

MARIANE PEREIRA

**O papel de klotho na morfogênese e diferenciação
da glândula mamária murina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e
do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Nathalie Cella

Versão corrigida.

**São Paulo
2020**

RESUMO

PEREIRA, M. **O papel de klotho na morfogênese e diferenciação da glândula mamária murina.** 2020. 57 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O desenvolvimento da glândula mamária ocorre majoritariamente na fase pós-natal, com a extensão e ramificação dos ductos mamários durante a puberdade, e a diferenciação e renovação do epitélio a cada ciclo gestacional. Dentre as vias que regulam esses processos na glândula mamária, estão as via de Wnt, de insulina e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), de FGF (fator de crescimento fibroblástico) e as reguladoras do canal de cálcio TRPV6. Klotho, uma proteína inicialmente descrita por sua ação antienvhecimento, possui diversas atividades biológicas, que incluem a regulação das vias acima descritas. Klotho inibe as vias de Wnt, de insulina e de IGF-1, é coreceptor obrigatório para FGF23 e estabilizador do canal de cálcio TRPV5 e 6 na membrana plasmática. Muitas das vias sabidamente reguladas por klotho são importantes para o desenvolvimento normal da glândula mamária e estão algumas vezes implicadas em sua progressão tumoral. Apesar dessas correlações, o papel de klotho nesse órgão nunca foi estudado. Assim, esse trabalho visa uma compreensão inicial do papel de klotho na morfogênese e diferenciação mamária murina. O desenvolvimento da glândula mamária selvagem (WT) e da deficiente em klotho (KL) foi comparado em animais de 3, 4 e 8 semanas de idade. As glândulas mamárias do animal selvagem (WT) e do deficiente em klotho (KL) não diferem até a puberdade (3 semanas), mas passa a divergir a partir da quarta semana de vida, quando o desenvolvimento dos ductos dos animais KL se mostra atrasado. A glândula mamária KL mostrou-se capaz de responder ao estímulo de Estrógeno e Progesterona, porém sua morfologia difere marcadamente do epitélio WT, com atraso na extensão de ductos, brotos terminais dilatados e ramificações laterais anormais. Os transplantes da glândula KL ou WT inteiras em animais WT, ou somente do epitélio KL em um estroma selvagem (*cleared fat pad*), sugerem que klotho tem tanto função autônoma quanto não autônoma nesse órgão. Em culturas tridimensionais, organóides de células epiteliais mamárias primárias deficientes em KL são menos coesos do que os organóides de células WT, sugerindo um possível papel de klotho na interação célula-célula. Em conjunto, os dados sugerem que klotho exerce papel tanto autônomo quanto não autônomo na morfogênese da glândula mamária murina.

Palavras chave: Klotho. Glândulas mamárias. Morfogênese. Whole mount. Cultura tridimensional.

ABSTRACT

PEREIRA, M. **The role of klotho on morphogenesis and differentiation of murine mammary gland.** 2020. 57p. Masters dissertation (Cellular, Tecdual and Developmental Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The development of the mammary gland occurs mainly after birth, with the branching morphogenesis on the onset of the puberty and terminal differentiation on each pregnancy. These processes are regulated by several pathways, including Wnt pathway, insulin/ insulin like growth factor - 1 (IGF1), fibroblast growth factor (FGF) and the TRPV6 calcium channel. Klotho was first described as an antiaging protein. Its biological functions include the inhibition of Wnt and insulin/IGF-1 pathway, it is mandatory co-reception for FGF23 and stabilizes the TRPV5 and 6 channel on the plasma membrane. Klotho regulates several pathways that are important for mammary gland development and are frequently disrupted in tumoral progression of the breast. Despite these correlations, the role of klotho in the mammary gland has never been studied. Therefore, the goal of this work is to bring a first understanding of the role of klotho on morphogenesis and differentiation of the mammary gland. The mammary gland development of wild type (WT) and klotho deficient (KL) mice were compared by whole mount in 3, 4 and 8 weeks old animals. WT and KL glands do not differ until puberty (3 weeks age), but, after 4 weeks, the gland from KL animal presents a delayed ductal development. The KL mammary gland is capable of responding to Estrogen and Progesterone stimuli, but its morphology markedly differs from the WT gland, with a delay in epithelial elongation, dilated end buds and abnormal lateral ramification. The transplants of total KL and WT mammary glands on WT mice or the transplant of epithelial portion into mammary cleared fat pad suggest klotho plays an autonomous and nonautonomus role in this organ. In tridimensional cultures, organoids of KL-deficient primary mammary epithelial cells display less cohesion than organoids of WT cells, suggesting a possible role of klotho in cell-cell interaction. Together, these data suggest that klotho plays an autonomous and nonautonomous role in murine mammary gland morphogenesis.

Key words: Klotho. Mammary gland. Morphogenesis. Tridimensional Culture.

1 INTRODUÇÃO

A presença da glândula mamária é a característica morfológica que define a classe dos mamíferos, além de ser um dos únicos órgãos responsáveis pela nutrição inicial dos filhotes mamíferos, através da produção e liberação de leite [2].

A glândula mamária é um complexo órgão secretor composta por tecido epitelial, que forma uma árvore ductal ramificando-se a partir do mamilo, invadindo o estroma que, em camundongos, é preenchido por adipócitos e denominado *fat pad* (Figura 1) [3, 4]. A porção epitelial pode ser dividida em dois tipos de células: luminais e basais. As células luminais formam o ducto e os alvéolos e suas células podem ser classificadas quanto ao tipo de receptor hormonal que apresentam. São essas células que irão se especializar para a produção de leite quando requerida. As células basais são principalmente mioepiteliais, com funções contráteis para a expulsão do leite, havendo também uma população de células-tronco [3, 4].

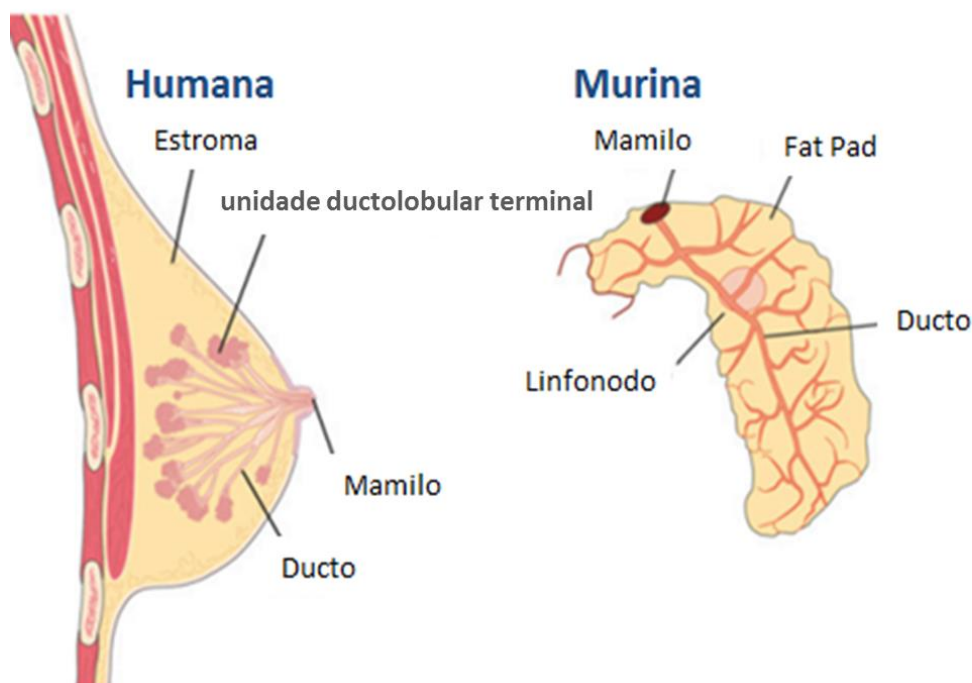


Figura 1. Ilustração esquemática da glândula mamária humana e murina. A imagem representa a glândula mamária humana (esquerda) e murina (direita), mostrando as principais estruturas que as compõe. Modificada de Visvader, et al; 2009 [5].

Por ser um órgão, em mamíferos, que se desenvolve majoritariamente após o nascimento, a glândula mamária torna-se um modelo útil e frequentemente empregado para o estudo da biologia do desenvolvimento. Embora a glândula mamária murina difira da humana em alguns aspectos ao longo do seu desenvolvimento, mostrou-se um importante modelo para o estudo do desenvolvimento normal e progressão tumoral da glândula mamária humana [6, 7].

O camundongo possui 5 pares de glândulas mamárias localizadas imediatamente abaixo da pele, sendo 3 pares torácicos e 2 inguinais, (Figura 2) [3]. Adiante serão detalhados alguns aspectos de seu desenvolvimento.

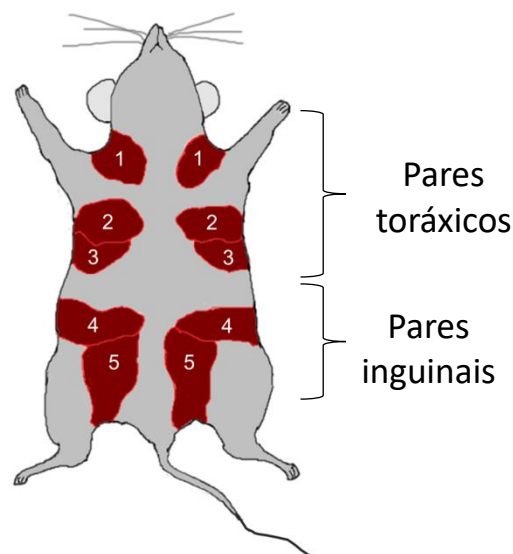


Figura 2. Ilustração esquemática dos 5 pares mamários murinos. O desenho mostra a disposição dos 5 pares de glândula mamária na porção ventral de um camundongo. Modificado de Lin, Chen et al. 2017 [8].

1.1 Desenvolvimento da glândula mamária murina

O desenvolvimento da glândula mamária ocorre ao longo de 3 estágios principais: embrionário, pubertal e reprodutivo [4]. Nesses estágios, a glândula mamária passa de um ramo rudimentar com intenso potencial proliferativo, ao nascimento, para uma árvore ductal bem desenvolvida ao término da puberdade. É capaz ainda de sofrer intensa proliferação e diferenciação para a produção e secreção do leite a cada gestação e de retornar ao estado pré gestacional a cada

desmame (Figura 3). Cada uma dessas etapas será apresentada com mais detalhes à diante [3,4].

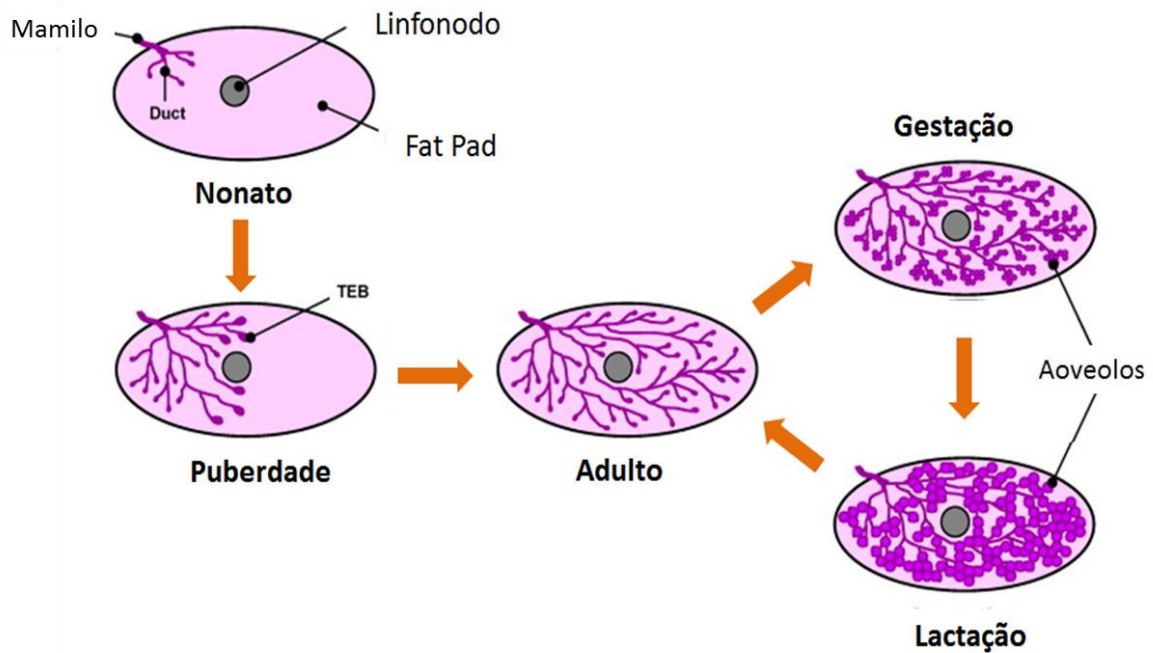


Figura 3. Ilustração esquemática das etapas do desenvolvimento pós natal do epitélio mamário murino. A imagem mostra um esquema representativo da glândula mamária neonatal, púbere, adulta, gestante e lactante. TEB - *terminal end bud*. Modificado de Watson, et al. 2008 [9].

1.1.1 Desenvolvimento embrionário

Embora a maior parte do desenvolvimento mamário se dê no estágio pós natal, o estágio embrionário é fundamental para definir a localização das glândulas mamárias e formar uma árvore epitelial rudimentar [4].

Esse desenvolvimento tem início a partir do dia 10 de gestação, quando começam a se formar a linha do leite, dois cordões bilaterais derivados da ectoderme [10]. Posteriormente, no dia 11,5, as células da ectoderme migram para o interior da mesoderme e as linhas do leite dão lugar aos 5 pares de placoides primários, já localizados onde irão, a partir do dia 15,5, se estender para formar brotos mamários [11, 12].

Esses brotos se acomodam na mesoderme adjacente, que passa a formar o fat pad mamário. Ocorre então a formação dos ductos rudimentares com a extensão

de 10-15 ramos incipientes. Essa ramificação inicial ocorre em resposta à sinalização recebida do mesênquima, sem a influência hormonal observada na fase pós-natal [10, 11]. Os ramos incipientes já possuem capacidade de diferenciação para produção de leite e formam extremidades com alto potencial proliferativo [13]. Suas extremidades possuem várias camadas internas de células chamadas de medula, recobertas com uma camada epitelial com potencial de invasão, chamada cortex. Essas estruturas darão origem aos terminal end buds (TEBs) que serão apresentados na puberdade [14, 15].

A glândula mamária rudimentar mantém-se quiescente do período do nascimento até a puberdade, não havendo nesse período desenvolvimento mamário, apenas o crescimento alométrico, ou seja, que acompanha o crescimento geral do indivíduo [4,12].

1.1.2 Desenvolvimento pubertal

A puberdade murina se inicia entre a terceira e quarta semana de vida, quando os ovários passam a liberar os hormônios sexuais, e se completa na oitava semana de vida [3, 16].

Durante esse período, ocorre uma massiva proliferação dos ductos mamários em resposta aos hormônios ovarianos (sobretudo estrógeno e progesterona) que regulam localmente, no microambiente mamária, a ação dos fatores de crescimento [3, 16]. O estímulo hormonal leva à extensão dos ductos e à sua ramificação, formando ramos secundários a partir dos ductos primários. Ao final da puberdade, cerca de 60% do fat pad deve estar preenchido pelos ramos, que se espalham por toda a sua extensão [4].

Esse crescimento massivo inicia-se pelas estruturas proliferativas dos ductos rudimentares acima descritas e é continuado pelos TEBs, que serão responsáveis pelo crescimento ductal na maior parte da puberdade. Os TEBs são estruturas terminais dos ductos em crescimento constituído de uma cápsula com duas camadas. A camada externa é formada por células progenitoras das células mioepiteliais (cap cells) e a camada interna é estratificada e é formada por células progenitoras das células luminiais (body cells). Essas estruturas são responsáveis pela invasão do estroma, que é liderada pelas células da camada externa do TEB [15, 17, 18].

Embora o desenvolvimento pós-natal da glândula mamária se dê principalmente sob estímulo hormonal de estrógeno e progesterona, sabe-se que apenas 30% das células epiteliais luminais possuem receptores para esses hormônios [19, 20]. Assim, o estímulo proliferativo de estrógeno e progesterona ocorre de forma parácrina, por meio de mediadores da resposta hormonal que, direta ou indiretamente, estimulam a proliferação das células-tronco ou progenitoras na glândula mamária [19, 20].

Uma vez preenchido o fat pad, a glândula fica pronta para a diferenciação, caso ocorra a gestação. Ainda, a cada ciclo estral, ocorre um estímulo proliferativo, com a proliferação e morte de pequenas ramificações terciárias que envolvem a cada período [17, 21].

1.1.3 Desenvolvimento reprodutivo

O desenvolvimento reprodutivo ocorre a cada ciclo gestacional e consiste em duas fases: na diferenciação terminal das células da glândula mamária e na sua involução [4].

A diferenciação ocorre do período de gestação e lactação, afim de preparar a glândula mamária para produção, armazenamento e secreção do leite. A involução ocorre ao término do período de lactação. Nesta fase, a glândula retorna para o estado semelhante à glândula virgem, a fim de prepará-la para uma futura gestação [4].

A gestação murina dura 21 dias, sendo que entre 19 e 21 dias ocorre um pico de diferenciação da glândula mamária, que se torna totalmente competente para a entrega de leite até o momento do parto [3]. Durante a gestação, ocorre inicialmente um aumento nas ramificações laterais secundárias e terciárias, no qual a progesterona tem importante papel estimulador [4]. Progesterona e prolactina atuam em conjunto nessa fase, permitindo então o remodelamento e diferenciação dessas células, para formação de alvéolos competentes. Nos períodos finais da gestação e início da lactação as células dos alvéolos terminam sua especialização e passam a secretar leite [22, 23].

A glândula mamária diferenciada mantém a mesma disposição celular observada na glândula virgem, apresentando uma camada externa de células mioepiteliais que recobre a árvore ductal. Na porção alveolar, a camada mioepitelial

forma uma estrutura semelhante à uma rede, com capacidade de contração [21, 24]. Sabe-se hoje que a função das células mioepiteliais vai além do papel contrátil, pois elas atuam paracrinamente sobre as luminais e são essenciais para a sua diferenciação [25].

O lúmen alveolar é conectado à rede de ductos mamários que se conectam ao mamilo. Uma vez que ocorra o estímulo de sucção pelo filhote, as células mioepiteliais são estimuladas pelo hormônio oxitocina. Ocorre então a contração necessária para a expulsão do leite armazenado nos alvéolos para o lúmen ductal [21, 24].

A involução se inicia quando não há mais demanda por leite da prole, seja pelo desmame normal, que, no camundongo, ocorre por volta de 21 dias de vida, seja pela retirada precoce dos filhotes [3, 26]. Na involução, ocorre a morte das células produtoras de leite e um intenso remodelamento da porção epitelial da glândula e da matriz extracelular [27].

O processo de involução se dá em dois estágios. O primeiro, imediatamente após a retirada dos filhotes, não acarreta em alterações morfológicas, porém há grande acúmulo de leite nos alvéolos. Nele ocorre apoptose e destacamento de células alveolares, que se acumulam no lúmen do alvéolo nas primeiras 12 horas após o desmame. Essa primeira fase da involução pode ser revertida caso haja novamente o estímulo de sucção [17, 27]. O segundo estágio é irreversível e ocorre após 48 horas sem demanda por leite, neste estágio há perda das estruturas alveolares [4, 27], que dão novamente lugar aos adipócitos do estroma e a árvore epitelial retorna à arquitetura semelhante a anterior à gestação [4, 17].

1.2 Vias reguladas por klotho que têm um papel no desenvolvimento mamário murino

Todas as fases do desenvolvimento mamário devem ser finamente reguladas e diversas vias atuam para a organização da morfogênese e diferenciação mamária [28]. Muitas das vias que regulam o desenvolvimento fisiológico da glândula mamária estão frequentemente alteradas em condições patológicas e na progressão tumoral, sendo portanto um alvo de estudo interessante para diversas áreas [14, 29].

Algumas vias importantes no desenvolvimento mamário murido são também reguladas por klotho, proteína de interesse neste estudo. Estas vias serão, portanto, detalhadas a seguir.

1.2.1 Papel de Wnt na glândula mamária

Uma importante via que atua na plasticidade mamária é a da proteína wingless (Wnt) [30]. A via de Wnt é uma via bem conservada associada principalmente aos mecanismos de auto renovação, proliferação e morte de células-tronco. As proteínas da família Wnt podem atuar tanto pela via canônica, mediada por β -catenina, quanto pela via não canônica, chamada de independente de β -catenina [31].

Na glândula mamária, foi mostrado que ocorre a expressão de diferentes ligantes da família Wnt em cada fase do desenvolvimento mamário, havendo diferente expressão espacial e temporal de Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, e Wnt7b [32].

Dessa forma, Wnt atua tanto no desenvolvimento não hormonal (pré-natal), quanto no mediado por estrógeno (pubertal) e progesterona (reprodutivo), porém tem uma ação mais proeminente na fase mediada por progesterona [32].

Na fase embrionária, foi mostrado que a ação canônica de Wnt é essencial para a localização correta das linhas de leite e dos placóides mamários [33].

Por ser um órgão que permanece quiescente até a puberdade e passa por uma intensa proliferação celular no seu desenvolvimento pubertal e diferenciação a cada gestação, as células-tronco e progenitoras têm um papel importante também na fase pós natal. A auto renovação, proliferação e comprometimentos dessas células com o fenótipo diferenciado são essenciais para a morfogênese da glândula mamária e sua renovação a cada ciclo mamário [34].

Foi mostrado que as células que expressam o receptor de estrógeno secretam Wnt de forma direta e também indiretamente, ativando a expressão de Wnt em células do estroma. Desta forma, em resposta ao estímulo hormonal, Wnt (possivelmente Wnt4, Wnt5a, and Wnt7b) é produzido na glândula mamária. A partir daí, Wnt tem papel de mediador hormonal, atuando em diferentes tipos celulares mamários, incluindo as células-tronco [32, 34].

Ainda, durante a puberdade, o controle negativo para a proliferação do tecido epitelial é importante para assegurar que se mantenha espaço suficiente no estroma

que será ocupado na futura alveologênese. O fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ativa diretamente a expressão de Wnt5, que, por sua vez, regula negativamente a extensão e ramificação mamário [4, 34].

Já na gestação, Wnt4 é um importante mediador parácrino da progesterona e necessário para a formação de ramificações laterais, que ocorrem antes da formação dos alvéolos propriamente dita. Para que ocorra a alveologênese é necessária a ativação de β -catenina e, embora não se saiba qual Wnt está envolvido nesse processo, sabe-se que é dependente da ativação da sua via canônica [32, 34].

1.2.2 Papel de FGF na glândula mamária

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) formam uma família de pelo menos 22 proteínas estruturalmente semelhantes, com distribuição ubíqua e diversas atividades biológicas. Cada tipo de FGF se liga a receptores de FGF (FGFR) específicos, necessitando muitas vezes de adaptadores moleculares para promover a interação receptor-ligante [35].

No desenvolvimento embrionário, a presença de FGF2 e de seu receptor na ectoderme é necessária para o início e a manutenção dos brotos mamários, bem como seu posicionamento [36].

Uma forma de atuação hormonal na glândula mamária é por meio do crosstalk das células epiteliais com as células do estroma mamário. Um mediador dessa via é a anfiregulina, liberada pelas células que expressam o receptor de estrógeno em resposta à esse hormônio. A anfiregulina tem seu receptor no estroma, que, em resposta ao seu estímulo, produz diversos FGFs. FGF1, FGF2, FGF4, FGF7 e FGF10 estão presentes na glândula mamária durante o desenvolvimento pubertal e estimulam seus receptores expressos pelas células epiteliais, promovendo sua proliferação [35, 36].

Nos TEBs, a presença de receptores FGFR2 favorece a invasão do estroma pela árvore ductal, sendo que o estímulo do crescimento ductal é específico para esse receptor [36]. Não se sabe ao certo o papel de FGF durante as fases de gestação e lactação, porém é sabido que a glândula mamária expressa FGF nessas fases, sendo que FGF23 é expresso em menor quantidade pela glândula mamária e é encontrado em pequenas quantidades no leite materno [36,37].

1.2.3 Papel de insulina e IGF-1 na glândula mamária

Para o desenvolvimento da glândula mamária púbere, além do estrógeno, liberado pelos ovários, é necessária a liberação do hormônio de crescimento (GH) pela glândula pituitária. GH se liga a seu receptor no estroma mamário e estimula a expressão de IGF-1, que, por sua vez, irá estimular a ramificação e a extensão dos ductos de forma parácrina, ligando-se aos receptores de IGF-1 no tecido epitelial, principalmente nos TEBs [28, 38].

Foi mostrado que a glândula mamária depende de IGF-1 para o desenvolvimento durante a puberdade, pois esse desenvolvimento é interrompido em camundongos knockout para o gene *igf-1*. Sabe-se também que o IGF-1 produzido localmente pelo estroma exerce um papel mais importante no desenvolvimento da glândula mamária do que o IGF-1 circulante secretado pelo fígado [28, 39].

Na fase do desenvolvimento alveolar, a insulina passa a ter um papel importante na glândula mamária, agindo de forma sinérgica com a prolactina. Tanto insulina, quanto seu receptor (IR) são requeridos para alveologênese e para a diferenciação do tecido para a produção de leite, regulando também a secreção de leite na fase da lactação [38].

1.2.4 Papel dos canais de cálcio TRPV na glândula mamária

Durante a lactação, a glândula mamária precisa de um grande aporte de cálcio da circulação sanguínea, que sofre transporte transcelular para o leite, a fim de suprir as necessidades de cálcio do filhote. Ainda, a homeostase de cálcio na glândula mamária possui papel na sua proliferação, diferenciação e apoptose, sendo importante no remodelamento da glândula mamária durante a involução. Apesar de sua importância, os mecanismos pelos quais ocorre o transporte de cálcio para a glândula mamária ainda não estão elucidados [40, 41].

Os receptores de potencial transiente (TRP), especialmente os do tipo vaniloide (TRPV) 5 e 6, estão possivelmente envolvidos na entrada de cálcio na glândula mamária. Tratam-se de canais seletivos para cálcio e que não dependem da despolarização da membrana. Estão constitutivamente ativos, sendo sua

expressão regulada por hormônios calcitropicos e são considerados canais universais para a entrada de cálcio no tecido epitelial [41].

A presença de TRPV5 na membrana plasmática das células epiteliais mamárias não foi detectada, porém foi levantada a hipótese de que sua expressão seja ativada durante a lactação. A presença de TRPV6 foi detectada na membrana apical, sugerindo que ela exerça outro papel na homeostase do cálcio, que não a entrada basolateral requerida para a passagem de cálcio para o leite [42].

1.4.5 Implicação dessas vias no câncer de mama

As vias acima mencionadas como importantes reguladores do desenvolvimento normal da glândula mamária estão frequentemente alteradas na sua tumorigênese [29].

Insulina e IGF-1 regulam a proliferação, sobrevivência e metástase do câncer de mama, sendo que uma maior taxa de insulina na circulação sanguínea foi associada a um pior prognóstico para o câncer de mama em pacientes com diabetes mellitus [43, 44 45]. Ainda, o aumento da concentração plasmática de IGF-1 aumenta o risco de câncer de mama no período pré-menopausa e, *in vitro*, IGF-1 foi associado à resistência de células tumorais mamárias à drogas antitumorais [43, 46].

A sinalização de FGF pode apresentar-se alterada de diversas formas no câncer de mama, podendo apresentar uma expressão desregulada de FGF, bem como alterações em seu receptor, como mutações ou translocações [47].

Foi mostrado, em camundongos, que a ativação descontrolada da via de Wnt leva à tumorigênese mamária, embora os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não estejam bem estabelecidos. Em humanos, os genes que expressam Wnt estão frequentemente superexpressos e há correlação entre tumor de mama e uma estabilização de β -catenina, que é resultado da ativação da via canônica de Wnt [48, 49].

A expressão de TRPV6 se mostrou aumentada em amostras provenientes de câncer de mama e em células de linhagem tumoral mamária, como MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D, SKBR3 e MCF-7. A expressão de TRPV6 é maior em células com perfil mais invasivo e, *in vitro*, foi observada que a inibição do canal TRPV6 inibe a invasão e migração celular [40, 42].

Essas mesmas vias que regulam o desenvolvimento e a tumorigênese mamária são também sabidamente reguladas por klotho em outros tecidos [51, 52]. Portanto, iremos apresentar a proteína klotho e sua função nas vias mencionadas.

1.3 Klotho

Em 1997, Kuro-o et al. descreveu pela primeira vez o gene klotho (*kl*) ao observar sua relação com o envelhecimento precoce em camundongos [50]. O camundongo deficiente em klotho apresenta o tempo de vida reduzido e, a partir da puberdade, mostra uma série de fenótipos semelhantes aos do envelhecimento humano, que incluem aterosclerose, osteoporose, calcificação ectópica, atrofia da pele, enfisema e infertilidade. O camundongo deficiente em klotho tem o crescimento retardado e a maturação de gônadas funcionais prejudicada, causando a infertilidade (Figura 4).

Atualmente, sabe-se que a proteína α -klotho (chamada aqui apenas klotho) atua em diferentes processos metabólicos não apenas relacionados ao envelhecimento, sendo de interesse de diversos campos de pesquisa [51].

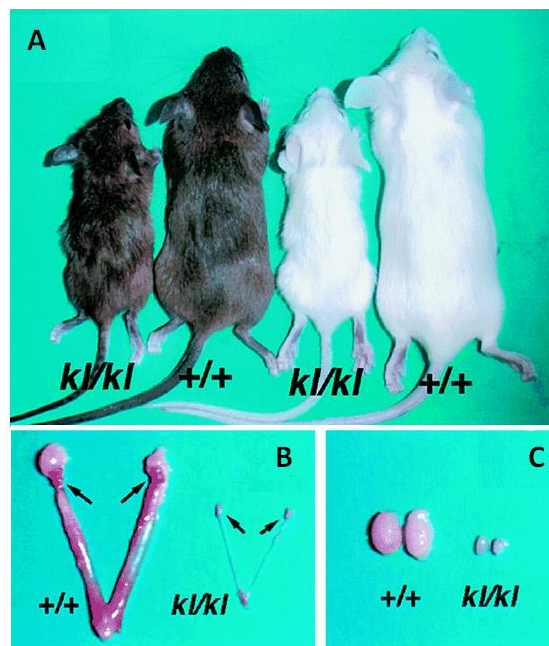


Figura 4 - Animal deficiente em klotho apresenta retardo do crescimento e não desenvolve gônadas funcionais. A- Comparação entre animal deficiente em klotho *kl/kl* e selvagem *+/+*, mostrando retardo do crescimento. O animal *kl/kl* também não desenvolve

gônadas funcionais em ambos os sexos. Os ovários/útero e testículos estão mostrados em B e C, respectivamente. Modificada de Kuro-o, et al. 1997 [50].

Klotho é um gene bem conservado em humanos (cromossomo 13), camundongos (cromossomo 5) e ratos (cromossomo 12) [52, 53], apresentando 5 exons e 4 introns [50]. A proteína apresenta alta homologia entre as espécies, tendo 98% de homologia entre a espécie humana e camundongos [51].

Trata-se de uma proteína transmembranar, com 1014 aminoácidos, que possui uma sequência sinal na extremidade N-terminal (SS), responsável por sua translocação do citoplasma para a membrana plasmática, uma porção citoplasmática (CD) e uma porção extracelular (Figura 5) [54].

A porção extracelular possui dois domínios denominados KL1 e KL2 [50]. Esta parte da molécula sofre clivagem proteolítica, que pode ocorrer em dois sítios distintos, gerando formas solúveis de 70 ou 130 kDa, como esquematizado na figura 5 [54]. Há ainda uma segunda forma circulante de klotho, originada do splicing alternativo, tendo tamanho e estrutura semelhante ao domínio KL1, diferindo apenas pelo C-terminal. A proteína apresenta portanto 3 isoformas, sendo uma forma transmembranar e duas formas solúveis com origens distintas - uma é produto da clivagem proteolítica do domínio extracelular e a outra é produto de splicing alternativo. Não se sabe ao certo a diferença de funcionalidade entre essas duas formas circulantes (Figura 5) [50 e 51].

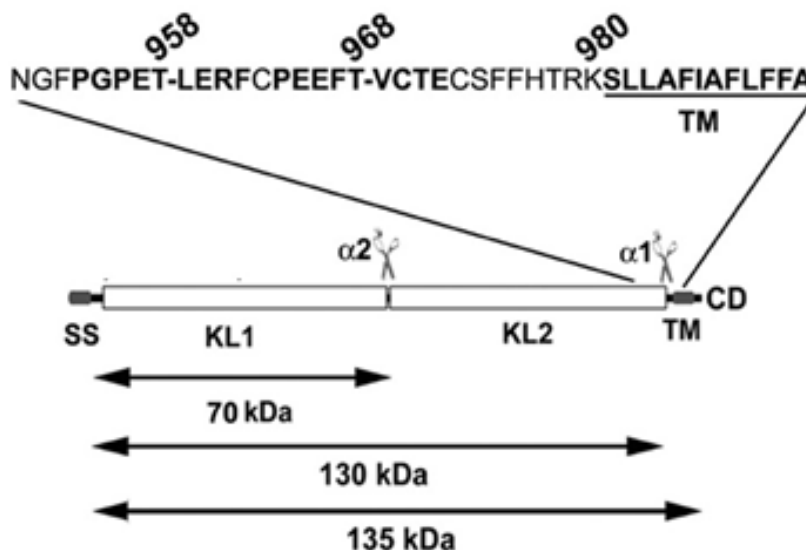


Figura 5. Estrutura geral de klotho e seus produtos de clivagem. Klotho transmembranar apresenta dois domínios extracelulares (KL1 e KL2), uma sequência sinal (SS), um domínio transmembranar (TM) e um domínio citoplasmático (CD). A porção extracelular pode ser clivada nos sítios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (indicados), gerando produtos de 130 e 70 kDa, respectivamente. Adaptado de Chen et al, Biochemistry 2014^[54].

Inicialmente observou-se que klotho era expresso majoritariamente nos túbulos contorcidos distais do rim, na glândula paratireoide e no plexo coróide do cérebro. Estudo posterior revelou que diversas outras células e tecidos humanos expressam klotho em menor quantidade, como mostrado na tabela 1 ^[55, 56].

Tabela 1 - Expressão de klotho em diversos tecidos humanos. Foi utilizada espectrometria de massa para caracterizar a presença de klotho em diversos tecidos e células e confirmar a presença da porção transmembranar. Adaptado de Lim, et al. 2015 ^[56].

| | Peptídeo da porção extracelular | Peptídeo da porção transmembranar |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|
| Células Humanas | | |
| Proteína α -Klotho recombinante humana | + | + |
| Células epiteliais do túbulo proximal do rim | + | + |
| Queratinócito | + | + |
| Células epiteliais mamárias | + | - |
| Células epiteliais da próstata | + | - |
| Células neuronais | + | + |
| Tecidos humanos | | |
| Proteína α -Klotho recombinante humana | + | + |
| Rim | + | + |
| Cortex renal | + | + |
| Medula renal | + | + |
| Glândula paratireoide | + | + |
| Pâncreas | + | + |
| Cortex cerebral | + | + |
| Cerebelo | + | + |
| Aorta | + | + |
| Artéria muscular | + | + |

Uma vez que as formas circulantes de klotho são lançadas na corrente sanguínea, klotho tem atividade hormonal e exerce papel em diversos órgãos. A análise estrutural dos domínios extracelulares de klotho mostra semelhança com as proteínas da família da hidrolases glicosidases 1 (GH1), porém não foi demonstrada atividade hidrolítica significativa para klotho ^[57].

Parte das funções de klotho transmembranar e circulante serão descritas com mais detalhes adiante.

1.3.1 Klotho é co-receptor obrigatório de FGF23

O fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) é um fator de crescimento derivado do osso que regula a função renal através do metabolismo de vitamina D e da homeostase do fósforo [58]. FGF23 reduz a absorção de fósforo na urina e doenças associadas ao excesso de FGF23 mostram um desperdício de fósforo, mesmo que a função renal esteja intacta [59].

É sabido também que FGF23 atua como um regulador negativo da concentração de vitamina D no plasma por duas vias. FGF23 suprime a transcrição de 25-hidroxivitamina D 1- α -hidroxilase (Cyp27b1), que participa da síntese da forma ativa de vitamina D. FGF23 estimula 1,25-dihidroxivitamina D 24-hidroxilase (Cyp24a1), que catalisa o catabolismo de vitamina D em sua forma inativa de ácido calcitropic (Figura 6) [60, 61].

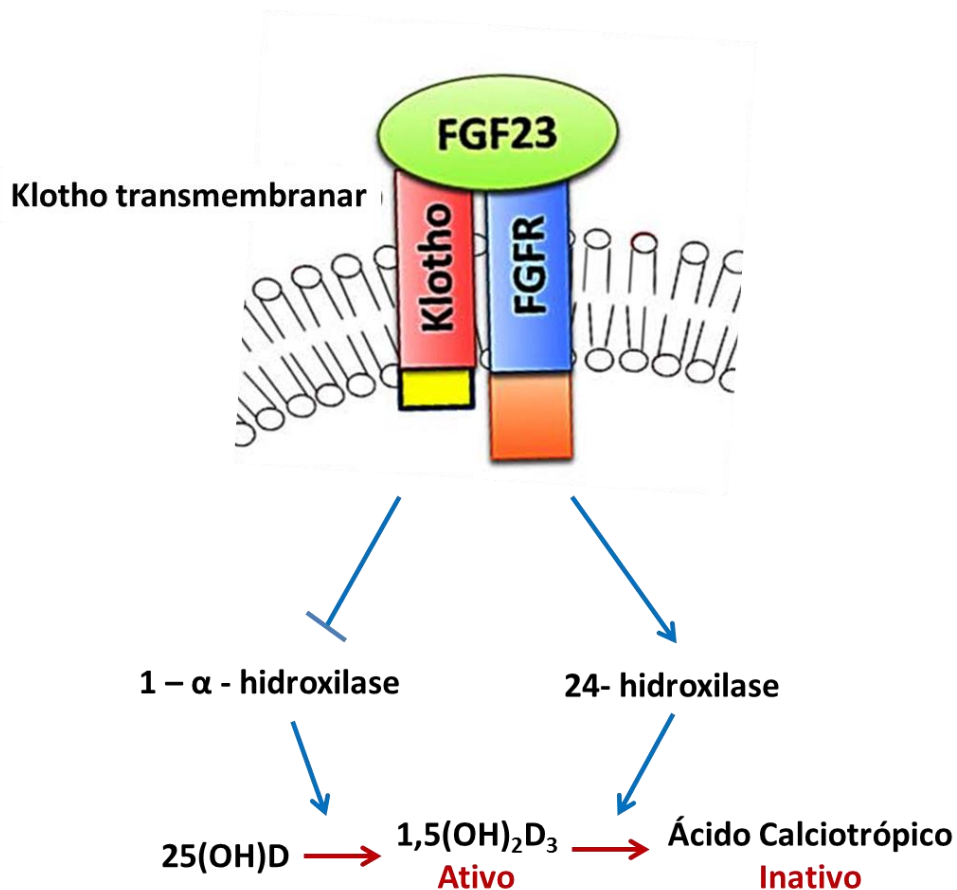


Figura 6. Esquema da sinalização de klotho/FGF23 no metabolismo de vitamina D. A sinalização de klotho/FGF23 reduz os níveis plasmáticos de vitamina D por inibir a expressão de 1 - α - hidroxilase e por induzir 24-hidroxilase. Dessa forma diminui a

produção da forma ativa da vitamina D e estimula seu catabolismo na forma inativa de ácido calcitropic. Modificado de Sopjani, et al. 2015 [61].

Os domínios extracelulares de klotho transmembranar e do receptor de fator de crescimento fibroblástico 1 (FGFR1) dimerizam, tornando o heterodímero um receptor específico de FGF23 [62]. Além disso, Klotho solúvel também se liga à FGF23, formando um complexo FGFR1 - Klotho - FGF23, que estabiliza a ligação de FGF23 no seu receptor [62, 63]. Dessa maneira, a maior expressão de klotho no túbulo renais e no plexo coróide cerebral está também associada à função de FGF23 nesses tecidos [62].

Em 2018, foi mostrada a estrutura cristalina desse complexo, esclarecendo como se dá a ligação de klotho à FGF23 e a aproximação de FGF23 e FGFR1 promovida por klotho (Figura 7). Esse mesmo trabalho também mostrou que a forma circulante de klotho é suficiente para exercer a função de co-receptor, atuando sob demanda como um mediador não enzimático para essa ligação [64]. A atuação de klotho solúvel como receptor de FGF23, além da forma transmembranar, sugere que klotho poderia atuar também de forma parácrina [63].

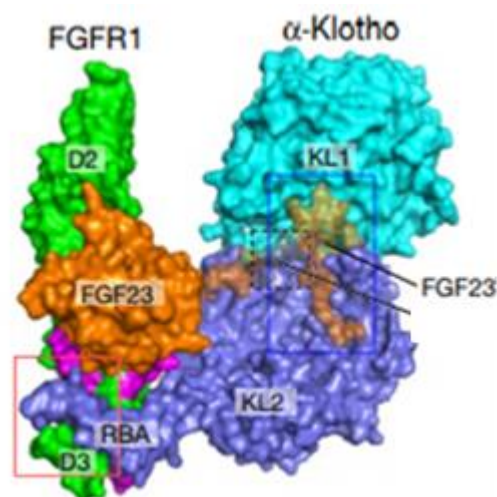


Figura 7. Representação estrutural da superfície do complexo FGF23-Klotho-FGFR1. A imagem baseia-se na cristalografia de raio-x, confirmando a formação do complexo FGF23-Klotho-FGFR1. Adaptado de Chen et al. 2018 [64].

1.3.2 Klotho é inibidor da via de Wnt

Wnt é uma proteína secretada que regula a auto-renovação e proliferação das células-tronco em diversos tecidos. Sabe-se que a ativação prolongada da via de Wnt promove a exaustão das células-tronco e alteração das células progenitoras o que pode levar ao fenótipo de envelhecimento [65].

Foi mostrado que klotho solúvel pode se ligar a diversos membros da família de Wnt, inibindo a interação desses fatores ao seu receptor na membrana plasmática. Assim, o envelhecimento precoce observado no animal deficiente em klotho estaria relacionado a uma ativação excessiva da via de Wnt [55].

Embora o camundongo deficiente em klotho apresente osteoporose nos ossos periféricos, há um aumento da massa óssea nas epífises trabeculares, que se explica por uma proliferação acentuada das células-tronco ósseas, uma vez que Wnt está seletivamente aumentada nessa região [66].

Klotho também atua como supressor de tumor em diversos tecidos [67]. Em hepatocarcinoma, foi mostrado que a inibição da via de wnt por klotho está associada com a supressão do tumor, uma vez que a via Wnt/b-catenina é importante no desenvolvimento do tumor hepático [68].

1.3.3 Klotho inibe a via de insulina/IGF-1

As vias de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) são fundamentais para diversos processos metabólicos e de desenvolvimento de vários tecidos [69].

Klotho inibe a via de sinalização de insulina e IGF-1 sem interagir diretamente com o receptor desses ligantes [70]. Embora os mecanismos de regulação de insulina e IGF-1 por klotho não estejam completamente elucidados, sabe-se que, *in vitro*, klotho suprime a autofosforilação do receptor de insulina/IGF-1, bem como de outras reações de fosforilação ao longo da via de sinalização, como o da fosfoinositol 3-quinase (PI3K) [71]. Dessa forma, o camundongo deficiente em klotho apresenta maior sensibilidade à insulina, bem como menor secreção deste hormônio [50].

É sabido que a inibição da via insulina/IGF-1/PI3K previne o envelhecimento de forma conservada em diferentes espécies [72]. Isto se dá por conferir resistência ao estresse oxidativo, uma vez que a via de estresse oxidativo das proteínas

forkhead box (FOXO) é um alvo da via de insulina/IGF-1/PI3K. A inibição da via insulina/IGF-1/PI3K ativa FOXO, que aumenta a transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes (Figura 8) [73].

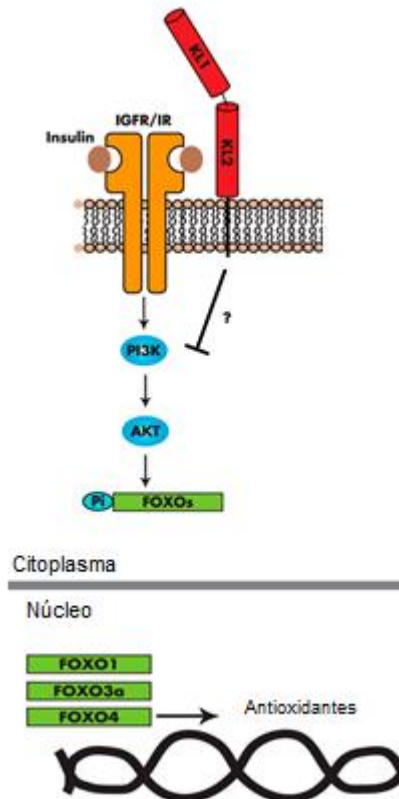


Figura 8. Klotho inibe a via de insulina e IGF1. Klotho inibe a via de insulina e IGF1, sem se ligar diretamente ao seu receptor. A inibição dessa via favorece a ativação das FOXOs, que conferem resistência ao estresse oxidativo. Adaptado de Xu, et al. 2015 [51].

1.3.4 Klotho estabiliza o canal de cálcio TRPV5

TRPV5 e TRPV6 são canais de cálcio da família dos receptores de potencial transiente vaniloides (TRPV) e desempenham como função principal a manutenção dos níveis de cálcio no sangue. São estruturalmente semelhantes e muitas vezes atuam em conjunto, embora TRPV5 seja mais abundante nos rins e TRPV6, no intestino [74].

Klotho possui atividade de β -glucuronidase na sua porção extracelular, através da qual hidrolisa um ácido siálico do domínio extracelular do canal TRPV5. Essa modificação expõe um sítio de ligação de galectina -1, que forma um polímero estável, reduzindo a taxa de endocitose do canal. Dessa forma, klotho leva à

estabilização de TRPV5 na membrana plasmática, como mostrado no esquema a seguir (Figura 9) [75, 76].

Ainda, foi mostrado que *in vitro*, klotho é capaz de ativar exclusivamente TRPV5 e TRPV6, mas não outros canais da família dos receptores de potencial transiente (TRP) [77].

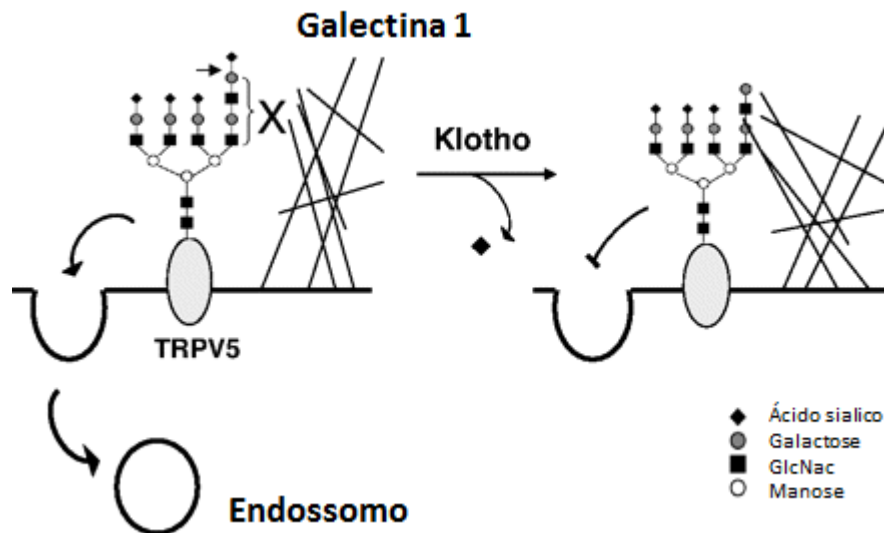


Figura 9. Klotho estabiliza canal TRPV5 na membrana plasmática. Klotho hidrolisa um resíduo de ácido siálico do canal TRPV5 (seta), permitindo a ligação do canal com polímero de galectina -1 e conseqüentemente retardando sua endocitose. Modificado de Che, et al. 2008 [76].

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados sugerem que klotho possui um papel na glândula mamária murina, sendo observadas diferenças fenotípicas entre a glândula mamária do animal selvagem e deficiente em klotho a partir da quarta semana de vida. A glândula mamária deficiente em klotho é capaz de responder aos estímulos proliferativos de estrógeno e progesterona, crescendo sua árvore ductal, porém esta difere marcadamente do animal selvagem, mostrando um atraso no desenvolvimento e ductos mais espessos, mais ramificados e com terminais mais dilatados. O transplante total da glândula mamária e transplante da porção epitelial em *cleared fat pad*, sugere que klotho exerce um papel autônomo no tecido epitelial mamário. Em cultura tridimensional primária, klotho é necessário para manutenção da forma dos organóides.

REFERÊNCIAS*

- [1] CURIE, E.; SHEEN, V.. Madame Curie: A Biography. Garden City, N.Y. Doubleday, Doran & Company p.341, 1937 – Tradução livre)
- [2] CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M.. The origin and evolution of lactation. **J Biol.**, v. 37, n.8, 2009.
- [3] RICHERT, M. M.; SCHWERTFEGER, K. L.; RYDER, J. W.; ANDERSON, S. M.. An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.** v. 5, n. 2, 2000.
- [4] MACIAS, H.; HINCK, L.. Mammary gland development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v. 1, n. 4. p. 533–557, 2012.
- [5] VISVADER, J. E.. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes Dev.** v. 23, n. 22, 2009
- [6] MCNALLY, S.; STEIN, T.. Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. 2017. In: MARTIN, F.; STEIN, T.; HOWLIN, J.. Mammary Gland Development. Methods in Molecular Biology, v. 1501.
- [7] DANIEL, C. W.; SMITH, G. H.. The mammary gland: A model for development. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.** v. 4, n. 1, p.3-8, 1999.
- [8] LIN, M. C.; CHEN, S. Y.; HE, P. L.; LUO, W. T.; LI, H. J.. Transfer of Mammary Gland-forming Ability Between Mammary Basal Epithelial Cells and Mammary Luminal Cells via Extracellular Vesicles/Exosomes. **J Vis.**, v. 124, 2017.

*De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio do Janeiro. 2002.

- [9] WATSONK, C. J.; NEOH, K.. The Stat family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 4, p. 401-406, 2008.
- [10] SAKAKURA, T.. Embryogenesis. In: Neville M.C., Daniel C.W., The Mammary Gland: Development, Regulation and Function. New York. Plenum Press. pp 37–65. 1987.
- [11] VELTMAAT, J. M.; MAILLEUX, A. A.; THIERY, J. P.; BELLUSCI, S.. Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. **Differentiation**, v. 71, p. 1–17, 2003.
- [12] ROBINSON, G. Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. **Nat Rev Genet**, v. 8, p. 963–972, 2007.
- [13] KOGATA, N., BLAND, P., TSANG, M., OLIEMULLER, E., LOWE, A., HOWARD, B. A.. Sox9 regulates cell state and activity of embryonic mouse mammary progenitor cells. **Communications biology**, v. 1, p. 228, 2018.
- [14] HOWARD, B. A.; GUSTERSON, B.A.. Human breast development. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 5, p.119 – 137, 2000.
- [15] GJOREVSKI, N.; NELSON, C. M.. Integrated Morphodynamic Signalling of the Mammary Gland. **Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 581-93, 2011.
- [16] DANIEL, C. W.; SILBERSTEIN, G. B.. Postnatal development of the rodent mammary gland. In Neville, M. C.; Daniel C. W.. The Mammary Gland: Development, Regulation, and Function. New York. Plenum Press. pp. 3–36, 1987.
- [17] INMAN, J. L.; ROBERTSON, C.; MOTT, J. D.; BISSELL, M. J.. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**, v. 142, 2015.
- [18] WILLIAMS, J. M.; DANIEL, C. W.. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. **Dev. Biol.**, v. 97, p. 274-290, 1983.
-

[19] BRISKEN, C.; PARK, S.; VASS, T.; LYDON, J. P.; O'MALLEY, B. W.; WEINBERG, R. A.. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5076-5081, 1998.

[20] MALLEPELL, S.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; BRISKEN, C.. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2196-2201, 2006

[21] FATA, J. E.; CHAUDHARY, V.; KHOKHA, R.. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β -estradiol during the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 680-688, 2001.

[22] BRISKEN, C.; PARK, S.; VASS, T.; LYDON, J. P.; O'MALLEY, B. W.; WEINBERG, R. A.. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 95, p. 5076 – 5081, 1998.

[23] BRISKEN, C.; KAUR, S.; CHAVARRIA, T. E.; BINART, N.; SUTHERLAND, R. L.; WEINBERG, R. A.; KELLY, P. A.; ORMANDY, C. J.. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. **Dev. Biol.**, v. 210, p. 96–106, 1999.

[24] OAKES, S. R.; HILTON, H. N.; ORMANDY, C. J.. Key stages in mammary gland development - The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. **Breast Cancer Res.**, v. 8, n. 2, 2006.

[25] FORSTER, N., SALADI, S. V., VAN BRAGT, M., SFONDOURIS, M. E., JONES, F. E., LI, Z., ELLISEN, L. W. Basal cell signaling by p63 controls luminal progenitor function and lactation via NRG1. **Developmental cell**, v. 28, n. 2, p. 147–160, 2014.

- [26] QUARRIE, L. H.; ADDEY, C. V. P.; WILDE, C. J.. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. **J. Cell. Physiol.**, v. 168, p. 559–569, 1996.
- [27] LI, M.; LIU, X.; ROBINSON, G.; BAR-PELED, U.; WAGNER, K. U.; YOUNG, W. S.; HENNIGHAUSEN, L.; FURTH, P. A.. Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 94, p. 3425 – 3430, 1997.
- [28] STERNLICHT, M. D.. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Res.**, v. 8, n. 201, 2005.
- [29] HOWARD, B.; ASHWORTH, A.. Signalling Pathways Implicated in Early Mammary Gland Morphogenesis and Breast Cancer. **PLoS Genet.**, v. 2, n. 8, 2006.
- [30] ALEXANDER, C.M.; GOEL, S.; FAKHRALDEEN, S. A.; KIM, S.. Wnt signaling in mammary glands: plastic cell fates and combinatorial signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 4, n. 10, 2012.
- [31] WIDELITZ, R.. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. **Growth Factors**, v. 23, n. 2, p. 111-116, 2005.
- [32] ROARTY, K.; ROSEN, J. M.. Wnt and mammary stem cells: hormones cannot fly wingless. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 10, n. 6, p. 643–649, 2010.
- [33] CHU, E. Y.; HENS, J.; ANDL, T.; KAIRO, A.; YAMAGUCHI, T. P.; BRISKEN, C.; GLICK, A.; WYSOLMERSKI, J. J.; MILLAR, S. E.. Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. **Development**, v. 131, p. 4819-4829, 2004
- [34] DALE, J.; DALE, T.. Wnt signalling in murine postnatal mammary gland development. **Acta Physiol.**, v. 204, p. 118–127, 2012.
- [35] SINOWATZ, F.; SCHAMS, D.; PLATH, A.; KÖLLE, S.. Expression and Localization of Growth Factors during Mammary Gland Development. **Adv Exp Med Biol.**, v. 480, p.19–25, 2000.

- [36] HYNES, N. E.; WATSON, C. J.. Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 2, n. 8, 2010.
- [37] MARTIN, A.; DAVID, V.; QUARLES, L. D.. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. **Physiol Rev.**, v. 92, 2012.
- [38] NEVILLE, M. C.; WEBB, P.; RAMANATHAN, P.. The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 305, n. 9, 2013.
- [39] ROWZEE, A. M.; LAZZARINO, D. A.; ROTA, L.; SUN, Z.; WOOD, T. L.. IGF ligand and receptor regulation of mammary development. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.**, v. 13, n. 4, p. 361–370, 2008.
- [40] LEE, W. J.; MONTEITH, G. R.; ROBERTS-THOMSON, S. J.. Calcium transport and signaling in the mammary gland: targets for breast cancer. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1765, n. 2, p. 235–255, 2006.
- [41] VANHOUTEN, J. N.; WYSOLMERSKI, J. J.. Transcellular Calcium Transport in Mammary Epithelial Cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 12, p. 223–235, 2007.
- [42] OUADID-AHIDOUCHE, H.; DHENNIN-DUTHILLE, I.; GAUTIER, M.; SEVESTRE, H.; AHIDOUCHE, A.. TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer?. **Trends Mol Med.**, v. 19, n. 2, p. 117–124, 2013.
- [43] CHRISTOPOULOS, P. F.; MSAOUEL, P.; KOUTSILIERIS, M.. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. **Mol Cancer.**, v. 14, p. 43, 2015.
- [44] WOLF, I.; SADETZKI, S.; GLUCK, I.; OBERMAN, B.; BEN-DAVID, M.; PAPA, M. Z.. Association between diabetes mellitus and adverse characteristics of breast cancer at presentation. **Eur J Cancer**, v. 42, p. 1077–1082, 2006.
- [45] WOLF, I.; LEVANON-COHEN, S.; BOSE, S.. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, p. 7094–7105, 2008.
- [46] DUNN, S. E.; HARDMAN, R. A.; KARI, F. W.; BARRETT, J. C.. Experimental Therapeutics Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Alters Drug Sensitivity of HBL100 Human Breast Cancer Cells by Inhibition of Apoptosis

Induced by Diverse Anticancer Drugs. *Experimental Therapeutics*, v, 57, n. 13, 1997

[47] BRADY, N.; CHUNTOVA, P.; BADE, L. K.; SCHWERTFEGER, K.L.. The FGF/FGFR axis as a therapeutic target in breast cancer. **Expert Rev Endocrinol Metab.**, v. 8, n. 4, p. 391–402, 2013.

[48] HOWE, L. R; BROWN, A. M. C.. Wnt Signaling and Breast Cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2004.

[49] BROWN, A. M. Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle?. **Breast Cancer Res.**, v. 3, n. 351, 2001.

[50] KURO-O M, MATSUMURA Y, AIZAWA H, ET AL. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, p. 45–51, 1997.

[51] XU, Y.; SUN, Z.. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. **Endocr Rev.**, v. 36, n. 2, p. 174–193, 2015.

[52A] WANG, Y.; SUN, Z.. Current understanding of klotho. **Ageing Res Rev.**, v. 8, 2009.

[53] KOH, N.; FUJIMORI, T.; NISHIGUCHI, S.. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 280, p. 1015– 1020, 2001.

[54] CHEN, C. D.; TUNG, T. Y.; LIANG, J.; ZELDICH, E.; TUCKER ZHOU, T. B.; TURK, B. E.; ABRAHAM, C. R.. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. **Biochemistry**, v. 53, 2014.

[55] LIU, H.; FERGUSSON, M. M.; CASTILHO, R. M.; LIU, J.; CAO, L.; CHEN, J.; MALIDE, D.; ROVIRA, I. I.; SCHIMEL, D.; KUO, C.J.; GUTKIND, J. S.; HWANG, P. M.; FINKEL, T.. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, v. 317, 2007.

[56] LIM, K.; GROEN, A.; MOLOSTVOV, G.. α -Klotho Expression in Human Tissues. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 100, n. 10, 2015.

[57] TOHYAMA, O.; IMURA, A.; IWANO, A.; FREUND, J. N.; HENRISSAT, B.; FUJIMORI, T.; NABESHIMA, Y.. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem.*, v. 279, n.11, 2004.

[58] SHIMADA, T.; HASEGAWA, H.; YAMAZAKI, Y.; MUTO, T.; HINO, R.; TAKEUCHI, Y.; FUJITA, T.; NAKAHARA, K.; FUKUMOTO, S.; YAMASHITA, T.. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **J. Bone Min. Res.**, v. 19, p. 429-435, 2004.

[59] MARTIN, A.; DAVID, V.; QUARLES, L. D.. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. **Physiol. Rev.**, v. 92, p. 131-155, 2012.

[60] SHIMADA, T.; KAKITANI, M.; YAMAZAKI, Y.; HASEGAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; FUJITA, T.; FUKUMOTO, S.; TOMIZUKA, K.; YAMASHITA, T.; Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 561–568, 2004.

[61] SOPJANI M, RINNERTHALER M, KRUGA J, DERMAKU-SOPJANI M. Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho. **Curr Mol Med.**, v. 15, n. 1, p. 27–37, 2015.

[62] URAKAWA, I.; YAMAZAKI, Y.; SHIMADA, T.; IJIMA, K.; HASEGAWA, H.; OKAWA, K.; FUJITA, T. FUKUMOTO, S.; YAMASHITA, T.. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, p. 770–774, 2006.

[63] KUROSU, H., OGAWA, Y., MIYOSHI, M., YAMAMOTO, M., NANDI, A., ROSENBLATT, K. P., BAUM, M. G., SCHIAVI, S., HU, M. C., MOE, O. W., KURO-O, M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120–6123, 2006.

[64] CHEN, G.; LIU, Y.; GOETZ, R.; FU, L.; JAYARAMAN, S.; HU, M.; MOE, O. W.; LIANG, G.; LI, X.; MOHAMMADI, M.. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. **Nature**, v. 553, 2018.

[65] KIRSTETTER, P.; ANDERSON, K.; PORSE, B. T.; JACOBSEN, S. E.; NERLOV, C.. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of

hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 1048-1056, 2006.

[66] YAMASHITA, T.; NIFUJI, A.; FURUYA, K.; NABESHIMA, Y.; NODA, M.. Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. **J. Endocrinol.**, v. 159, p. 1-8, 1998.

[67] XIE, B.; CHEN, J.; LIU, B.; ZHAN, J.. Klotho acts as a tumor suppressor in cancers. **Pathol Oncol Res.**, v.19, n. 4, p. 611-7, 2013.

[68] TANG, X.; WANG, Y.; FAN, Z.; JI, G.; WANG, M.; LIN, J.; HUANG, S.; MELTZER, S. J.. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. **Lab Invest.**, v. 96, p. 197–205, 2016.

[69] RUBINEK, T.; MODAN-MOSES, D.. Klotho and the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor 1 Axis: Novel Insights into Complex Interactions. *Vitamins & Hormones*, v. 101, p. 85-118, 2016.

[70] UTSUGI, T.; OHNO, T.; OHYAMA, Y.; UCHIYAMA, T.; SAITO, Y.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; ITOH, H.; KURABAYASHI, M.; KAWAZU, S.; TOMONO, S.; OKA, Y.; SUGA, T.; KURO-O, M.; NABESHIMA, Y.; NAGAI, R.. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. **Metabolism**, v. 49, p. 1118-1123, 2000.

[71] KUROSU, H.; YAMAMOTO, M.; CLARK, J. D.; PASTOR, J. V.; NANDI, A.; GURNANI, P.. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, p. 1829–33, 2005.

[72] KENYON, C.. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. **Cell**, v. 120, p. 449–60, 2005.

[73] YAMAMOTO, M.; CLARK, J. D.; PASTOR, J. V.; GURNANI, P.; NANDI, A.; KUROSU, H.. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 380, p. 29–34, 2005.

[74] PENG, J.; SUZUKI, Y.; GYIMESI, G.; HEDIGER, M. A.. TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels. In: KOZAK, J. A.; PUTNEY JR, J. W.. Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells. cap. 13, Boca Raton (FL), CRP Press. 2018

[75] CHANG, Q.; HOEFS, S.; VAN DER KEMP, A. W.; TOPALA, C. N.; BINDELS, R. J.; HOENDEROP, J. G.. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. **Science**, v. 310, p. 490-493, 2005.

[76] CHA, S.; ORTEGA, B.; KUROSU, H.; ROSENBLATT, K. P.; KURO-O, M.; HUANG, C.. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 105, n. 28, p. 9805–9810, 2008.

[77] LU, P.; BOROS, S.; CHANG, Q.; BINDELS, R. J.; HOENDEROP, J. G.. The β -glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 11, p. 3397–3402, 2008.

[78] LIGUMSKY, H.; RUBINEK, T.; MERENBAKH-LAMIN K.. Tumor Suppressor Activity of Klotho in Breast Cancer Is Revealed by Structure-Function Analysis. **Mol Cancer Res.**, v. 13, n. 10, 2015.

[79] CARDIFF, R. D., JINDAL, S., TREUTING, P. M., GOING, J. J., GUSTERSON, B., THOMPSON, H.. Comparative Anatomy and Histology. **J..Mammary Gland.**, 487–509, 2018

[80] WOLF I, LAITMAN Y, RUBINEK T, ABRAMOVITZ L, NOVIKOV I, BEERI R, KURO-O M, KOEFFLER HP, CATANE R, FREEDMAN LS, LEVY-LAHAD E, KARLAN BY, FRIEDMAN E, KAUFMAN B.. Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin. **Oncogene.**, v. 29, n. 1, p. 26-33, 2010.

[81] LINDBERG, K.; AMIN, R.; MOE, O. W.; HU, M. C.; ERBEN, R. G.; ÖSTMAN WERNERSON, A.; LANSKE, B.; OLAUSON, H.; LARSSON, T. E..

The kidney is the principal organ mediating klotho effects. **J Am Soc Nephrol.**, v. 25, n.10, p. 2169-75, 2014.

[82] OLAUSON H, LINDBERG K, AMIN R, JIA T, WERNERSON A, ANDERSSON G, LARSSON TE. Targeted deletion of Klotho in kidney distal tubule disrupts mineral metabolism. **J Am Soc Nephrol.**, v. 23, n.10, p. 1641-51, 2012.

[83] BISSEL, M.. Mouse mammary gland wholemounts. **Bissel Laboratory Protocols.**

[84] MROUE, R.; BISSELL, M. J.. Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 945, p. 221–250, 2013.

[85] TOYAMA, R.; FUJIMORI, T.; NABESHIMA, Y.; ITOH, Y.; TSUJI, Y.; OSAMURA, R. Y.; NABESHIMA, Y.. Impaired regulation of gonadotropins leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. **Endocrinology**, v. 147, n.1, p. 120-9, 2006.

[86] FLÖTOTTO, T.; NIEDERACHER, D.; HOHMANN, D.; HEIMERZHEIM, T.; DALL, P.; DJAHANSOUZI, S.; BENDER, H. G.; HANSTEIN, B.. Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 88, n. 2, p. 131–142, 2004.

[87] HU, M. C.; SHI, M.; ZHANG, J.; ADDO, T.; CHO, H. J.; BARKER, S. L.; RAVIKUMAR, P.; GILLINGS, N.; BIAN, A.; SIDHU, S. S.; KURO-O, M.; MOE, O. W.. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 1, p. 79–90, 2016.

[88] TOYAMA, R.; FUJIMORI, T.; NABESHIMA, Y.; ITOH, Y.; TSUJI, Y.; OSAMURA, R. Y.; NABESHIMA, Y.. Impaired regulation of gonadotropins leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. **Endocrinology**, v. 147, n.1, p. 120-9, 2006.

[89] DEOME, K. B.; FAULKIN, L. J.; BERN, H. A.; BLAIR, P. B.. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. **Cancer Res.**, v. 19, p. 515-20, 1959.

[90] VIDAL, J. D.; FILGO, A. J.. Evaluation of the estrous cycle, reproductive tract, and mammary gland in female mice. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 7, p. 306–325, 2017.