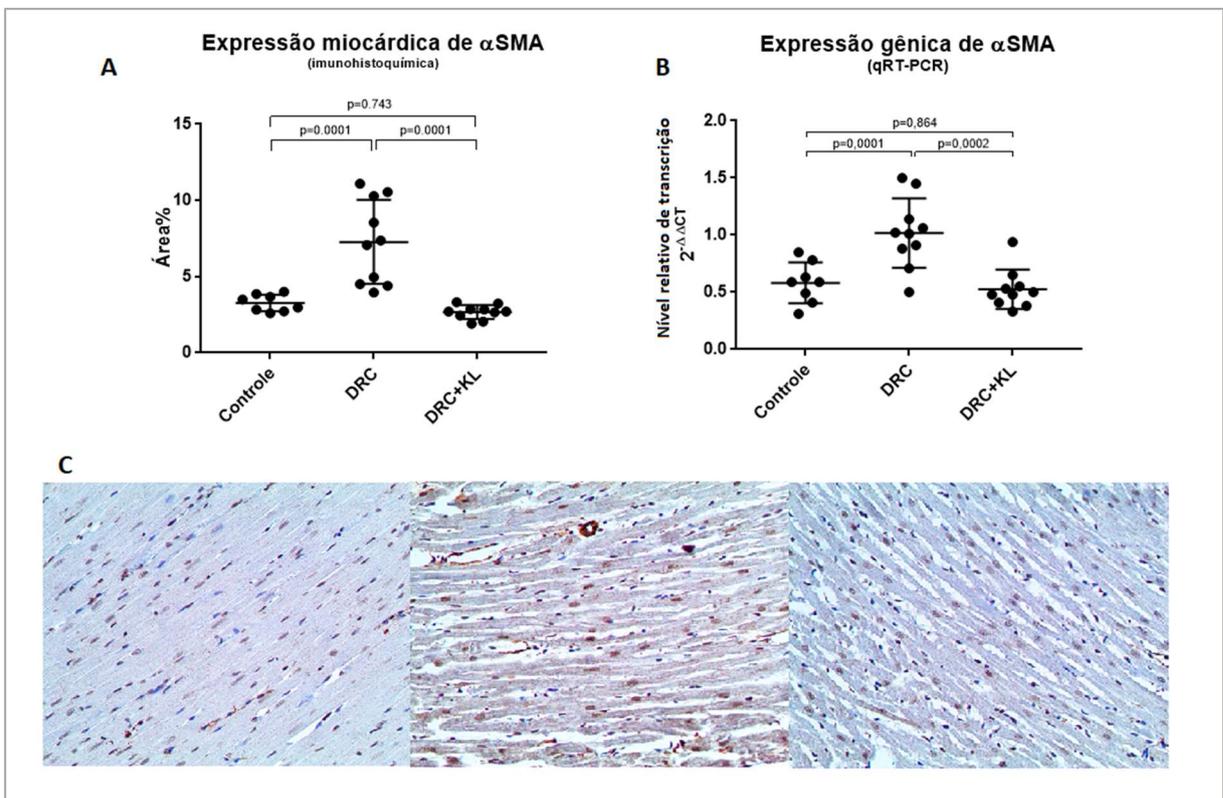
**Figura 33:** Avaliação da remodelação miocárdica através da expressão tecidual de  $\beta$ MHC e da relação  $\alpha$ MHC/ $\beta$ MHC. A – Expressão de  $\beta$ MHC quantificada por IHC e B- por qRT-PCR. C – Relação da expressão de mRNA entre  $\alpha$ MHC e  $\beta$ MHC. D – Fotos ilustrativas de miocárdio com IHC com anti- $\beta$ MHC+DAB (padrão sarcomérico), 200x.



Como marcador de fibrose, foi avaliada a expressão tecidual de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) por imuno-histoquímica e qRT-PCR. No miocárdio a  $\alpha$ SMA é pouco expressa em condições normais, mas sua expressão se eleva em situações de remodelação nos cardiomiócitos, sobretudo com o surgimento de miofibroblastos. Observou-se aumento significativo da expressão a nível de mRNA por qRT-PCR no

grupo DRC em comparação ao controle (Controle:  $0,58 \pm 0,18$  vs DRC:  $1,02 \pm 0,20$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,0001$ ). Entretanto, no grupo DRC que recebeu reposição de rKlotho, observou-se retorno aos níveis basais de expressão de  $\alpha$ SMA (DRC:  $1,02 \pm 0,20$  vs DRC+KL:  $0,52 \pm 0,17$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,0002$ ). Este mesmo padrão foi encontrado a nível proteico pela IHC (Controle:  $3,27 \pm 0,55$  vs DRC:  $7,27 \pm 2,75$  %área;  $p=0,0001$  e DRC:  $7,27 \pm 2,75$  vs DRC+KL:  $2,67 \pm 0,45$  %área;  $p=0,0001$ ), confirmando este achado (Figura 34).

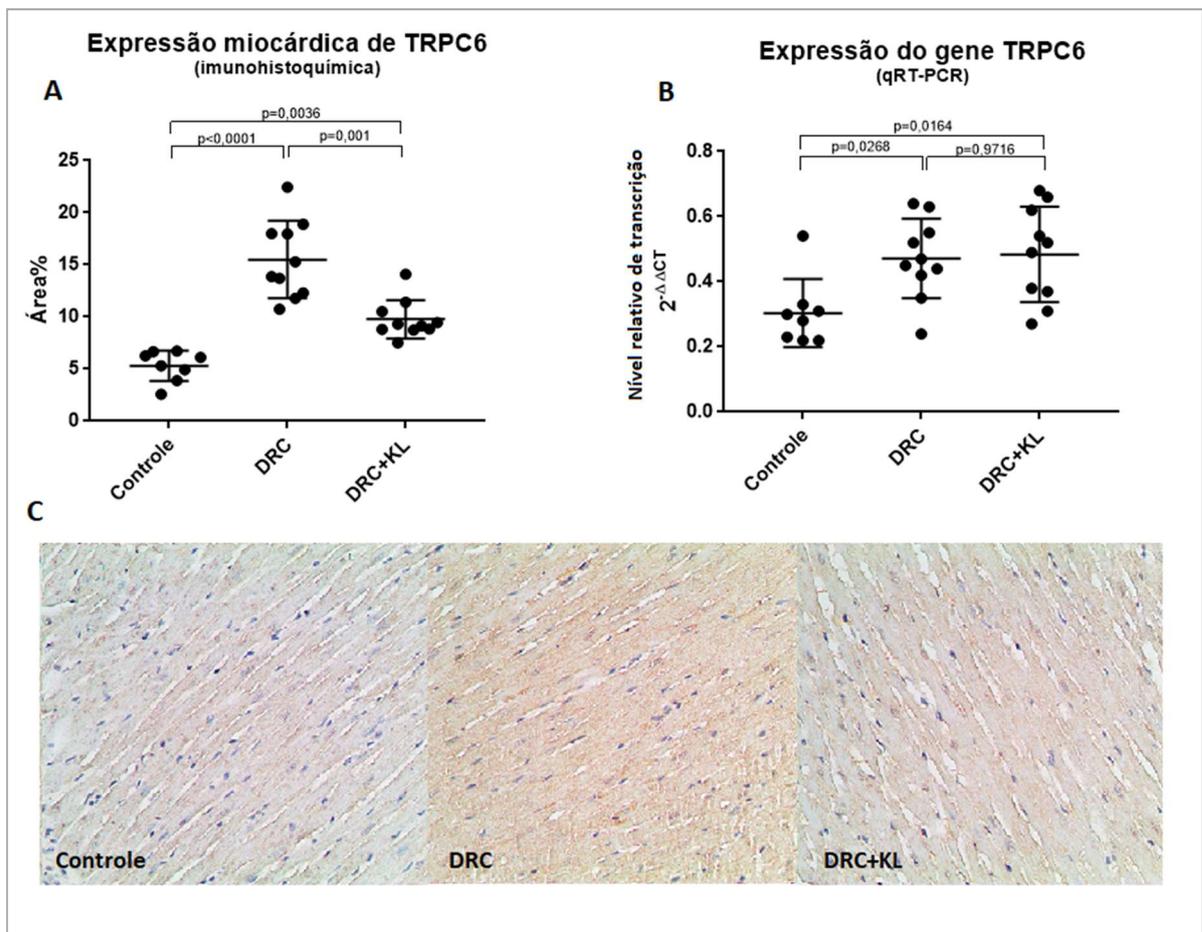
**Figura 34:** Avaliação da expressão miocárdica de  $\alpha$ SMA. A – Área ocupada por  $\alpha$ SMA avaliada por IHC. B - Expressão relativa de mRNA por qRT-PCR. C – Fotos ilustrativas de tecido miocárdico com IHC com anti- $\alpha$ SMA+DAB (padrão citoplasmático), 200x.



Quando foi avaliada a expressão a nível de mRNA por qRT-PCR para o canal catiônico TRPC6, observou-se elevação significativa da expressão em ambos os grupos nefrectomizados em comparação ao grupo controle (Controle:  $0,30 \pm 0,10$  vs DRC:  $0,47 \pm 0,12$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,02$  e DRC:  $0,47 \pm 0,12$  vs DRC+KL:  $0,48 \pm 0,14$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,01$ ). Por outro lado, na avaliação da expressão na membrana dos cardiomiócitos dos canais catiônicos TRPC6 por IHC, o padrão observado a nível de mRNA não se repetiu. Nesta técnica, observou-se aumento significativo na expressão de TRPC6 na

membrana dos cardiomiócitos do grupo DRC e atenuação da expressão no grupo tratado com rKlotho (Controle:  $5,30 \pm 1,46$  vs DRC:  $15,5 \pm 3,72$  %área;  $p < 0,0001$  e DRC:  $15,5 \pm 3,72$  vs DRC+KL:  $9,77 \pm 1,84$  %área;  $p = 0,001$ ). (Figura 35).

**Figura 35:** Avaliação da expressão miocárdica de TRPC6. A – Avaliação por IHC da expressão na membrana dos cardiomiócitos de canais catiônicos TRPC6. B – Expressão relativa de mRNA para TRPC6. C – Fotos ilustrativas de tecido miocárdico com IHC com anti-TRPC6 extracelular+DAB (padrão granular membrana), 200x.

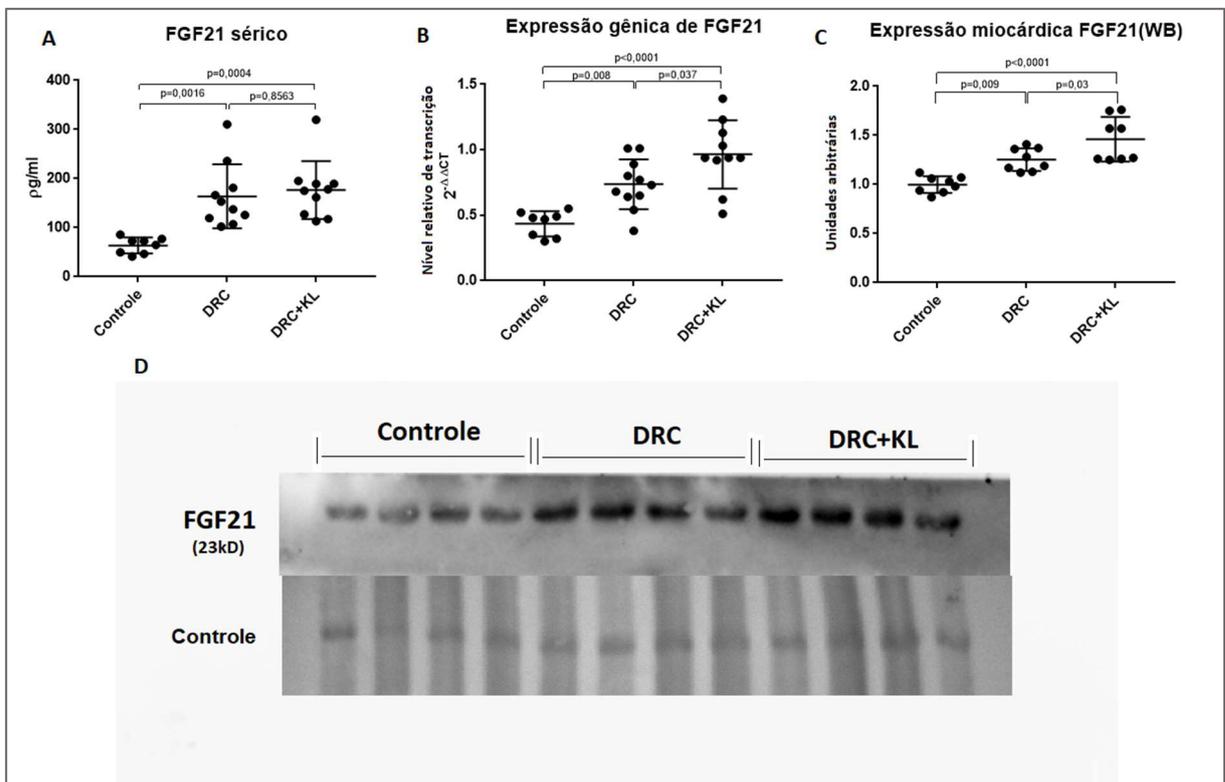


## 7.6. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E EXPRESSÃO MIOCÁRDICA DE FGF21.

Foram avaliados os níveis séricos de FGF21 nos 3 grupos, sendo observada elevação significativa nos grupos nefrectomizados em comparação ao grupo controle (Controle:  $85,6 \pm 31,0$  vs DRC:  $142,9 \pm 98,4$  pg/ml;  $p = 0,001$  e Controle:  $85,6 \pm 31,0$  vs DRC+KL:  $155 \pm 114,0$  pg/ml;  $p = 0,0004$ ) (Figura 36).

Quando avaliada a expressão miocárdica de FGF21, tanto a nível de mRNA (Controle:  $0,43 \pm 0,09$  vs DRC:  $0,73 \pm 0,19$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,008$ ) como a nível proteica (Controle:  $0,99 \pm 0,08$  vs DRC:  $1,25 \pm 0,11$  UA;  $p=0,009$ ), foi observada elevação significativa da expressão nos grupos com DRC. Entretanto, esta elevação foi significativamente ainda maior no grupo tratado com reposição de rKlotho: por qRT-PCR (DRC:  $0,73 \pm 0,19$  vs DRC+KL:  $0,96 \pm 0,26$   $2^{-\Delta\Delta CT}$ ;  $p=0,03$ ) e westernblot (DRC:  $1,25 \pm 0,11$  vs DRC+KL:  $1,46 \pm 0,22$  UA;  $p=0,03$ ) (Figura 36).

**Figura 36:** Avaliação dos níveis séricos e expressão miocárdica de FGF21. A- Níveis séricos; B – Expressão a nível proteico por WB; C – Expressão a nível de mRNA por qRT-PCR; D – Foto ilustrativa da quantificação por WB.



## 8. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a reposição de rKlotho, administrado por via subcutânea e com um racional terapêutico, apresentou efeito cardioprotetor, pois foi capaz de atenuar a hipertrofia e a fibrose miocárdica induzida pelo modelo de nefrectomia 5/6 em ratos. Os mecanismos pelos quais este “hormônio”

exerce seus efeitos protetores no miocárdio ainda não estão bem elucidados, mas neste estudo foi observado que a reposição de rKlotho reduziu a expressão de marcadores teciduais de hipertrofia e fibrose, a expressão de TRPC6 na membrana dos cardiomiócitos e, pela primeira vez, demonstrou-se haver uma possível relação entre a reposição de rKlotho e a expressão miocárdica de FGF21, tornando possível especular que o FGF21, como uma cardiomiocina protetora, possa ser responsável por parte dos efeitos cardioprotetores atribuídos ao  $\alpha$ Klotho.

A nefrectomia 5/6, como forma de induzir disfunção renal em animais, é um modelo experimental clássico (Anderson *et al.*, 1985) e a modificação para a estratégia de ablação por cauterização provê maior controle do grau da DRC induzido e maior reprodutibilidade, resultando em menor variabilidade entre os animais (Ormrod e Miller, 1980; Baracho *et al.*, 2016). Neste estudo, a nefrectomia 5/6 resultou em redução média de 50% da filtração glomerular, demonstrada pela elevação da creatinina sérica e redução da sua depuração renal. O grau de disfunção renal resultante, equivalente em humanos a categoria 3 de DRC, não configura estado de uremia severa, porém foi compatível com o relatado por outros autores (Fujihara *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011; Custodio *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2014). A não proporcionalidade entre a redução da massa renal e perda de função renal ocorre devido à hiperfiltração e progressiva hipertrofia compensatória da massa renal remanescente (Santos *et al.*, 2006; Fujihara *et al.*, 2007). Desta forma, só esperaríamos observar uremia mais severa com um tempo maior de experimento.

Apesar de usualmente não induzir uma insuficiência renal severa, este modelo tem como característica o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca de forma consistente, sendo o mais utilizado para este fim quando se deseja a associação com DRC (Kennedy *et al.*, 2008). No entanto, sabe-se que a cardiopatia induzida por este modelo não é puramente “urêmica”, sendo resultado da combinação dos efeitos da uremia e do componente hipertensivo inerente ao modelo (Kennedy *et al.*, 2008). Em consonância com esse entendimento, observamos níveis pressóricos bastante elevados nos animais nefrectomizados em medida direta através de punção carotídea no dia da eutanásia. Entretanto, níveis pressóricos elevados também foram encontrados nos animais do grupo controle, porém significativamente inferiores aos níveis observados no grupo de animais com DRC. São possíveis explicações para este achado, considerando-se que seguimos a padronização da técnica de aferição (Parasuraman e Raveendran, 2012), recaem principalmente sobre dois fatores: o uso

de cetamina como anestésico e a própria manipulação e cateterização da artéria carótida. A cetamina possui ação simpatomimética, aumentando a frequência cardíaca, o que resulta no aumento do débito cardíaco, ao mesmo tempo que exerce vasoconstrição periférica, elevando, consideravelmente, a pressão arterial (Idvall, 1981). Por sua vez, a cateterização da artéria carótida e sua ligadura abaixo do seio carotídeo gera hipoperfusão a jusante e desencadeia o mecanismo de barorreflexo, induzindo a um aumento da atividade simpática central, vasoconstrição periférica e elevação da pressão arterial. Devido a este mecanismo, está indicado aguardar até o retorno das condições hemodinâmicas basais antes de ser feito o registro pressórico (Parasuraman e Raveendran, 2012). Desta forma, concluímos que o tempo de espera de 5 minutos para a medição da pressão arterial não foi o suficiente para retorno da pressão a níveis basais. Entretanto, aumentar este tempo, implicaria em um aumento do risco de óbito para os animais. A medição da pressão arterial por técnica não invasiva como a plestimografia de cauda ou técnicas invasivas mais sofisticadas por telemetria, que seriam preferíveis, infelizmente não estavam disponíveis. Todavia, consideramos que é possível a comparação entre os grupos e que a diferença encontrada é verdadeira, pois utilizamos a mesma técnica em todos os animais.

Outro modelo experimental de DRC já bem estabelecido é o induzido por adição de adenina à ração. Neste modelo, ocorre a deposição renal de cristais de adenina, resultando em um processo inflamatório túbulo-intersticial intenso, que leva a acentuada perda de função renal e uremia severa, com a vantagem de não induzir hipertensão arterial importante (Yokozawa *et al.*, 1982). Este modelo havia sido escolhido em um primeiro momento não só pela praticidade, mas também por talvez representar um melhor modelo para se avaliar a miocardiopatia urêmica. Para isso, este modelo foi avaliado em estudo piloto em comparação ao modelo de nefrectomia 5/6. No entanto, apesar de ter-se observado maior perda de função renal com o modelo com adenina, observou-se nenhuma hipertrofia cardíaca no período de 8 semanas (Piloto-1 em anexo), implicando na necessidade de um período maior de observação para desenvolvimento de HVE. Em estudo prévio, onde foi comparado o DMO-DRC em ambos os modelos experimentais de DRC, Ferrari *et al.* observaram relação peso do VE/peso animal semelhante entre os dois grupos, porém provavelmente como consequência de menor peso dos animais do grupo adenina no final do estudo, não sendo descritos parâmetros histomorfométricos ou marcadores de remodelação cardíaca (Ferrari *et al.*, 2014). A necessidade de uma duração maior

do estudo com o modelo com adenina, implicaria também num período maior de reposição do rKlotho e maior custo. No entanto, a decisão pelo modelo de nefrectomia 5/6 deveu-se principalmente pela observação de níveis séricos e urinários elevados de Klotho nos animais que receberam adenina e que, apesar de inconsistentes, inviabilizaram o estudo (Piloto-2 em anexo).

Com relação aos parâmetros associados ao DMO-DRC, uma vez que o grau de perda de função renal alcançado não foi severo e não foi usada ração rica em fósforo, não foi observada a ocorrência de hiperfosfatemia. A manutenção dos níveis séricos de fósforo dentro da normalidade até estágios avançados da DRC já está bem estabelecida tanto em humanos (Slatopolsky *et al.*, 1968; Slatopolsky, 2011), como em modelos experimentais de DRC (De Castro *et al.*, 2018; Do Carmo *et al.*, 2018) e ocorre devido à elevação compensatória dos níveis de FGF23 e PTHi, com consequente elevação da fração de excreção de fósforo. Em concordância com esse entendimento, observamos elevação significativa dos níveis séricos de FGF23 nos animais nefrectomizados em comparação ao grupo controle (cerca de duas vezes os níveis basais). Ao compararmos com dados da literatura, os níveis encontrados estão abaixo dos níveis usualmente relatados em outros estudos, sobretudo nos protocolos com ração rica em fósforo (El-Abbadi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2018). Entretanto, deve-se levar em conta a dificuldade de comparação entre diferentes modelos experimentais de DRC, diferentes espécies animais e diferentes kits ELISA disponíveis comercialmente (Yu *et al.*, 2013).

Aumentar o conteúdo de fósforo da ração levando à sobrecarga de fósforo e hiperfosfatemia, é uma estratégia frequentemente usada para intensificar o DMO-DRC e induzir mais calcificações vasculares (El-Abbadi *et al.*, 2009; Paloian *et al.*, 2016). Entretanto, recentemente passou a ser usada também para proporcionar maior progressão da DRC e intensificar o remodelamento cardíaco, resultando em mais hipertrofia e fibrose (Shi *et al.*, 2018). A presença de hiperfosfatemia e níveis mais elevados de FGF23 tornaria o modelo experimental mais semelhante, do ponto de vista do perfil mineral-ósseo, ao que se observa nos pacientes dialíticos. Atualmente, passou a ser imputado tanto à hiperfosfatemia como aos níveis muito elevados de FGF23 papel central na fisiopatologia da miocardiopatia urêmica (Faul *et al.*, 2011; Ritter e Slatopolsky, 2016) e foi reconhecida a capacidade da sKlotho de modular essa via fisiopatológica através de mecanismos não totalmente compreendidos (Richter e Faul, 2018). Deste modo, acreditamos que esse perfil mineral-ósseo mais próximo do

encontrado na diálise teria sido mais apropriado, por talvez proporcionar à estratégia de repor rKlotho um impacto positivo ainda maior.

Com relação aos níveis séricos de PTHi, foi observado elevação significativa em ambos os grupos de animais com DRC, à semelhança do relatado por outros estudos (Ferrari *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Sabidamente o FGF23 bloqueia a 1 $\alpha$ -hidroxilase renal, diminuindo a síntese renal de 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$  enquanto intensifica a sua inativação por aumentar a atividade da 24-hidroxilase (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013). Por sua vez, a 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$  tem efeito inibitório sobre as paratireoides, reduzindo a síntese de PTH. Desta forma, a redução dos níveis de 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$  nos animais nefrectomizados, favoreceria a elevação dos níveis séricos de PTHi (Silver *et al.*, 2002). Também utilizando modelo experimental de DRC por nefrectomia 5/6, Ferrari *et al.* reportaram redução importante dos níveis séricos de 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ , e elevação dos níveis de FGF23 e PTHi, o que corrobora nossos achados. O fato de não termos observado diferença quanto aos níveis séricos de PTHi entre os grupos com DRC, sugere haver pouco impacto da suplementação de rKlotho sobre às paratireoides, talvez pelo fato do  $\alpha$ Klotho já ser expresso localmente (Kuro-O, 2010).

De forma contrária ao FGF23 e PTHi, observou-se importante redução dos níveis circulantes de sKlotho nos animais nefrectomizados, o que era previsto uma vez que estes dependem diretamente da massa renal (Hu *et al.*, 2016). Fato que chama a atenção é a observação de que, apesar da reposição de rKlotho, não foi encontrado valores mais elevados no grupo tratado quando comparado com o grupo DRC sem tratamento. Todavia, Hu *et al.* demonstraram em ratos com função renal preservada que, após dose única por via IP de rKlotho marcado com iodo radioativo ( $^{125}$ I), a quantidade de  $\alpha$ Klotho circulante detectável cai rapidamente em um período de oito horas, não sendo mais este detectável após 24 horas (Hu *et al.*, 2016). Desta forma, como a coleta do sangue foi realizada 24h após a última aplicação subcutânea de rKlotho, não foi completamente inesperado o fato de não ter sido detectada uma elevação dos níveis séricos de sKlotho nos animais tratados, mesmo sabendo-se que a aplicação subcutânea tem uma curva de absorção mais lenta e os animais uma apresentavam função renal reduzida. Ao tentar comparar os nossos resultados com a literatura, observamos uma escassez de dados sobre níveis séricos de sKlotho em ratos, seja com função renal normal ou com DRC, uma vez que a maioria dos estudos foram feitos em camundongos. Além disso, o uso de diferentes técnicas de dosagem, dificulta ainda mais as comparações. Contudo, foi observado que ratos apresentam

níveis séricos de sKlotho mais elevados que camundongos e humanos (Hu, Kuro-O, *et al.*, 2013).

Para a finalidade do nosso estudo que foi avaliar um possível efeito terapêutico da  $\alpha$ Klotho, a sua reposição foi feita com a forma recombinante contendo ambas as subunidades KL1 e KL2, ou seja, a porção extracelular completa ou “full length”, produzida em células CHO e com atividade biológica testada (Doi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). De fato, a despeito da ausência de elevação dos níveis séricos de sKlotho após 24 horas, observou-se uma elevação de 5% do valor médio da FeP no grupo tratado em relação ao grupo DRC sem tratamento que, apesar de não ter atingido significância estatística, pode representar um efeito biológico mensurável do rKlotho repostado e ter importância em situações clínicas. Este achado corrobora a descrição recente da possibilidade da sKlotho exercer o papel de um verdadeiro co-receptor solúvel para os receptores de FGFs (Chen *et al.*, 2018), assim como a capacidade da reposição de rKlotho em atenuar a retenção de fósforo em camundongos Klotho<sup>-/-</sup>, aumentando a sua excreção urinária (Chen *et al.*, 2013).

A ecocardiografia é uma técnica não invasiva que permite avaliar não só parâmetros anatômicos relacionados à HVE, mas também parâmetros funcionais. Na avaliação anatômica ficou bem caracterizado a presença de HVE nos animais do grupo DRC sem tratamento através das medidas de espessura de septo interventricular e parede posterior do VE, assim como da massa estimada do VE, que se apresentaram significativamente maiores que o grupo controle. Da mesma forma, ficou bem caracterizado a melhora desses parâmetros no grupo de animais com DRC que receberam tratamento quando comparado com o grupo DRC sem tratamento.

Por outro lado, na avaliação funcional a ecocardiografia se mostrou menos sensível em nosso estudo. Desta forma, na avaliação da função sistólica através do encurtamento fracional do VE ( $\Delta D$ ) e da fração de ejeção estimada do VE, não foram observadas diferenças entre os animais nefrectomizados em relação ao grupo controle. Em estudo prévio, Xie *et al.* também não observaram diferença na fração de ejeção do VE entre os animais “selvagens” sham e nefrectomizados 5/6 (Xie *et al.*, 2015). Este achado pode ser justificado pelo fato de que as alterações da função sistólica são mais tardias na evolução da remodelação cardíaca, podendo mesmo haver um aumento da fração de ejeção em fases iniciais da hipertrofia (Pawlusch *et al.*, 1993). Além disso, juntamente com sua já reconhecida capacidade de induzir hipertrofia e fibrose miocárdica, recentemente foi descrita a existência de efeito

inotrópico positivo do FGF23 sobre o miocárdio, o que também poderia contribuir para a preservação função sistólica (Touchberry *et al.*, 2013; Leifheit-Nestler e Haffner, 2018). Por outro lado, pelos parâmetros por nós avaliados, há indícios de que a função diastólica foi pior nos grupos com DRC, indicando que possa ser mais precocemente afetada pela remodelação cardíaca (Kokubo *et al.*, 2005). Deste modo, o achado de aumento de átrio esquerdo nos animais nefrectomizados sugere a existência de uma maior pressão de enchimento do VE, enquanto que a redução da relação E'/A' e aumento da relação E/E' podem indicar menor complacência ventricular esquerda.

Em camundongos knockout para  $\alpha$ Klotho com DRC avaliados através de ressonância nuclear magnética cardíaca, além HVE também foi observada uma pior função sistólica, não tendo sido avaliada a função diastólica. Enquanto que animais transgênicos com expressão aumentada de  $\alpha$ Klotho e DRC mantinham preservados os parâmetros anatômicos e funcionais (Hu *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015). Entretanto, não se pode comparar esses resultados com os nossos pelo fato de se tratar de animais geneticamente modificados, de espécie diferente e avaliados por diferente método.

Além dos parâmetros ecocardiográficos relacionados à HVE, observamos que os animais do grupo DRC sem tratamento apresentaram aumento significativo da relação coração/tíbia, da espessura do septo interventricular, do diâmetro dos cardiomiócitos e da área de fibrose pela histomorfometria, assim como aumento da expressão de marcadores de remodelação a nível de mRNA e proteico. Avaliados em conjunto, estes parâmetros caracterizam com segurança a presença de remodelação miocárdica no modelo experimental (Koike *et al.*, 2007; Custodio *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2015). Entretanto, em comparação com estudos que utilizaram dieta rica em fósforo, chamou a atenção a menor intensidade da fibrose miocárdica dos animais nefrectomizados sem tratamento, assim como não ter sido encontrado calcificação vascular na aorta torácica destes animais (dados não incluídos), o que reforça a importância fisiopatológica da sobrecarga de fósforo no desenvolvimento destas alterações (Hu *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2018).

Analisados como um todo, nossos resultados demonstraram com bastante segurança que o tratamento com rKlotho atenuou a remodelação miocárdica, ao observarmos diminuição de todos os parâmetros de remodelação no grupo DRC tratado quando comparado ao grupo DRC sem tratamento. O efeito cardioprotetor do  $\alpha$ Klotho já foi bem demonstrado *in vitro* e em modelos experimentais de DRC com

animais *knockout* ou transgênicos para  $\alpha$ Klotho, ou seja, que primariamente não apresentam ou que apresentam níveis aumentados de sKlotho, respectivamente (Hu *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015) ou em protocolo preventivo (Yang *et al.*, 2015). Em nosso trabalho, buscamos uma abordagem terapêutica, ou seja, induzimos a DRC em animais sem modificação genética e, após período de progressão da doença de 4 semanas, iniciamos a reposição de rKlotho, assemelhando-se ao que acontece na vida real com os pacientes com DRC. Esse período de 4 semanas equivaleria a 2-3 anos de doença em humanos (Quinn, 2005). Além da abordagem terapêutica, modificamos a via de reposição de rKlotho da via IP dos demais estudos, para a via subcutânea, uma vez que na prática clínica esta é a via mais usada para reposição de hormônios proteicos, além de poder prolongar o tempo de absorção e aumentar a biodisponibilidade do rKlotho (McDonald *et al.*, 2010; Richter e Jacobsen, 2014).

São muitas as potenciais ações pleiotrópicas da sKlotho que podem participar da cardioproteção observada. Dentre elas, podemos citar o bloqueio das vias do TGF- $\beta$ , Wnt e All, a modulação da sinalização do FGF23 no miocárdio e a redução da expressão de TRPC6 na membrana dos cardiomiócitos (Doi *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016; Richter e Faul, 2018). Neste estudo avaliamos este último mecanismo, que na época de início do nosso estudo, havia sido investigado apenas em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (Xie *et al.*, 2012). Mais recentemente, o mesmo grupo também relatou aumento da expressão de TRPC6 no miocárdio de animais com DRC, sendo esta agravada em animais *knockout* pela deficiência de  $\alpha$ Klotho (Xie *et al.*, 2015). Os canais catiônicos TRPC6 funcionam como sensores do estresse mecânico da parede dos cardiomiócitos, aumentando o influxo de cálcio para o intracelular e ativando vias relacionadas à hipertrofia, principalmente a via da Calcineurina/NFAT (Bush *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Eder e Molkentin, 2011). Desta forma a expressão de TRPC6 está aumentada em vários modelos experimentais de hipertrofia cardíaca e a sua redução oferece proteção.

Avaliamos o papel desta via através de IHC com utilização de anticorpo específico para o TRPC6 localizado na membrana e observamos um aumento importante de sua expressão miocárdica no grupo DRC em comparação ao grupo controle. Observou-se também redução significativa da sua expressão no grupo com DRC+KL quando comparado com o grupo DRC sem tratamento. Por outro lado, foi observada um aumento da expressão gênica nos grupos com DRC em relação ao grupo controle, sem contudo haver diferença entre os grupos sem e com tratamento,

evidenciando uma expressão semelhante a nível de mRNA, estando esses achados em consonância com dados da literatura (Xie *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015). Esta modulação na localização dos canais catiônicos TRPC6, teve recentemente seu mecanismo esclarecido e ocorre em decorrência da capacidade da  $\alpha$ Klotho em se ligar a monosialogangliosídeos de regiões superespecializadas da membrana celular chamadas “*lipid rafts*”. A ligação de Klotho a estes gangliosídeos modula a organização lipídica, o que resulta na inibição da sinalização da via da PI3K e consequente bloqueio na externalização do TRPC6, independente da expressão gênica (Dalton *et al.*, 2017).

Outro diferencial do presente estudo, é o fato de ter avaliado, mesmo que de forma apenas exploratória, o efeito da reposição de rKlotho sobre os níveis circulantes e expressão miocárdica de FGF21. O FGF21, além dos seus efeitos hormonais no metabolismo da glicose e lipídeos, podendo responder por parte dos efeitos benéficos de medicações como hipoglicemiantes e fibratos (Kharitonov *et al.*, 2005; Kim, 2015; Zhang *et al.*, 2016), sabidamente também possui ações citoprotetoras, participando da resposta celular ao estresse e recentemente foi reconhecido como uma cardiomiocina protetora (Planavila *et al.*, 2013; Kim e Lee, 2014; Luo *et al.*, 2017; Salminen *et al.*, 2017). Camundongos *knockout* para FGF21 quando submetidos a estresse cardíaco por diferentes mecanismos, apresentam pior remodelação cardíaca em comparação aos animais normais, enquanto que animais sob reposição de FGF21 têm a remodelação atenuada (Planavila *et al.*, 2013; Joki *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Deste modo, o miocárdio em situações de estresse celular, passa a secretar FGF21 que age de forma autócrina/parácrina aumentando a capacidade metabólica da célula, ao mesmo tempo que reduz o estresse oxidativo, vias inflamatórias e apoptose (Planavila, Redondo-Angulo, Ribas, *et al.*, 2015). Também foram relatadas para o FGF21 ações citoprotetoras *in vitro* semelhantes às induzidas pela reposição de  $\alpha$ Klotho (Kim e Lee, 2014; Ravikumar *et al.*, 2014; Rizzo *et al.*, 2014; Buendia *et al.*, 2016; Mytych *et al.*, 2018), sendo plausível especular que parte dos efeitos citoprotetores atribuídos ao  $\alpha$ Klotho possam ser intermediados por um aumento na expressão miocárdica de FGF21.

Corroborando com esta hipótese, observamos que, apesar de ter sido evidenciado aumento da expressão de FGF21 no miocárdio dos animais de ambos os grupos com DRC em comparação ao grupo controle, esse aumento foi significativamente maior no grupo que recebeu reposição de rKlotho. Esse aumento

na expressão de FGF21 foi observado tanto a nível de mRNA como a nível proteico. O aumento da expressão miocárdica de FGF21 nos animais com DRC era esperado devido ao maior estresse cardíaco induzido pela uremia e/ou hipertensão, porém o fato da sua expressão ter sido significativamente maior no grupo tratado com rKlotho avança a existência de uma conexão entre ambos. Quanto aos níveis séricos de FGF21, ambos os grupos com DRC também apresentaram aumento em relação ao grupo controle, porém de forma homogênea, sugerindo que essa elevação ocorreu em decorrência da perda de função renal. O fato do aumento da expressão miocárdica de FGF21 após tratamento com rKlotho não ter sido acompanhada de maior elevação dos níveis séricos, sugere ter havido aumento apenas da produção local e não sistêmica. Os níveis sistêmicos de FGF21 são decorrentes principalmente de sua produção a nível hepático, sendo a filtração e excreção renal a principal via de depuração (Kharitonov *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2009). Desta forma, níveis sistêmicos elevados são esperados com a perda de função renal, ratificando o observado neste estudo (Lin *et al.*, 2011).

O entendimento atual de que a sKlotho pode modular a ação do FGF23 em diversos tecidos, entre eles o miocárdio, abre margem para especular-se que, por um lado através do bloqueio da ligação do FGF23 ao FGFR4 e por outro atuando como um co-receptor solúvel para o FGFR1c, a sKlotho possa direcionar o FGF23 para a ativação de vias cardioprotetoras ao invés de vias deletérias (Richter e Faul, 2018). Nesta hipótese, faz sentido explorar a possibilidade de que uma das vias protetoras ativadas seria o aumento da expressão miocárdica de FGF21.

A sinalização dos receptores de FGFs pode ser transduzida por dois adaptadores citoplasmáticos: Fosfolipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) e Substrato do receptor de FGF 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ ) (Ornitz e Itoh, 2015). O efeito deletério do FGF23 sobre o miocárdio ocorre através da ativação independente de  $\alpha$ Klotho dos FGFR4 e desencadeamento da sinalização intracelular pela via PLC $\gamma$ /Calcineurina/NFAT, levando a hipertrofia miocárdica patológica, com inflamação e fibrose (Faul *et al.*, 2011; Grabner *et al.*, 2015). No entanto, na presença de  $\alpha$ Klotho, o FGF23 pode ligar-se às variantes C dos FGFR1-3, resultando na ativação das vias de sinalização FRS2 $\alpha$ /MAPK/ERK1/2 e FRS2 $\alpha$ /PI3K/Akt (Hu, Shiizaki, *et al.*, 2013). Desta forma, a sKlotho, ao se ligar ao FGF23 circulante ou ao se ligar aos receptores de FGFs na membrana dos cardiomiócitos, pode mudar a via de sinalização intracelular do FGF23 no miocárdio e, provavelmente, os efeitos sobre o mesmo (Richter e Faul, 2018).

Ao contrário da via da calcineurina/NFAT, as vias de sinalização através da ERK1/2 e Akt estão associadas a hipertrofia cardíaca dita fisiológica como a que ocorre secundário a atividade física ou gravidez (Ellison *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Shimizu e Minamino, 2016). A ativação destas vias leva a hipertrofia cardíaca sem os eventos deletérios do aumento do estresse oxidativo, inflamação, fibrose e apoptose (Shimizu e Minamino, 2016). Já foi demonstrado que tanto na atividade física como na gravidez há aumento da expressão miocárdica de FGF21, sendo este atualmente considerado o “maestro” que conecta o metabolismo sistêmico, ao aumentar a disponibilidade de glicose e ácidos graxos livres, com o metabolismo celular aumentando a capacidade metabólica da célula por induzir biogênese mitocondrial, ao mesmo tempo que aumenta a capacidade antioxidante e de autofagia que são mecanismos citoprotetores (Kim e Lee, 2014; Guo *et al.*, 2016; Redondo-Angulo *et al.*, 2017; Salminen *et al.*, 2017). O mecanismo pelo qual a ativação de ERK1/2 e Akt resultam em aumento da expressão de FGF21 se dar através da fosforilação o fator de transcrição CREB (elemento de ligação responsivo ao cAMP) que após a fosforilação se liga ao PPAR $\alpha$ , formando um complexo binário capaz de se ligar a elementos responsivos no *promoter* do gene do FGF21 induzindo a sua expressão. O FGF21 expresso no miocárdio é então secretado no extracelular e passa a agir em um ciclo de amplificação autócrino/parácrino através da sua ligação ao complexo FGFR1c/ $\beta$ Klotho na membrana dos cardiomiócitos e ativação de várias vias relacionadas ao metabolismo celular e citoproteção atenuando a remodelação cardíaca (Planavila *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014; Planavila, Redondo-Angulo, Ribas, *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

No presente estudo, algumas limitações devem ser consideradas. Primeiro, caso tivéssemos utilizado dieta rica em fósforo associada a redução da massa renal, o distúrbio mineral e ósseo mais acentuado poderia ter proporcionado um modelo mais adequado de miocardiopatia urêmica. Outra alternativa seria aumentar o tempo de observação, o que proporcionaria progressão da DRC para estágio mais avançado e miocardiopatia mais severa, podendo-se associar terapia anti-hipertensiva em um dos grupos e assim separar o efeito da hipertensão e da uremia. Para isso, seria necessário poder medir a pressão arterial por técnica mais apropriada, que no nosso caso também representou uma limitação. A investigação dos mecanismos implicados na relação  $\alpha$ Klotho/FGF21 foi restrita devido às limitações de estrutura de pesquisa. Porém os resultados fundamentam a exploração desta interação no futuro.

## 9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

1. O modelo experimental de DRC utilizado induziu perda moderada de função renal, redução significativa dos níveis séricos de sKlotho e hipertrofia cardíaca.
2. A reposição de rKlotho, na dose e via utilizados e com racional terapêutico, apresentou efeito cardioprotetor, atenuando a remodelação miocárdica.
3. A reposição de rKlotho nos animais nefrectomizados se correlacionou com a redução da externalização na membrana dos cardiomiócitos dos canais catiônicos TRPC6 e com maior expressão miocárdica de FGF21.

Os resultados sugerem a existência de ação do  $\alpha$ Klotho sobre a expressão miocárdica de FGF21, assim como da possibilidade de o FGF21 intermediar parte dos efeitos cardioprotetores atribuídos a  $\alpha$ Klotho. Para confirmar esta interação entre  $\alpha$ Klotho e FGF21, assim como aprofundar o entendimento dos mecanismos pelos quais essa interação ocorreria, serão necessários estudos *in vitro* com cardiomiócitos, enquanto que, para avaliar o efeito clínico da deficiência e reposição de FGF21 em modelos experimentais de DRC e miocardiopatia urêmica, serão necessários estudos *in vivo* com animais geneticamente modificados. Assim como a  $\alpha$ Klotho, o FGF21 também pode apresentar-se com potencial terapêutico para a miocardiopatia urêmica no futuro.

## 10. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, E. et al. Assessment of the relationship between serum soluble Klotho and carotid intima-media thickness and left ventricular dysfunction in hemodialysis patients. **Kidney Res Clin Pract**, v. 35, n. 1, p. 42-9, Mar 2016. ISSN 2211-9132.

ABHILASH, S. P.; NAMBOODIRI, N. Sudden cardiac death – Historical perspectives. **Indian Heart Journal**, v. 66, p. S4-S9, 2014.

ADAMS, A. C. et al. FGF21 requires betaklotho to act *in vivo*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49977, 2012. ISSN 1932-6203.

ALHAJ, E. et al. Uremic cardiomyopathy: an underdiagnosed disease. **Congest Heart Fail**, v. 19, n. 4, p. E40-5, Jul-Aug 2013. ISSN 1527-5299.

ALPERT, M. A. Sudden cardiac arrest and sudden cardiac death on dialysis: Epidemiology, evaluation, treatment, and prevention. **Hemodial Int**, v. 15 Suppl 1, p. S22-9, Oct 2011. ISSN 1492-7535.

AMANN, K. et al. Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia. **Kidney Int**, v. 63, n. 4, p. 1296-301, Apr 2003. ISSN 0085-2538.

ANDERSON, S.; MEYER, T. W.; BRENNER, B. M. The role of hemodynamic factors in the initiation and progression of renal disease. **J Urol**, v. 133, n. 3, p. 363-8, Mar 1985. ISSN 0022-5347.

ANDERSSON, P.; RYDBERG, E.; WILLENHEIMER, R. Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review. **Eur Heart J**, v. 25, n. 20, p. 1776-87, Oct 2004. ISSN 0195-668x.

ANGELIN, B.; LARSSON, T. E.; RUDLING, M. Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators--a critical appraisal. **Cell Metab**, v. 16, n. 6, p. 693-705, Dec 5 2012. ISSN 1550-4131.

BARACHO, N. C. et al. Characterization of an experimental model of progressive renal disease in rats. **Acta Cir Bras**, v. 31, n. 11, p. 744-752, Nov 2016. ISSN 0102-8650.

BARKER, S. L. et al. The demonstration of alphaKlotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. **Nephrol Dial Transplant**, v. 30, n. 2, p. 223-33, Feb 2015. ISSN 0931-0509.

BRILLA, C. G. et al. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. **Circulation Research**, v. 67, n. 6, p. 1355-1364, 1990.

BUENDIA, P. et al. Klotho Prevents Translocation of NFkappaB. **Vitam Horm**, v. 101, p. 119-50, 2016. ISSN 0083-6729 (Print) 0083-6729.

BUSH, E. W. et al. Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. **J Biol Chem**, v. 281, n. 44, p. 33487-96, Nov 3 2006. ISSN 0021-9258.

CANZIANI, M. E. et al. Fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease: bridging the gap between bone mineral metabolism and left ventricular hypertrophy. **Blood Purif**, v. 31, n. 1-3, p. 26-32, 2011. ISSN 0253-5068.

CHA, S. K. et al. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. **Mol Pharmacol**, v. 76, n. 1, p. 38-46, Jul 2009. ISSN 0026-895x.

CHEN, G. et al. alpha-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 461-466, Jan 25 2018. ISSN 0028-0836.

CHEN, T. H. et al. The secreted Klotho protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in Klotho mutant mice. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 67-73, Jan 5 2013. ISSN 0014-2999.

CHEN, Y.; YU, Q.; XU, C. B. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. **Int J Clin Exp Med**, v. 10, n. 10, p. 7, 2017. ISSN 1940-5901/IJCEM0059973.

CHUE, C. D. et al. Serum phosphate is associated with left ventricular mass in patients with chronic kidney disease: a cardiac magnetic resonance study. **Heart**, v. 98, n. 3, p. 219-24, Feb 2012. ISSN 1355-6037.

CONSORTIUM, A. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. **Nat Genet**, v. 26, n. 3, p. 345-8, Nov 2000. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036.

CUSTODIO, M. R. et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 4, p. 1437-45, Apr 2012. ISSN 0931-0509.

DALTON, G. et al. Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 4, p. 752-757, Jan 24 2017. ISSN 0027-8424.

DE CASTRO, B. B. A. et al. Effect of cross-linked chitosan iron (III) on vascular calcification in uremic rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 243, n. 9, p. 796-802, May 2018. ISSN 1535-3699.

DHINGRA, R. et al. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. **Arch Intern Med**, v. 167, n. 9, p. 879-85, May 14 2007. ISSN 0003-9926.

DI MARCO, G. S. et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 6, p. F1381-7, Jun 2008. ISSN 1522-1466.

DO CARMO, W. B. et al. Chitosan-Fe (III) Complex as a Phosphate Chelator in Uraemic Rats: A Novel Treatment Option. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 122, n. 1, p. 120-125, Jan 2018. ISSN 1742-7835.

DOI, S. et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. **J Biol Chem**, v. 286, n. 10, p. 8655-65, Mar 11 2011. ISSN 0021-9258.

DOMOUZOGLOU, E. M. et al. Fibroblast growth factors in cardiovascular disease: The emerging role of FGF21. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 6, p. H1029-38, Sep 15 2015. ISSN 0363-6135.

DOROUDGAR, S.; GLEMBOTSKI, C. C. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. **Trends Mol Med**, v. 17, n. 4, p. 207-14, Apr 2011. ISSN 1471-4914.

DRUEKE, T.; LE PAILLEUR, C. Cardiomyopathy in patients on maintenance haemodialysis. **Contrib Nephrol**, v. 52, p. 27-33, 1986. ISSN 0302-5144.

DRUEKE, T. et al. Uremic cardiomyopathy and pericarditis. **Adv Nephrol Necker Hosp**, v. 9, p. 33-70, 1980. ISSN 0084-5957.

EDER, P.; MOLKENTIN, J. D. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. **Circ Res**, v. 108, n. 2, p. 265-72, Jan 21 2011. ISSN 0009-7330.

EL-ABBADI, M. M. et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. **Kidney Int**, v. 75, n. 12, p. 1297-1307, Jun 2009. ISSN 0085-2538.

ELLISON, G. M. et al. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. **Heart**, v. 98, n. 1, p. 5-10, Jan 2012. ISSN 1355-6037.

ERBEN, R. G. Update on FGF23 and Klotho signaling. **Mol Cell Endocrinol**, v. 432, p. 56-65, Sep 5 2016. ISSN 0303-7207.

FAUL, C. et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. **J Clin Invest**, v. 121, n. 11, p. 4393-408, Nov 2011. ISSN 0021-9738.

FERRARI, G. O. et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. **BMC Nephrol**, v. 15, p. 69, May 3 2014. ISSN 1471-2369.

FOLEY, R. N. et al. Serum phosphate and left ventricular hypertrophy in young adults: the coronary artery risk development in young adults study. **Kidney Blood Press Res**, v. 32, n. 1, p. 37-44, 2009. ISSN 1420-4096.

FOLEY, R. N. et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. **Kidney Int**, v. 47, n. 1, p. 186-92, Jan 1995. ISSN 0085-2538.

FOLEY, R. N. et al. Serial change in echocardiographic parameters and cardiac failure in end-stage renal disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 5, p. 912-6, May 2000. ISSN 1046-6673.

FOLEY, R. N.; PARFREY, P. S.; SARNAK, M. J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. **Am J Kidney Dis**, v. 32, n. 5 Suppl 3, p. S112-9, Nov 1998. ISSN 0272-6386.

FUJIHARA, C. K.; MALHEIROS, D. M.; ZATZ, R. Losartan-hydrochlorothiazide association promotes lasting blood pressure normalization and completely arrests long-term renal injury in the 5/6 ablation model. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 6, p. F1810-8, Jun 2007. ISSN 1522-1466.

GEORGE L. BAILEY, C. L. H. A. J. P. M. Reversible Cardiomyopathy in Uremia. **Trans Amer Soc Artif Int Organs**, v. 13, p. 263, 1967.

GIACHELLI, C. M. et al. Vascular calcification and inorganic phosphate. **Am J Kidney Dis**, v. 38, n. 4 Suppl 1, p. S34-7, Oct 2001. ISSN 0272-6386.

GO, A. S. Cardiovascular Disease Consequences of CKD. **Semin Nephrol**, v. 36, n. 4, p. 293-304, Jul 2016. ISSN 0270-9295.

GO, A. S. et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **N Engl J Med**, v. 351, n. 13, p. 1296-305, Sep 23 2004. ISSN 0028-4793.

GONZALEZ-PARRA, E. et al. Phosphate: a stealthier killer than previously thought? **Cardiovasc Pathol**, v. 21, n. 5, p. 372-81, Sep-Oct 2012. ISSN 1054-8807.

GRABNER, A. et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. **Cell Metab**, v. 22, n. 6, p. 1020-32, Dec 1 2015. ISSN 1550-4131.

GRABNER, A.; FAUL, C. The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho in uremic cardiomyopathy. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 25, n. 4, p. 314-24, Jul 2016. ISSN 1062-4821.

GROLLIER, G. et al. So-called uremic heart diseases. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 83, n. 3, p. 401-6, Mar 1990. ISSN 0003-9683.

GROSS, P. et al. Vascular toxicity of phosphate in chronic kidney disease: beyond vascular calcification. **Circ J**, v. 78, n. 10, p. 2339-46, 2014. ISSN 1346-9843.

GUO, Y. et al. Exercise promotes cardiac-specific fibroblast growth factor 21 expression. **Int J Cardiol**, v. 203, p. 532-3, Jan 15 2016. ISSN 0167-5273.

GUTIERREZ, O. M. et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. **N Engl J Med**, v. 359, n. 6, p. 584-92, Aug 7 2008. ISSN 0028-4793.

HELPS, S. C. et al. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n. 1, p. 82-90, Jan 2012. ISSN 1533-4058.

HERZOG, C. A.; MANGRUM, J. M.; PASSMAN, R. Sudden cardiac death and dialysis patients. **Semin Dial**, v. 21, n. 4, p. 300-7, Jul-Aug 2008. ISSN 0894-0959.

HSU, H. J.; WU, M. S. Fibroblast growth factor 23: a possible cause of left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. **Am J Med Sci**, v. 337, n. 2, p. 116-22, Feb 2009. ISSN 0002-9629.

HU, M. C.; KURO-O, M.; MOE, O. W. Renal and extrarenal actions of Klotho. **Semin Nephrol**, v. 33, n. 2, p. 118-29, Mar 2013. ISSN 0270-9295.

HU, M. C. et al. Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, n. 6, p. 1290-302, Jun 2015. ISSN 1046-6673.

HU, M. C. et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating alphaKlotho. **J Am Soc Nephrol**, v. 27, n. 1, p. 79-90, Jan 2016. ISSN 1046-6673.

HU, M. C. et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 1, p. 124-36, Jan 2011. ISSN 1046-6673.

HU, M. C. et al. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 503-33, 2013. ISSN 0066-4278.

HUNG, J. et al. Uremic cardiomyopathy--effect of hemodialysis on left ventricular function in end-stage renal failure. **N Engl J Med**, v. 302, n. 10, p. 547-51, Mar 6 1980. ISSN 0028-4793.

IANHEZ, L. E.; LOWEN, J.; SARBAGA, E. Uremic myocardiopathy. **Nephron**, v. 15, n. 1, p. 17-28, 1975. ISSN 1660-8151.

IDVALL, J. Influence of ketamine anesthesia on cardiac output and tissue perfusion in rats subjected to hemorrhage. **Anesthesiology**, v. 55, n. 3, p. 297-304, Sep 1981. ISSN 0003-3022.

ISAKOVA, T. et al. Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. **Jama**, v. 305, n. 23, p. 2432-9, Jun 15 2011. ISSN 0098-7484.

ISRAEL, C. W. Mechanisms of sudden cardiac death. **Indian Heart Journal**, v. 66, p. S10-S17, 2014.

ITO, S. et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. **Mech Dev**, v. 98, n. 1-2, p. 115-9, Nov 2000. ISSN 0925-4773.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **J Biochem**, v. 149, n. 2, p. 121-30, Feb 2011. ISSN 0021-924x.

JEAN, G. et al. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, n. 9, p. 2792-6, Sep 2009. ISSN 0931-0509.

JIA, Z.; WANG, H.; YANG, T. Microsomal prostaglandin E synthase 1 deletion retards renal disease progression but exacerbates anemia in mice with renal mass reduction. **Hypertension**, v. 59, n. 1, p. 122-8, Jan 2012. ISSN 0194-911x.

JOKI, Y. et al. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 459, n. 1, p. 124-30, Mar 27 2015. ISSN 0006-291x.

JONO, S. et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. **Circ Res**, v. 87, n. 7, p. E10-7, Sep 29 2000. ISSN 0009-7330.

KENNEDY, D. J. et al. Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 2, p. F450-4, Feb 2008. ISSN 1522-1466.

KHARITONENKOV, A. et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. **J Cell Physiol**, v. 215, n. 1, p. 1-7, Apr 2008. ISSN 0021-9541.

KHARITONENKOV, A. et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. **J Clin Invest**, v. 115, n. 6, p. 1627-35, Jun 2005. ISSN 0021-9738.

KIM, H. J. et al. The association between soluble klotho and cardiovascular parameters in chronic kidney disease: results from the KNOW-CKD study. **BMC Nephrol**, v. 19, n. 1, p. 51, Mar 5 2018. ISSN 1471-2369.

KIM, K. H. FGF21 as a mediator of adaptive responses to stress and metabolic benefits of anti-diabetic drugs. **J Endocrinol**, v. 226, n. 1, p. R1-16, Jul 2015. ISSN 0022-0795.

KIM, K. H.; LEE, M. S. FGF21 as a Stress Hormone: The Roles of FGF21 in Stress Adaptation and the Treatment of Metabolic Diseases. **Diabetes Metab J**, v. 38, n. 4, p. 245-51, Aug 2014. ISSN 2233-6079.

KOIKE, M. K.; FRIMM CDE, C.; CURI, M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction. **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 4, p. 279-90, Aug 2007. ISSN 0959-9673.

KOKUBO, M. et al. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. **Hypertens Res**, v. 28, n. 7, p. 601-9, Jul 2005. ISSN 0916-9636.

KURO-O, M. Klotho. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 2, p. 333-43, Jan 2010. ISSN 0031-6768.

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, Nov 6 1997. ISSN 0028-0836.

KURO, O. M. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl (2011)**, v. 3, n. 5, p. 420-426, Dec 2013. ISSN 2157-1716

LEIFHEIT-NESTLER, M. et al. Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 31, n. 7, p. 1088-99, Jul 2016. ISSN 0931-0509.

LEIFHEIT-NESTLER, M.; HAFFNER, D. Paracrine Effects of FGF23 on the Heart. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 278, 2018. ISSN 1664-2392.

LEOPOLDO, A. S. et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. **Can J Cardiol**, v. 26, n. 8, p. 423-9, Oct 2010. ISSN 0828-282x.

LI, H.; ZHANG, J.; JIA, W. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. **Front Med**, v. 7, n. 1, p. 25-30, Mar 2013. ISSN 2095-0217.

LI, J. et al. New frontiers in heart hypertrophy during pregnancy. **Am J Cardiovasc Dis**, v. 2, n. 3, p. 192-207, 2012. ISSN 2160-200x.

LIN, Z. et al. Circulating FGF21 levels are progressively increased from the early to end stages of chronic kidney diseases and are associated with renal function in Chinese. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18398, Apr 15 2011. ISSN 1932-6203.

LIU, M. et al. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 19, p. 2918-26, Oct 2014. ISSN 1128-3602.

LIU, W. et al. Chronic Kidney Disease Impairs Bone Defect Healing in Rats. **Sci Rep**, v. 6, p. 23041, Mar 9 2016. ISSN 2045-2322.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023.

LONDON, G. M. et al. Uremic cardiomyopathy: an inadequate left ventricular hypertrophy. **Kidney Int**, v. 31, n. 4, p. 973-80, Apr 1987. ISSN 0085-2538.

LUBBECKE, F. et al. Experimental uremic cardiomyopathy--fact or fiction? **Contrib Nephrol**, v. 52, p. 134-45, 1986. ISSN 0302-5144.

LUO, Y. et al. Rush to the fire: FGF21 extinguishes metabolic stress, metaflammation and tissue damage. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 38, p. 59-65, Dec 2017. ISSN 1359-6101.

MAQUIGUSSA, E. et al. Klotho and PPAR Gamma Activation Mediate the Renoprotective Effect of Losartan in the 5/6 Nephrectomy Model. **Front Physiol**, v. 9, p. 1033, 2018. ISSN 1664-042x.

MARCAIS, C. et al. Circulating Klotho Associates With Cardiovascular Morbidity and Mortality During Hemodialysis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 102, n. 9, p. 3154-3161, Sep 1 2017. ISSN 0021-972x.

MCDONALD, T. A. et al. Subcutaneous administration of biotherapeutics: current experience in animal models. **Curr Opin Mol Ther**, v. 12, n. 4, p. 461-70, Aug 2010. ISSN 1464-8431.

MOE, S. M. et al. Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. **Circulation**, v. 132, n. 1, p. 27-39, Jul 7 2015. ISSN 0009-7322.

MYTYCH, J.; SOLEK, P.; KOZIOROWSKI, M. Klotho modulates ER-mediated signaling crosstalk between prosurvival autophagy and apoptotic cell death during LPS challenge. **Apoptosis**, Oct 24 2018. ISSN 1360-8185.

NAVES-DIAZ, M. et al. Calcium, phosphorus, PTH and death rates in a large sample of dialysis patients from Latin America. The CORES Study. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 6, p. 1938-47, Jun 2011. ISSN 0931-0509.

NIK-AKHTAR, B. et al. Uremic cardiomyopathy in hemodialysis patients. **Angiology**, v. 29, n. 10, p. 758-63, Oct 1978. ISSN 0003-3197.

NISHIMURA, T. et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. **Biochim Biophys Acta**, v. 1492, n. 1, p. 203-6, Jun 21 2000. ISSN 0006-3002.

ORMROD, D.; MILLER, T. Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia. **Nephron**, v. 26, n. 5, p. 249-54, 1980. ISSN 1660-8151.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 4, n. 3, p. 215-66, May-Jun 2015. ISSN 1759-7684.

OTANI-TAKEI, N. et al. Association between Serum Soluble Klotho Levels and Mortality in Chronic Hemodialysis Patients. **Int J Endocrinol**, v. 2015, p. 406269, 2015. ISSN 1687-8337.

PALMER, S. C. et al. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 305, n. 11, p. 1119-27, Mar 16 2011. ISSN 0098-7484.

PALOIAN, N. J.; LEAF, E. M.; GIACHELLI, C. M. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification. **Kidney Int**, v. 89, n. 5, p. 1027-1036, May 2016. ISSN 0085-2538.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R. Measurement of invasive blood pressure in rats. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 3, n. 2, p. 172-7, Apr 2012. ISSN 0976-500x.

PARFREY, P. S.; FOLEY, R. N. The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 7, p. 1606-15, Jul 1999. ISSN 1046-6673.

PARFREY, P. S. et al. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, n. 7, p. 1277-85, Jul 1996. ISSN 0931-0509.

PARFREY, P. S. et al. The clinical course of left ventricular hypertrophy in dialysis patients. **Nephron**, v. 55, n. 2, p. 114-20, 1990. ISSN 1660-8151.

PATEL, R. K. et al. Determinants of left ventricular mass and hypertrophy in hemodialysis patients assessed by cardiac magnetic resonance imaging. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 9, p. 1477-1483, Sep 2009. ISSN 1555-9041.

PATEL, V. et al. Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87102, 2014. ISSN 1932-6203.

PAWLUSH, D. G. et al. Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. **J Appl Physiol (1985)**, v. 74, n. 5, p. 2598-605, May 1993. ISSN 0161-7567.

PLANAVILA, A.; FERNANDEZ-SOLA, J.; VILLARROYA, F. Cardiokines as Modulators of Stress-Induced Cardiac Disorders. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 108, p. 227-256, 2017. ISSN 1876-1623.

PLANAVILA, A. et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. **Cardiovasc Res**, v. 106, n. 1, p. 19-31, Apr 1 2015. ISSN 0008-6363.

PLANAVILA, A.; REDONDO-ANGULO, I.; VILLARROYA, F. FGF21 and Cardiac Physiopathology. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 133, 2015. ISSN 1664-2392.

PLANAVILA, A. et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. **Nat Commun**, v. 4, p. 2019, 2013. ISSN 2041-1723.

POELZL, G. et al. Klotho is upregulated in human cardiomyopathy independently of circulating Klotho levels. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8429, May 30 2018. ISSN 2045-2322.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-7, Jun 2005. ISSN 0899-9007.

RANGREZ, A. Y. et al. Inorganic phosphate accelerates the migration of vascular smooth muscle cells: evidence for the involvement of miR-223. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47807, 2012. ISSN 1932-6203.

RAVIKUMAR, P. et al. alpha-Klotho protects against oxidative damage in pulmonary epithelia. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 307, n. 7, p. L566-75, Oct 1 2014. ISSN 1040-0605.

REDONDO-ANGULO, I. et al. Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy. **Cardiovasc Res**, v. 113, n. 13, p. 1574-1584, Nov 1 2017. ISSN 0008-6363.

RICHTER, B.; FAUL, C. FGF23 Actions on Target Tissues-With and Without Klotho. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 189, 2018. ISSN 1664-2392.

RICHTER, W. F.; JACOBSEN, B. Subcutaneous absorption of biotherapeutics: knowns and unknowns. **Drug Metab Dispos**, v. 42, n. 11, p. 1881-9, Nov 2014. ISSN 0090-9556.

RITTER, C. S.; SLATOPOLSKY, E. Phosphate Toxicity in CKD: The Killer among Us. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 6, p. 1088-100, Jun 6 2016. ISSN 1555-9041.

RIZZO, B. et al. Induction of antioxidant genes by sulforaphane and klotho in human aortic smooth muscle cells. **Free Radic Biol Med**, v. 75 Suppl 1, p. S14-5, Oct 2014. ISSN 0891-5849.

ROBERTS, M. A. et al. Secular trends in cardiovascular mortality rates of patients receiving dialysis compared with the general population. **Am J Kidney Dis**, v. 58, n. 1, p. 64-72, Jul 2011. ISSN 0272-6386.

ROBINSON, L. A.; BRAIMBRIDGE, M. V.; HEARSE, D. J. Comparison of the protective properties of four clinical crystalloid cardioplegic solutions in the rat heart. **Ann Thorac Surg**, v. 38, n. 3, p. 268-74, Sep 1984. ISSN 0003-4975.

ROTTMAN, J. N.; NI, G.; BROWN, M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. **Echocardiography**, v. 24, n. 1, p. 83-9, Jan 2007. ISSN 0742-2822.

SAITO, T.; FUKUMOTO, S. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and Disorders of Phosphate Metabolism. **Int J Pediatr Endocrinol**, v. 2009, p. 496514, 2009. ISSN 1687-9848.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; KAUPPINEN, A. Integrated stress response stimulates FGF21 expression: Systemic enhancer of longevity. **Cell Signal**, v. 40, p. 10-21, Dec 2017. ISSN 0898-6568.

SANTOS, L. S. et al. Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 4, p. 252-7, Jul-Aug 2006. ISSN 0102-8650.

SARAN, R. et al. US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 3, p. A7, 2018.

SHALHOUB, V. et al. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. **J Clin Invest**, v. 122, n. 7, p. 2543-53, Jul 2012. ISSN 0021-9738.

SHI, M. et al. Cisplatin nephrotoxicity as a model of chronic kidney disease. **Lab Invest**, v. 98, n. 8, p. 1105-1121, Aug 2018. ISSN 0023-6837.

SHIMIZU, I.; MINAMINO, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 97, p. 245-62, Aug 2016. ISSN 0022-2828.

SHUTO, E. et al. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 7, p. 1504-12, Jul 2009. ISSN 1046-6673.

SILVER, J.; KILAV, R.; NAVEH-MANY, T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 283, n. 3, p. F367-76, Sep 2002. ISSN 1522-1466.

SLATOPOLSKY, E. The intact nephron hypothesis: the concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder. **Kidney Int**, v. 79, p. S3-8, Apr 2011. ISSN 0085-2538 (Print) 0085-2538.

SLATOPOLSKY, E. et al. Control of phosphate excretion in uremic man. **J Clin Invest**, v. 47, n. 8, p. 1865-74, Aug 1968. ISSN 0021-9738.

SONG, S. et al. Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82968, 2013. ISSN 1932-6203.

SOPJANI, M.; DERMAKU-SOPJANI, M. Klotho-Dependent Cellular Transport Regulation. **Vitam Horm**, v. 101, p. 59-84, 2016. ISSN 0083-6729.

SOPJANI, M. et al. Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho. **Curr Mol Med**, v. 15, n. 1, p. 27-37, 2015. ISSN 1566-5240.

STEIN, A. B. et al. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. **Basic Res Cardiol**, v. 102, n. 1, p. 28-41, Jan 2007. ISSN 0300-8428.

STEIN, S. et al. Serum levels of the adipokine FGF21 depend on renal function. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 126-8, Jan 2009. ISSN 0149-5992.

SUN, L. et al. Low-dose paclitaxel ameliorates fibrosis in the remnant kidney model by down-regulating miR-192. **J Pathol**, v. 225, n. 3, p. 364-77, Nov 2011. ISSN 0022-3417.

TENTORI, F. et al. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). **Am J Kidney Dis**, v. 52, n. 3, p. 519-30, Sep 2008. ISSN 0272-6386.

TOMASCHITZ, A. et al. Aldosterone and parathyroid hormone: a precarious couple for cardiovascular disease. **Cardiovasc Res**, v. 94, n. 1, p. 10-9, Apr 1 2012. ISSN 0008-6363.

TOMASCHITZ, A. et al. Aldosterone and parathyroid hormone interactions as mediators of metabolic and cardiovascular disease. **Metabolism**, v. 63, n. 1, p. 20-31, Jan 2014. ISSN 0026-0495.

TOUCHBERRY, C. D. et al. FGF23 is a novel regulator of intracellular calcium and cardiac contractility in addition to cardiac hypertrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 304, n. 8, p. E863-73, Apr 15 2013. ISSN 0193-1849

URAKAWA, I. et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 770-4, Dec 7 2006. ISSN 0028-0836.

WALKER, M. D. et al. Cardiac structure and diastolic function in mild primary hyperparathyroidism. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 5, p. 2172-9, May 2010. ISSN 0021-972x.

WANG, S. et al. Elevated cardiac markers in chronic kidney disease as a consequence of hyperphosphatemia-induced cardiac myocyte injury. **Med Sci Monit**, v. 20, p. 2043-53, Oct 25 2014. ISSN 1234-1010.

WANG, S. et al. Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 8, p. e3018, Aug 24 2017.

WANG, Y.; SUN, Z. Current understanding of klotho. **Ageing Res Rev**, v. 8, n. 1, p. 43-51, Jan 2009. ISSN 1568-1637.

WATSON, L. E. et al. Baseline echocardiographic values for adult male rats. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 17, n. 2, p. 161-7, Feb 2004. ISSN 0894-7317.

WU, X. et al. TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 15, p. 7000-5, Apr 13 2010. ISSN 0027-8424.

XIE, J. et al. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. **Nat Commun**, v. 3, p. 1238, 2012. ISSN 2041-1723.

XIE, J. et al. Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, n. 5, p. 1150-60, May 2015. ISSN 1046-6673.

XU, Y.; SUN, Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. **Endocr Rev**, v. 36, n. 2, p. 174-93, Apr 2015. ISSN 0163-769x.

YANG, K. et al. Klotho Protects Against Indoxyl Sulphate-Induced Myocardial Hypertrophy. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, n. 10, p. 2434-46, Oct 2015. ISSN 1046-6673.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **Am J Physiol**, v. 243, n. 6, p. H941-7, Dec 1982. ISSN 0002-9513.

YOKOZAWA, T.; OURA, H.; OKADA, T. Metabolic effects of dietary purine in rats. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 28, n. 5, p. 519-26, Oct 1982. ISSN 0301-4800.

YU, C. et al. High phosphate feeding induced arterial medial calcification in uremic rats: roles of Lanthanum carbonate on protecting vasculature. **Life Sci**, v. 93, n. 17, p. 646-53, Oct 17 2013. ISSN 0024-3205.

YU, L. et al. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1R/beta catenin pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 473, n. 2, p. 455-61, Apr 29 2016. ISSN 0006-291x.

ZHANG, C. et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway. **Diabetologia**, v. 58, n. 8, p. 1937-48, Aug 2015. ISSN 0012-186x.

ZHANG, J. et al. Fenofibrate increases cardiac autophagy via FGF21/SIRT1 and prevents fibrosis and inflammation in the hearts of Type 1 diabetic mice. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 8, p. 625-41, Apr 2016. ISSN 0143-5221.

ZOCCALI, C. et al. Left ventricular mass monitoring in the follow-up of dialysis patients: prognostic value of left ventricular hypertrophy progression. **Kidney Int**, v. 65, n. 4, p. 1492-8, Apr 2004. ISSN 0085-2538.

**11 - APÊNDICE:**

11.1 – UREMIC CARDIOMYOPATHY: A NEW PIECE IN THE CHRONIC KIDNEY DISEASE – MINERAL AND BONE DISORDER PUZZLE.

11.2 – FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 IN CHRONIC KIDNEY DISEASE.

**12 – ANEXOS:**

## 12.1 – PROJETOS PILOTO.

**12 – ANEXOS:**

12.2 – CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO DE PROJETOS NA CEUA-UFJF.

**12 – ANEXOS:**

## 12.3 – BULAS.