NATÁLIA PRUDENTE DE MELLO

PTEN e Klotho: Influência do sexo e possível tratamento para condições associadas à deleção da proteína PTEN

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

São Paulo
2018

RESUMO

MELLO, N. P. PTEN e Klotho: Influência do sexo e possível tratamento para condições associadas à deleção da PTEN. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Originalmente caracterizada pela sua atividade de supressão tumoral, a PTEN (*phosphatase and tensin deleted on chromosome ten*) é uma proteína que apresenta tanto uma atividade fosfatase lipídica quanto proteica, além de outras funções fosfatase-independentes. No Sistema Nervoso Central, dada à sua participação em processos de crescimento, proliferação e sobrevivência celular, a ausência de tal proteína já foi relacionada com desenvolvimento de doenças neurológicas e neurodegenerativas. Assim, com o intuito de buscar um novo tratamento farmacológico, este trabalho teve como objetivo analisar o possível potencial terapêutico da proteína Klotho frente à ausência da PTEN, tendo em vista que ambas já demonstraram regular negativamente a via da AKT, bem como caracterizar a influência do sexo no perfil de expressão das duas proteínas. Para tanto, como modelo de estudo, foram utilizados a região do córtex de camundongos nocautes da PTEN (*Pten*^{loxP/+}; *Nse-Cre*⁺) e plasmídeo de RNA de interferência da PTEN, além de plasmídeos de hiperexpressão da Klotho. Após a obtenção das amostras, as quais foram provenientes de cultura celular embrionária neuronal, de tecido de animal adulto ou da transfecção de linhagem celular, foram realizadas análises de imunofluorescência, *Western Blotting* e de ELISA. O tempo de deleção *in vitro* da PTEN para esse modelo animal, bem como para a observação de alteração na morfologia neuronal, foi validado, permitindo a sua utilização em estudos futuros. O fator sexo demonstrou exercer influência tanto durante o desenvolvimento *in vitro* de células embrionárias quanto em animais adultos, o que reforça a importância de se considerar o sexo dos animais mesmo que ainda em fase embrionária. As proteínas PTEN e Klotho sofreram variações de acordo com o sexo, de forma a sugerir que a regulação de suas expressões podem estar intimamente relacionadas entre si e com o sexo. A análise comparativa entre machos e fêmeas *wild-type* demonstrou que, em animais adultos, machos apresentam uma maior quantidade de Klotho do que as fêmeas, enquanto que essas apresentaram uma grande tendência em expressar maiores níveis de PTEN do que o macho, corroborando com o observado na cultura embrionária. Curiosamente, apesar das diferenças observadas nos níveis de PTEN em relação ao sexo, não foi encontrada diferença na ativação da AKT. Por fim, a Klotho foi capaz de reverter os danos causados pelo silenciamento da PTEN na Rab7, um dos seus substratos proteicos, o qual desempenha uma função extremamente importante na via endocítica. Em suma, este trabalho demonstrou um potencial terapêutico da Klotho para uma condição associada à ausência da proteína PTEN e a possibilidade de ambas desempenharem atividades complementares de forma sexo dependente.

Palavras-chave: PTEN. Klotho. Influência do sexo. Alterações morfológicas neuronais. Rab7.

ABSTRACT

MELLO, N. P. PTEN and Klotho: Sex influence and a possible treatment to PTEN loss associated conditions. 2018. Dissertation (Master thesis in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Characterized originally by its tumor suppression activity, PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) is a protein that presents both lipid and protein phosphatase activities, as well as other functions that are phosphatase independent. In the Central Nervous System, due to its participation in growing, proliferating and surviving process, the absence of PTEN is already related to the development of neurological and neurodegenerative diseases. In this way, in order to find a new pharmacological treatment, this work aims to analyze the possible therapeutic potential of the Klotho protein in PTEN loss conditions since it is known that it can negatively regulate the AKT pathway, as well as to characterize the sex influence in both Klotho and PTEN protein profile expressions. Therefore, for the study models, the cortex region from PTEN conditional knockout mouse (*Pten*^{loxP/+}; *Nse-Cre*⁺) and PTEN RNA interference plasmid were used, as well as Klotho hyperexpression plasmids. After obtaining the samples, which came from embryonic neuronal cell cultures, adult animal tissue and cell line transfection, immunofluorescence, Western Blotting and ELISA analyses were performed. The lengths of *in vitro* PTEN deletion time for this animal model, and the consequent alteration in the neuronal morphology, were validated, allowing its use in future experiments. The sex factor demonstrated to have influence on both *in vitro* embryonic cell development and in adult mice, highlighting the importance of considering the animal sex even in the embryonic phase. PTEN and Klotho proteins had variations according to the sex, in a way that suggested that their expression regulation may be closely related to the sex. The comparative analyses between male and female wild-type adult mice demonstrated that males had higher Klotho expression than females, while females presented a tendency to express more PTEN than males, supporting what was observed in the embryonic neuronal culture. Curiously, although differences were observed in PTEN expression according to the sex, no differences were found in AKT activation. Lastly, Klotho was capable of reversing the negative effects caused by PTEN deletion in Rab7, one of its protein substrates, which plays an extremely important role in the endocytic pathway. In summary, this work demonstrated a therapeutic potential of Klotho for conditions associated with the absence of PTEN and the possibility of both having complementary activities in a sex dependent way.

Keywords: PTEN. Klotho. Sex influence. Neuronal morphological alterations. Rab7.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PTEN

A PTEN (*Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten*), originalmente caracterizada como supressora tumoral (LI, 1997), é uma proteína que apresenta como sua principal ação fosfatase dependente a desfosforilação do 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP₃), um potente ativador da AKT, em 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂). A partir dessa ação, a PTEN antagoniza a ação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e atua como um regulador negativo da ativação da AKT (Figura 1), a qual está relacionada principalmente com proliferação, crescimento e sobrevivência celular (MAEHAMA; DIXON, 1998; SUN et al., 1999).

Figura 1. Regulação negativa da AKT pela PTEN. Por meio de sua ação fosfatase dependente de conversão de PIP₃ em PIP₂, a PTEN antagoniza a ação da PI3K e atua como um regulador negativo da via de ativação da AKT, a qual está relacionada com crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Fonte: Adaptado de Manning et al., 2017.

Em condições fisiológicas, a estimulação de receptores do tipo tirosina quinase (TKR) ou de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) resulta no recrutamento e na ativação da PI3K, que, por meio da fosforilação da PIP₂, produz o PIP₃ (MANNING; TOKER, 2017). Este, por sua vez, pode causar a ativação da AKT ou sofrer desfosforilação pela ação da PTEN, resultando, assim, na terminação do sinal (VANHAESEBROECK et al., 2010). No entanto, na ausência da PTEN, PIP₃ se

acumula na membrana plasmática, causando a hiperativação da via de sinalização da AKT que, uma vez ativada, promove a desfosforilação de proteínas sinalizadoras, tais como glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), de forma a atuar nos processos citados anteriormente (MANNING; TOKER, 2017). Assim, por meio da regulação da atividade da AKT, a PTEN desenvolve uma função extremamente importante para o correto desenvolvimento e funcionamento dos diversos sistemas do organismo, incluindo o do Sistema Nervoso Central (SNC) (KWON et al., 2006).

Dada a sua importância, a deleção total da PTEN acarreta na letalidade precoce de camundongos já na fase embrionária (CRISTOFANO et al., 1998; SUZUKI et al., 1998), enquanto que a sua deleção parcial é associada, por exemplo, ao desenvolvimento de neoplasias em múltiplos órgãos (PODSYPANINA et al., 1999) e do Transtorno do Espectro Autista (TEA) (BUTLER, 2005; FRAZIER et al., 2015). De acordo com a literatura, mutações no gene da PTEN é considerado um dos fatores de risco para o desenvolvimento de um tipo específico do transtorno, denominado PTEN-TEA (FRAZIER et al., 2015; TILOT; FRAZIER; ENG, 2015), o qual apresenta declínio cognitivo e déficits em memória operacional devido aos baixos níveis de expressão da proteína (FRAZIER et al., 2015). Além disso, comportamentos característicos do TEA, tais como menor sociabilidade, realização de movimentos repetitivos e ansiedade, bem como macrocefalia, também já foram observados em animais com deleção da PTEN (KWON et al., 2006).

No SNC, a PTEN já se mostrou presente nas regiões do córtex, cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório, podendo ser encontrada no corpo celular e ao longo dos dendritos e axônio do neurônio (KREIS et al., 2014; PERANDONES et al., 2004). Em relação às alterações a nível celular, a ausência da PTEN implica em contínuo crescimento da célula, resultando em hipertrofia da soma neuronal e no desenvolvimento anormal de suas projeções, as quais apresentam, por exemplo, um aumento do calibre, do comprimento e de densidade dendrítica (FRASER et al., 2008; JAWORSKI, 2005; KWON et al., 2006). Tais alterações, por sua vez, causam modificações em estruturas sinápticas que resultam em um desbalanço entre as vias de sinalizações excitatórias e inibitórias (LUIKART et al., 2011), o qual pode ser um dos mecanismos associados aos déficits cognitivos ao desenvolvimento do TEA decorrente da ausência da PTEN (BUTLER, 2005; FRASER et al., 2008; KWON et al., 2006).

Por outro lado, além da sua ação fosfatase lipídica descrita anteriormente, a PTEN apresenta atividade fosfatase proteica, pela qual também é capaz de controlar processos de proliferação, crescimento e motilidade celular por meio da desfosforilação e da consequente ativação da proteína Rab7, um dos seus substratos proteicos (SHINDE; MADDIKA, 2016; TOMAS; FUTTER; EDEN, 2014). Após ser desfosforilada pela PTEN, a Rab7 atua na maturação dos endossomos, bem como na fusão desses aos lisossomos, os quais são responsáveis, por exemplo, pela degradação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (SHINDE; MADDIKA, 2016). Entretanto, na ausência da PTEN, a proteína Rab7 permanece inativa e difusa pelo citoplasma celular, sendo impedida de migrar para os endossomos e lisossomos, nos quais desempenharia suas funções (BUCCI et al., 2000; SHINDE; MADDIKA, 2016).

Assim, a busca por estratégias terapêuticas para condições associadas à ausência da PTEN torna-se extremamente relevante para diversas condições patológicas, visto a grande influência dessa proteína nos mais diversos processos fisiológicos, bem como na necessidade de sua presença para a viabilidade da vida. Além disso, levando-se em consideração que a incidência do TEA, por exemplo, é de aproximadamente 3 a 4 vezes maior em meninos do que em meninas (KIM et al., 2011), também buscou-se avaliar o perfil de expressão da PTEN frente às diferenças de sexo, uma vez que tal análise pode auxiliar na compreensão dos mecanismos relacionados à maior ou menor susceptibilidade presente entre homens e mulheres e, conseqüentemente, no processo de desenvolvimento de novos fármacos.

1.2 Klotho

Descoberta em 1997, a proteína Klotho ganhou notoriedade devido aos seus efeitos no processo de envelhecimento quando, por meio do uso de animais transgênicos, observou-se que a sua ausência era capaz de reduzir o tempo de vida do animal e causar problemas como infertilidade, aterosclerose e osteoporose, acelerando o aparecimento do fenótipo de envelhecimento (KURO-O et al., 1997).

Em relação às suas formas, a Klotho pode ser encontrada tanto como uma proteína de membrana quanto solúvel. A Klotho de membrana é composta por dois domínios, KL1 e KL2, tendo como sua função primordial a atuação como co-receptor para o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) no rim (ERBEN;

ANDRUKHOVA, 2017). Tais domínios, por sua vez, podem ser clivados pela ação das proteases ADAM 10 e 17, e liberadas na circulação (CHEN et al., 2007, 2014) e no fluido cerebrospinal, exercendo ações biológicas em múltiplos sistemas (ARKING et al., 2005; MATSUMURA et al., 1998). A forma secretada, por outro lado, é derivada de um *splicing* alternativo que leva à formação de um único domínio (KL1) e que age como um regulador endócrino de diversas glicoproteínas de superfície celular (MATSUMURA et al., 1998) (Figura 2).

Figura 2. Isoformas da klotho. A proteína klotho pode ser encontrada tanto na forma de membrana quanto na forma solúvel, a qual pode ser decorrente da clivagem da klotho de membrana pelas ADAM 10 e 17 ou de um *splicing* alternativo do RNA mensageiro. Fonte: Adaptado de Cararo-Lopes et al., 2017.

No SNC, a Klotho é encontrada em regiões como do plexo coróide, córtex, hipocampo e cerebelo (CLINTON et al., 2013; GERMAN et al., 2012; KURO-O et al., 1997; LI et al., 2004), nas quais tem demonstrado exercer ações protetoras em células neurais por meio da regulação de cascatas intracelulares de sinalização, como por exemplo da Wnt e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (CHENG et al., 2015; LIU et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2005; ZELDICH et al., 2014). Ao regular negativamente o IGF-1, a Klotho é capaz de promover uma menor atividade das cascatas de sinalização ativadas por essa via, como, por exemplo a da PI3K/AKT (GOTO et al., 2009), prevenindo, dentre outras coisas, o crescimento tumoral (WOLF et al., 2008).

De acordo com a literatura, os níveis de expressão da proteína Klotho diminuem ao longo do processo de envelhecimento, e frente a situações de estresse crônico e doença de Alzheimer (DA) (PRATHER et al., 2015; SEMBA et al., 2014). Entretanto, estudos demonstraram que a hiperexpressão da Klotho, além de prolongar o tempo de vida do animal, promove o aumento da sobrevivência neuronal e neuroproteção em modelo animal da DA, resultando em um aumento da cognição que pôde ser observada por meio da melhora do aprendizado e da memória dos animais em múltiplos testes cognitivos, independentemente da idade dos mesmos (ABRAHAM et al., 2012; DUBAL et al., 2014; KUROSU et al., 2005). Além disso, a administração periférica da Klotho em camundongos foi capaz de causar uma melhora cognitiva por meio de alterações na sinalização glutamatérgica, o que também demonstra a capacidade da Klotho em regular atividades sinápticas (LEON et al., 2017).

Dessa forma, embora suas funções no SNC ainda não sejam totalmente compreendidas, estudos têm mostrado a importância da proteína Klotho para o correto funcionamento do sistema fisiológico. Assim, tendo em vista a sua ação na via de sinalização da AKT, buscou-se analisar o potencial terapêutico da Klotho na ausência da PTEN, bem como investigar a existência de uma possível relação entre tais proteínas e a influência do sexo.

1.3 Influência do Sexo

De acordo com a literatura, diferenças entre os sexos podem ser observadas já desde o desenvolvimento embrionário, as quais podem, por exemplo, influenciar na organização do circuito neural e no comportamento social na fase adulta (TAMBORSKI; MINTZ; CALDWELL, 2016). Embora a grande parte das teorias que buscam explicações para tais diferenças se baseiem em torno de ações hormonais, é importante ressaltar que os cromossomos sexuais também são capazes de influenciar na diferenciação sexual (ARNOLD, 2009, 2017; AUYEUNG et al., 2010; CARRUTH; REISERT; ARNOLD, 2002). Contudo, seja pela ação hormonal ou por ação genética, a influência exercida pelo sexo já se mostrou um fator de risco no desenvolvimento de determinadas doenças. Ao analisar, por exemplo, a prevalência do TEA em relação ao sexo, torna-se evidente a influência exercida por esse fator no desenvolvimento de tal transtorno (AUYEUNG et al., 2010; KIM et al., 2011).

Dessa forma, investigar a influência do sexo nos perfis de expressão da PTEN e da Klotho pode fornecer novas informações para a literatura, contribuindo para uma melhor compreensão da importância de cada uma delas no funcionamento de ambos os sistemas biológicos. Além disso, tais informações podem auxiliar na busca pela identificação de possíveis fatores causais das condições associadas a ausência dessas proteínas, bem como dos mecanismos de defesa, e, consequentemente, de novos alvos terapêuticos.

condicionados da PTEN. (B) Representação das bandas referentes à PTEN e à β -actina dos animais machos (M) e fêmeas (F). Análise por teste t de Student. $P=0.0576$. Valores apresentados como a média dos valores $\pm$ o erro padrão da média. $N=5$ (macho) e $N=4$ (fêmea).

A partir da análise dos resultados obtidos, pôde-se observar uma tendência das fêmeas em expressar uma maior quantidade da PTEN do que os machos, o que pode vir a corroborar com o observado nas células neuronais embrionárias.

Posteriormente, além da PTEN, também foi analisada o perfil de expressão da AKT total e da $pAKT^{T308}$ nos animais WT adultos de ambos os sexos (Figura 15).

Figura 15. Análise de expressão da AKT e da pAKT^{T308} em relação ao sexo. Quantificação da expressão da (A) AKT total e da (B) pAKT^{T308} em animais WT machos e fêmeas condicionados da PTEN. (C) Imagens representativas das bandas. Análise por teste t de Student. Não houve diferença estatística. Valores apresentados como a média dos valores $\pm$ o erro padrão da média. n =5 (macho) e n =4 (fêmea).

De forma semelhante ao observado nas células embrionárias, não houve diferença estatística na ativação da AKT em relação ao sexo. Assim, a partir da análise dos dados em relação ao sexo, sugere-se que os perfis de expressão da PTEN e da ativação da AKT se comportem de forma semelhante desde a fase embrionária até a fase adulta.

1.4 Influência do Sexo na Expressão da Proteína Klotho

Levando-se em consideração que a Klotho também é uma proteína produzida endogenamente, e a intenção em usa-la como um possível tratamento, buscou-se analisar o seu perfil de expressão frente ao sexo. Para isso, também foram utilizadas as regiões do córtex de animais WT machos e fêmeas com dois meses de idade para a dosagem dos níveis da proteína, a qual foi realizada por meio da técnica de ELISA (Figura 16).

Figura 16. Análise da expressão da proteína Klotho em relação ao sexo. Quantificação da expressão da Klotho em animais adultos WT machos e fêmeas condicionados da PTEN. Análise por teste t de Student. * $p < 0,05$. Valores apresentados como a média dos valores $\pm$ o erro padrão da média. $n=5$ (macho) e $n=4$ (fêmea).

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar que animais WT machos apresentam uma maior quantidade de klotho quando comparados com animais WT fêmeas da mesma idade, mostrando que a expressão da Klotho, assim como a da PTEN, também varia de acordo com o sexo. Entretanto, curiosamente, ambas as proteínas demonstraram variar de forma inversa uma da outra em ambos os sexos.

1.5 PTEN e Klotho

a) Klotho como um possível substituto para a ausência de PTEN

- *Efeito do RNA de interferência da PTEN sobre a proteína Rab7*

A fim de analisar a eficiência da transfecção, bem como se os dados obtidos estariam de acordo com a literatura, foi realizada a co-transfecção de células HEK293 com plasmídeos para a expressão da proteína Rab7 e de RNAi para PTEN, vetor vazio (controle) ou para a redução da proteína (RNAi PTEN). A eficácia da transfecção foi analisada de forma indireta pela localização sub-celular da Rab7, a qual, como mencionado anteriormente, adquire uma aparência mais difusa na ausência da PTEN (Figura 17).

(A)

(B)

Figura 17. Análise da transfecção de RNAi PTEN na proteína Rab7. (A) Quantificação da forma difusa de Rab7 em relação ao total transfetado em células HEK293 na presença do vetor vazio (controle) e do plasmídeo com o RNAi da PTEN. (B) Imagem representativa da proteína Rab7 (mCherry) e DAPI (azul) nas condições controle e RNAi PTEN indicando a aparência da forma pontual (seta contínua) e difusa (seta tracejada). Imagem em aumento de 20x. Análise por teste t de Student. * $p < 0,05$. Valores apresentados como a média dos valores $\pm$ o erro padrão da média. Experimento repetido três vezes. Escala = 50 μ m.

Como pôde ser observado, a ausência da PTEN resultou em uma maior porcentagem da forma difusa da Rab7, a qual é a forma inativa da proteína, corroborando com a literatura e reforçando a importância da PTEN para o funcionamento correto da Rab7. Além disso, tal dado demonstra a eficácia da transfecção realizada.

- *Efeito do tratamento com Klotho na proteína Rab7*

Após reforçar a importância da PTEN na atividade da Rab7, buscou-se analisar os efeitos da Klotho, tanto a forma secretada quanto a de membrana, como um possível tratamento frente à ausência da PTEN. Dessa forma, células HEK293 foram co-transfectadas com os plasmídeos para a expressão da proteína Rab7, para o silenciamento da PTEN (controle ou RNAi) e para a hiperexpressão da proteína Klotho (vetor vazio, forma secretada e de membrana), gerando os resultados apresentados a seguir (Figura 18).

(A)

(B)

RNAi PTEN

Tratamento com Klotho

Figura 18. Efeito da Klotho na proteína Rab7 frente aos efeitos deletérios do silenciamento da PTEN. (A) Quantificação de Rab7 difusa em relação ao total de Rab7 transfectada nas condições com vetor vazio (Controle KI) e hiperexpressão das formas secretada (KIsecretada) e de membrana (KImembrana) da Klotho, tanto na presença (Controle) quanto na ausência (RNAi PTEN) da PTEN. (A) Imagens representativas da aparência difusa da proteína Rab7 (vermelho *mCherry*) causada pela redução da PTEN (esquerda) e da aparência pontual após tratamento com ambas as formas da Klotho (direita) nas células em que a PTEN foi silenciada. Imagem em aumento de 63x. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguido de pós teste Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p \leq 0,01$. Valores apresentados como a média dos valores $\pm$ o erro padrão da média. Experimento repetido três vezes.

A partir da análise dos resultados obtidos, observou-se que a proteína klotho, tanto a forma secretada quanto a de membrana, é capaz de restaurar os níveis de desfosforilação da proteína Rab7 para condições próximas ao basal mesmo na presença do RNAi da PTEN. Além disso, em níveis normais de PTEN, a klotho secretada também demonstrou exercer efeito sob a Rab7, diminuindo ainda mais a porcentagem da proteína que se encontra na forma inativa.

- *Efeito do tratamento com Klotho sobre a expressão da proteína PTEN*

Com o intuito de investigar o mecanismo pelo qual a Klotho exerce seu efeito sobre a Rab7, foi analisado se a hiperexpressão da klotho era capaz de restaurar os níveis de expressão da PTEN pela realização da técnica de imunofluorescência. Para isso, células HEK293 foram co-transfectadas com os plasmídeos de RNAi da PTEN, controle (vetor vazio) e de interferência, e da Klotho, tanto o vetor vazio

(controle) quanto os de hiperexpressão das formas secretada e de membrana, e posteriormente marcadas com o anticorpo para PTEN (Figura 19).

(A)

(B)

Figura 19. Efeitos da hiperexpressão da Klotho nos níveis da proteína PTEN. (A) Quantificação da imunofluorescência para a proteína PTEN na presença (Controle) e ausência (RNAi PTEN) da PTEN frente às condições normais (Controle KI) e de hiperexpressão das formas secretada (KI secretada) e de membrana (KI membrana) da Klotho. (B) Imagens representativas das marcações de DAPI (azul) e PTEN (verde) nas condições descritas acima. Valores apresentados como a média dos valores $\pm$ o erro padrão da média. Experimento repetido duas ou três vezes. Escala = 75 μ m.

Embora as variações não tenham sido significativas, no grupo controle da Klotho (vetor vazio) pareceu ocorrer uma redução nos níveis de expressão da PTEN na presença do RNAi, o que seria de se esperar. Curiosamente, a hiperexpressão da proteína klotho, tanto a forma secretada quanto a de membrana, pareceu ser capaz de restaurar os níveis de expressão da PTEN para condições próximas ao basal. Além disso, tais dados sugerem que, mesmo em condições normais de expressão da PTEN, a Klotho ainda seria capaz de aumentar o nível de expressão da mesma. No entanto, visto que os plasmídeos da PTEN e da Klotho não possuem um marcador fluorescente, todas as células foram consideradas para fim de quantificação, o que pode estar interferindo nos resultados. Assim, outro experimento será realizado para melhor interpretação dos dados.

2 CONCLUSÃO

Embora tido como um dos principais objetivos deste trabalho, ainda não foi possível analisar os efeitos da proteína Klotho sob as alterações morfológicas neuronais características da deleção da PTEN devido, principalmente, à dificuldade de obtenção do animal HO, bem como da necessidade de realização das etapas de padronização a fim de validar o modelo proposto para estudo *in vitro*.

No entanto, ao separar os embriões de acordo com o sexo, foi possível analisar a influência desse fator no perfil de expressão da PTEN e reforçar a importância de se realizar a separação dos animais mesmo para a realização de cultura embrionária. Além disso, os dados observados nos animais adultos sugerem que o fenômeno observado tende a permanecer durante o desenvolvimento do animal, o que fortalece ainda mais a hipótese da influência exercida pelo sexo.

Curiosamente, quando comparados animais WT machos e fêmeas adultos, também observou-se variações nos níveis de expressão da Klotho, as quais foram inversamente proporcionais aos da PTEN em ambos os sexos. Tal observação, além

de fortalecer a influência do sexo, sugere que ambas as proteínas podem estar intimamente relacionadas entre si de uma forma sexo-dependente.

Por fim, por meio da utilização de técnica de biologia molecular, demonstrou-se que a hiperexpressão da Klotho foi capaz de restaurar os danos causados na proteína Rab7 pela ausência da PTEN e, embora preliminar, a análise dos dados permitiu a elaboração de um possível mecanismo de ação, o qual será averiguado por meio da realização de outros experimentos.

Em suma, este trabalho pôde demonstrar o potencial terapêutico da Klotho em reverter os danos causados pela PTEN. Além da importância e do quesito inovador, tal dado fortalece a hipótese de se utilizar a Klotho como um possível tratamento frente a outras condições como essa, como, por exemplo nas alterações morfológicas neuronais discutidas anteriormente. Ademais, os dados deste trabalho sugerem que os perfis de expressão da PTEN e da Klotho podem estar diretamente relacionados com o sexo, bem como uma influenciando a outra.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, C. R. et al. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 13, p. 1671–1679, set. 2012.
- ARKING, D. E. et al. Association Between a Functional Variant of the KLOTTHO Gene and High-Density Lipoprotein Cholesterol, Blood Pressure, Stroke, and Longevity. **Circulation Research**, v. 96, n. 4, p. 412–418, 4 mar. 2005.
- ARNOLD, A. P. Mouse Models for Evaluating Sex Chromosome Effects that Cause Sex Differences in Non-Gonadal Tissues. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 377–386, abr. 2009.
- ARNOLD, A. P. A general theory of sexual differentiation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 291–300, 2 jan. 2017.
- AUYEUNG, B. et al. Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old children. **Molecular Autism**, v. 1, n. 1, p. 11, 2010.
- BERMÚDEZ BRITO, M. Focus on PTEN regulation. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. July, p. 1–15, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BUCCI, C. et al. Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 2, p. 467–480, fev. 2000.
- BUTLER, M. G. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 4, p. 318–321, 1 abr. 2005.
- CABRAL-COSTA, J. V. et al. Intermittent fasting uncovers and rescues cognitive phenotypes in PTEN neuronal haploinsufficient mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8595, 5 dez. 2018.
- CARRUTH, L. L.; REISERT, I.; ARNOLD, A. P. Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 933–934, 16 out. 2002.
- CHEN, C.-D. et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19796–19801, 11 dez. 2007.
- CHEN, C.-D. et al. Identification of Cleavage Sites Leading to the Shed Form of the Anti-Aging Protein Klotho. **Biochemistry**, v. 53, n. 34, p. 5579–5587, 2 set. 2014.
- CHENG, M.-F. et al. Signals mediating Klotho-induced neuroprotection in hippocampal neuronal cells. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 75, n. 1, p. 60–71, 2015.
- CLINTON, S. M. et al. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. **Brain Research**, v. 1527, p. 1–14, ago. 2013.
- CRISTOFANO, A. D. et al. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. **Nature Genetics**, v. 19, n. 4, p. 348–355, 1 ago. 1998.
- DUBAL, D. B. et al. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. **Cell Reports**, v. 7, n. 4, p. 1065–1076, maio 2014.
- ERBEN, R. G.; ANDRUKHOVA, O. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. **Bone**, v. 100, p. 62–68, jul. 2017.
- FRASER, M. M. et al. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. **Neuroscience**, v. 151, n. 2, p. 476–488, jan. 2008.

FRAZIER, T. W. et al. Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 9, p. 1132–1138, 2015.

GERMAN, D. C. et al. Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 7, p. 1483.e25-1483.e30, jul. 2012.

GLYNN, M. W.; MCALLISTER, A. K. Immunocytochemistry and quantification of protein colocalization in cultured neurons. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1287–1296, out. 2006.

GOTO, M. et al. IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells. **REPRODUCTION**, v. 137, n. 5, p. 835–842, maio 2009.

HETTINGER, K. et al. c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 2, p. 218–229, 5 fev. 2007.

HSU, S.-C. et al. Testosterone increases renal anti-aging klotho gene expression via the androgen receptor-mediated pathway. **Biochemical Journal**, v. 464, n. 2, p. 221–229, 1 dez. 2014.

JAWORSKI, J. Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11300–11312, 7 dez. 2005.

KIM, Y. S. et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample. **American Journal of Psychiatry**, v. 168, n. 9, p. 904–912, set. 2011.

KREIS, P. et al. Subcellular targeting and dynamic regulation of PTEN: implications for neuronal cells and neurological disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, n. April, p. 1–19, 2014.

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, 1997.

KUROSU, H. et al. Suppression of Aging in Mice by. v. 309, n. September, p. 1829–1834, 2005.

KWON, C. H. et al. Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. **Neuron**, v. 50, n. 3, p. 377–388, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

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

LI, J. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943–1947, 28 mar. 1997.

LI, S.-A. et al. Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. **Cell Structure and Function**, v. 29, n. 4, p. 91–99, 2004.

LIU, H. et al. Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803–806, 10 ago. 2007.

LUIKART, B. W. et al. Pten Knockdown In Vivo Increases Excitatory Drive onto Dentate Granule Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 4345–4354, 16 mar. 2011.

MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The Tumor Suppressor , PTEN /. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13375–13378, 1998.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.

MARANGOS, P. J. et al. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. **Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 185–193, maio 1980.

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626–630, jan. 1998.

MCFARLANE, L. et al. Novel PCR Assay for Determining the Genetic Sex of Mice. **Sexual Development**, v. 7, n. 4, p. 207–211, 2013.

NAGY, A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. **genesis**, v. 26, n. 2, p. 99–109, fev. 2000.

ÖZ, O. K. et al. Aromatase Deficiency Causes Altered Expression of Molecules Critical for Calcium Reabsorption in the Kidneys of Female Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1893–1902, 20 ago. 2007.

PATEL, L. et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR γ agonists are mediated via upregulation of PTEN. **Current Biology**, v. 11, n. 10, p. 764–768, maio 2001.

PERANDONES, C. et al. Correlation between synaptogenesis and the PTEN phosphatase expression in dendrites during postnatal brain development. **Molecular Brain Research**, v. 128, n. 1, p. 8–19, set. 2004.

PODSYPANINA, K. et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 4, p. 1563–1568, 16 fev. 1999.

PRATHER, A. A. et al. Longevity factor klotho and chronic psychological stress. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 6, p. e585-6, 2015.

SAMAAN, M. C. et al. Sex differences in skeletal muscle Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) levels: A cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9154, 17 ago. 2015.

SCHROEDER, B.; MCNIVEN, M. A. Importance of endocytic pathways in liver function and disease. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1403–1417, 2014.

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

SHINDE, S. R.; MADDIKA, S. PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10689, 12 dez. 2016.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 1, p. 3–20, 2018.

STAMBOLIC, V. et al. Regulation of PTEN Transcription by p53. **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, p. 317–325, ago. 2001.

SUN, H. et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 11, p. 6199–6204, 25 maio 1999.

SUZUKI, A. et al. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. **Current Biology**, v. 8, n. 21, p. 1169–1178, out. 1998.

TAMBORSKI, S.; MINTZ, E. M.; CALDWELL, H. K. Sex Differences in the Embryonic Development of the Central Oxytocin System in Mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 4, abr. 2016.

TILOT, A. K.; FRAZIER, T. W.; ENG, C. Balancing Proliferation and Connectivity in PTEN-associated Autism Spectrum Disorder. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 609–619, 2015.

TOMAS, A.; FUTTER, C. E.; EDEN, E. R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 1, p. 26–34, jan. 2014.

VANHAESEBROECK, B. et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 329–341, 9 maio 2010.

VASCONCELOS, A. R. et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 85, 2014.

VASUDEVAN, K. M.; GURUMURTHY, S.; RANGNEKAR, V. M. Suppression of PTEN Expression by NF- κ B Prevents Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 3, p. 1007–1021, 1 fev. 2004.

VIROLLE, T. et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 1124–1128, 1 dez. 2001.

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

YAMAMOTO, M. et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 38029–38034, 2005.

ZELDICH, E. et al. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24700–24715, 2014.