

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.

**São Paulo
2020**

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**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira, Mariane

O papel de klotho na morfogênese e diferenciação da glândula mamária murina / Mariane Pereira; orientador Nathalie Cella. -- São Paulo, 2020.
64 p.

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

1. Klotho. 2. Glândulas mamárias. 3. Morfogênese. 4. Whole mount. 5. Cultura tridimensional. I. Cella, Nathalie, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariane Pereira

Titulo da Dissertação/Tese: O papel de klotho na morfogênese e diferenciação da glândula mamária murina

Orientador: Nathalie Cella

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

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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

Of.CEUA.57.2019

São Paulo, 04 de outubro de 2019.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "**Papel de klotho no desenvolvimento da glândula mamária murina**", registrado sob o protocolo nº **101/2015** e aprovado em 04/09/2015, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 04/03/2020**.

Desta forma, autorizamos a extensão de vigência de licença, com a declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, ou inclusão de animais, para continuidade ao referido projeto.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Prof.(a) Dr.(a) **Nathalie Cella**
Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Nathalie Cella pela orientação, dedicação e incentivo;

Aos colegas e amigos do departamento por todo tipo de ajuda, em especial à Ms. Magna Magalhães, que me ensinou tanto quanto pude aprender;

À parceria de tantos laboratórios, em especial aos laboratórios da Prof. Dr. Vanessa Moraes Freitas, do Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger e do Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso, por compartilhar equipamentos, reagentes e expertises;

À minha família por todo tipo de suporte, em especial à minha mãe, que possibilitou minha escolha pela vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 2015/09309-0 - 2015 - e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza”

Marie Curie ^[1]

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 antienvelhecimento, 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.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ilustração esquemática da glândula mamária humana e murina..... | 15 |
| Figura 2. Ilustração esquemática dos 5 pares mamários murinos. | 16 |
| Figura 3. Ilustração esquemática das etapas do desenvolvimento pós natal do epitélio mamário murino. | 17 |
| Figura 4. Animal deficiente em klotho apresenta retardo do crescimento e não desenvolve gônadas funcionais. | 25 |
| Figura 5. Estrutura geral de klotho e seus produtos de clivagem. | 26 |
| Figura 6. Esquema da sinalização de klotho/FGF23 no metabolismo de vitamina D. | 28 |
| Figura 7. Representação estrutural da superfície do complexo FGF23-Klotho-FGFR1. | 29 |
| Figura 8. Klotho inibe a via de insulina e IGF1. | 31 |
| Figura 9. Klotho estabiliza canal TRPV5 na membrana plasmática. | 32 |
| Figura 10. Modelo esquemático dos transplantes realizados. | 38 |
| Figura 11. Animais selvagens e deficientes em klotho divergem quanto ao desenvolvimento ductal a partir da quarta semana. | 42 |
| Figura 12. Klotho é necessária na morfogênese mamária murina em resposta ao estímulo hormonal de estrógeno e progesterona. | 45 |
| Figura 13. A ausência de klotho não altera a espessura dos ductos e do lúmen no tecido epitelial mamário murino. | 46 |
| Figura 14. Klotho atua de forma autônoma na glândula mamária murina. | 49 |
| Figura 15. Klotho é importante no desenvolvimento do epitélio mamário murino. | 50 |
| Figura 16. Marcação com faloidina e anti e-caderina em culturas tridimensionais de células primárias murinas. | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- E+P - Estrógeno e progesterona
- FGF23 - Fator de crescimento fibroblástico 23
- FGFR - Receptor do fator de crescimento fibroblástico
- GH1 - Família das hidrolases glicosidases
- KL - Animal deficiente em klotho
- kl- gene klotho
- MG - Mammary gland
- TEB - Terminal end buds
- TGF - β 1 - Fator de crescimento transformador β 1
- Wnt - Proteína do tipo wingless
- WT - Animal selvagem
- FGF - Fator de crescimento fibroblástico
- GH - Hormônio de crescimento
- IGF1 - Fator de crescimento semelhante a insulina 1
- IR - Receptor de insulina
- TRP - receptor de potencial transiente
- TRPV - receptor de potencial transiente vaniloide
- GH1 - Hidrolases glicosidases 1
- FGFR - Receptor de fator de crescimento fibroblástico
- PI3K - Fosfoinositol 3- kinase
- FOXO - Proteínas forkhead box
- HE - Hematoxilina e Eosina
- PFA – Paraformaldeído

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Desenvolvimento da glândula mamária murina | 16 |
| 1.1.1 Desenvolvimento embrionário | 17 |
| 1.1.2 Desenvolvimento pubertal | 18 |
| 1.1.3 Desenvolvimento reprodutivo | 19 |
| 1.2 Vias reguladas por klotho que têm um papel no desenvolvimento mamário murino | 20 |
| 1.2.1 Papel de Wnt na glândula mamária | 21 |
| 1.2.2 Papel de FGF na glândula mamária | 22 |
| 1.2.3 Papel de insulina e IGF-1 na glândula mamária | 23 |
| 1.2.4. Papel dos canais de cálcio TRPV na glândula mamária | 23 |
| 1.4.5 Implicação dessas vias no câncer de mama | 24 |
| 1.3. Klotho | 25 |
| 1.3.1 Klotho é co-receptor obrigatório para FGF23 | 28 |
| 1.3.2 Klotho é inibidor da via de Wnt | 30 |
| 1.3.3 Klotho inibe a via de insulina/IGF-1 | 30 |
| 1.3.4 Klotho estabiliza o canal de cálcio TRPV5 | 31 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 33 |
| 3 OBJETIVOS | 35 |
| 3.1. Objetivos específicos | 35 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 4.1. Experimentação Animal | 36 |
| 4.2. Injeção de estrógeno e progesterona | 36 |
| 4.3. Whole Mount | 36 |
| 4.4. Preparo dos cortes histológicos para HE | 37 |
| 4.5 Transplante da glândula mamária inteira | 37 |
| 4.6 Transplante de epitélio em <i>cleared fat pad</i> | 37 |
| 4.7 Cultura tridimensional em suspensão de células epiteliais primárias | 38 |
| 4.8 Imunofluorescência dos organoides | 39 |
| 4.9 Análise estatística | 39 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1 Caracterização morfológica da glândula mamária deficiente em klotho | 40 |
| 5.2 Avaliação do papel de klotho na resposta da glândula mamária aos hormônios ovarianos | 43 |
| 5.3 Avaliação do papel autônomo de klotho na glândula mamária | 48 |
| 5.4 Cultura tridimensional de células epiteliais mamárias | 51 |
| 6 CONCLUSÃO | 53 |
| REFERÊNCIAS | 54 |

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].

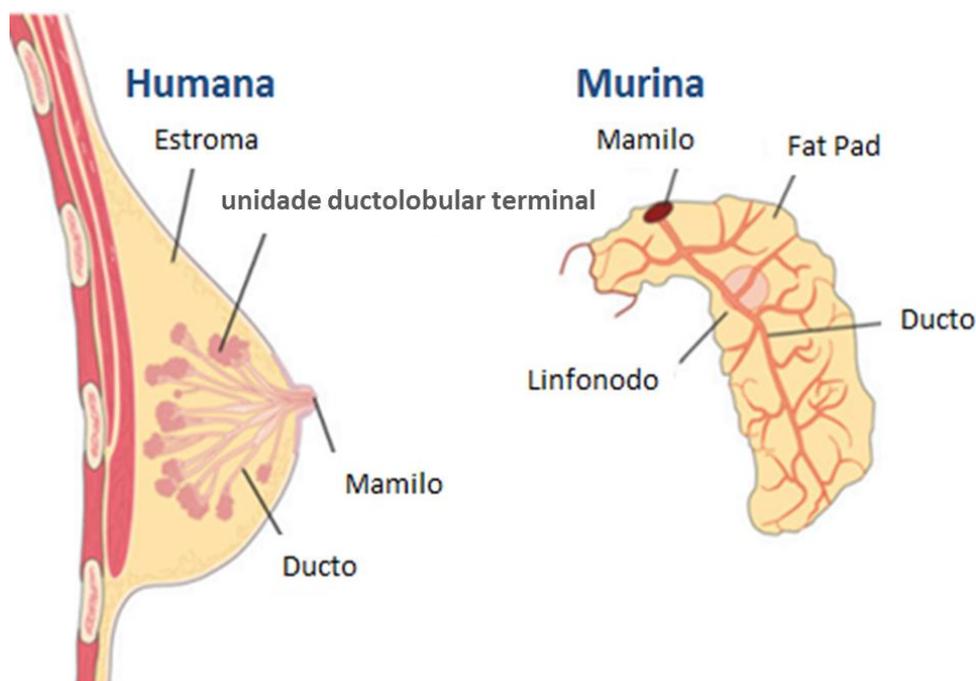


Figura 1. Ilustração esquemática da glândula mamária humana e murina. A imagem representa a glândula mamária humana (esquerda) e murina (direita), mostrando as principais estruturas que as compõe. Modificada de Visvader, et al; 2009 [5].

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.

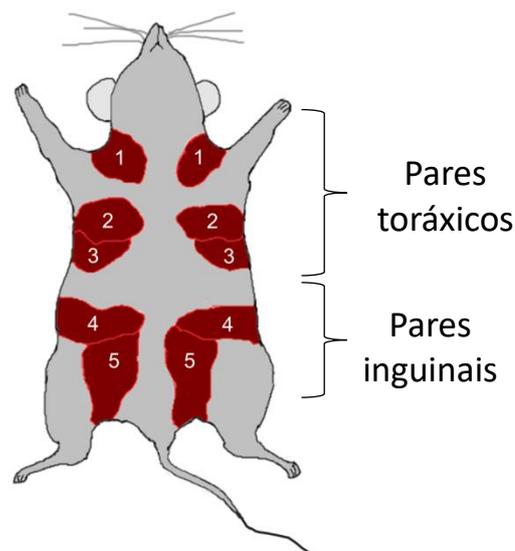


Figura 2. Ilustração esquemática dos 5 pares mamários murinos. O desenho mostra a disposição dos 5 pares de glândula mamária na porção ventral de um camundongo. Modificado de Lin, Chen et al. 2017 [8].

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].

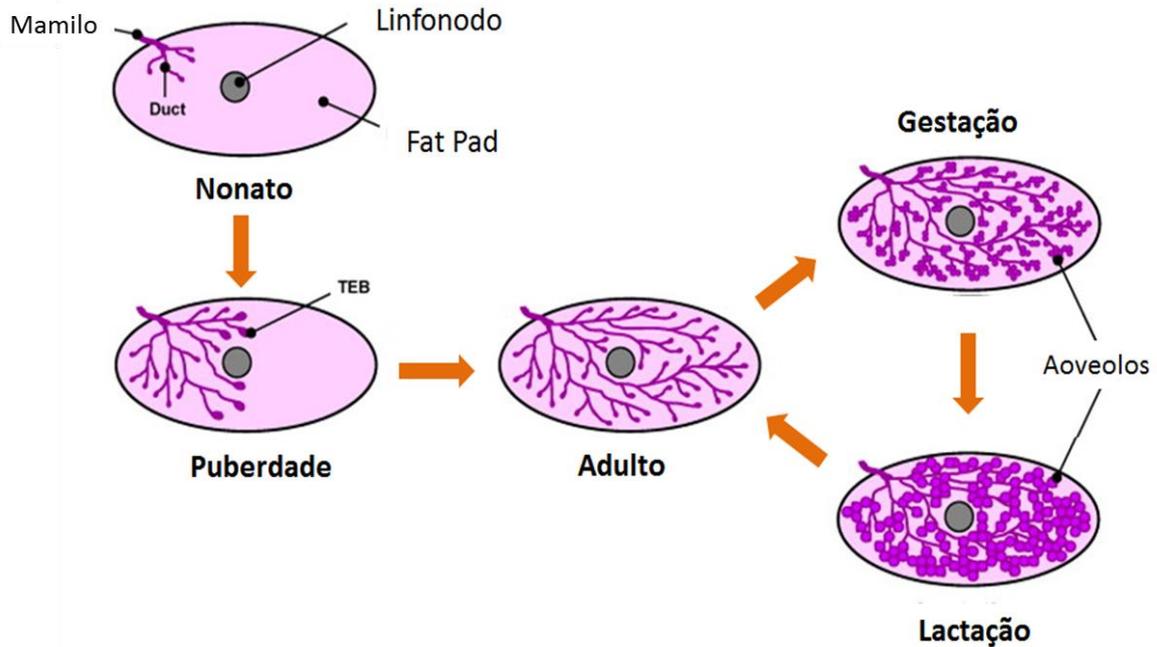


Figura 3. Ilustração esquemática das etapas do desenvolvimento pós natal do epitélio mamário murino. A imagem mostra um esquema representativo da glândula mamária neonatal, púbere, adulta, gestante e lactante. TEB - *terminal end bud*. Modificado de Watson, et al. 2008 [9].

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 estrogênio (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 estrogênio 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].

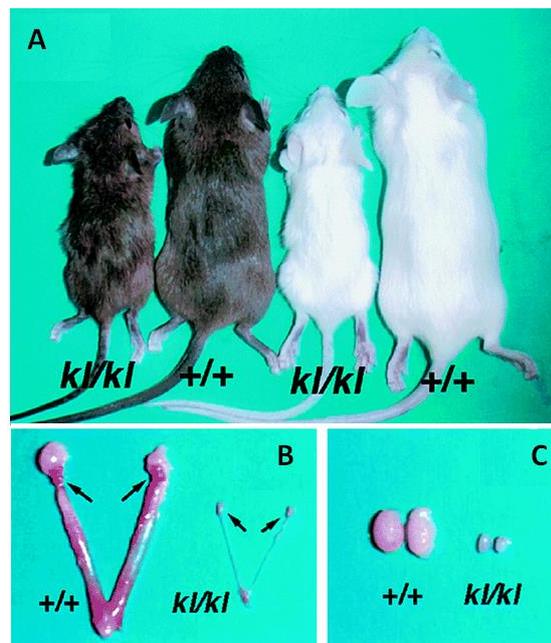


Figura 4 - Animal deficiente em klotho apresenta retardo do crescimento e não desenvolve gônadas funcionais. A- Comparação entre animal deficiente em klotho *kl/kl* e selvagem *+/+*, mostrando retardo do crescimento. O animal *kl/kl* também não desenvolve

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].

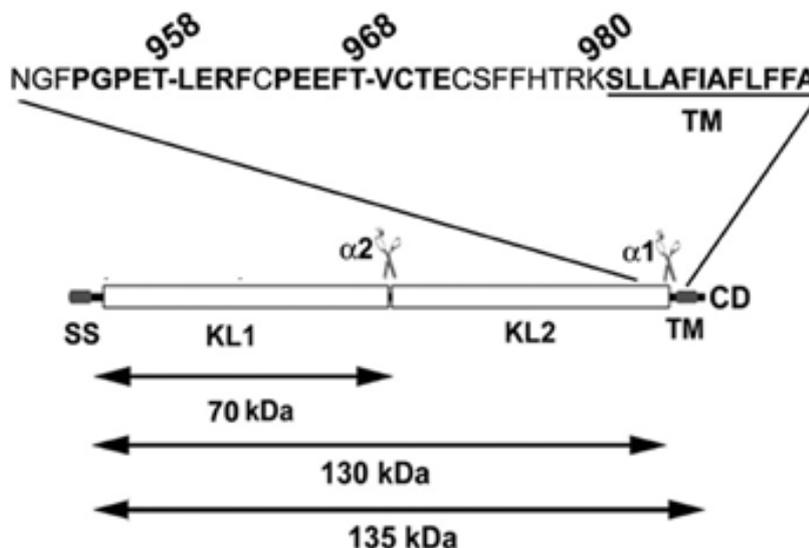


Figura 5. Estrutura geral de klotho e seus produtos de clivagem. Klotho transmembranar apresenta dois domínios extracelulares (KL1 e KL2), uma sequência sinal (SS), um domínio transmembranar (TM) e um domínio citoplasmático (CD). A porção extracelular pode ser clivada nos sítios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (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].

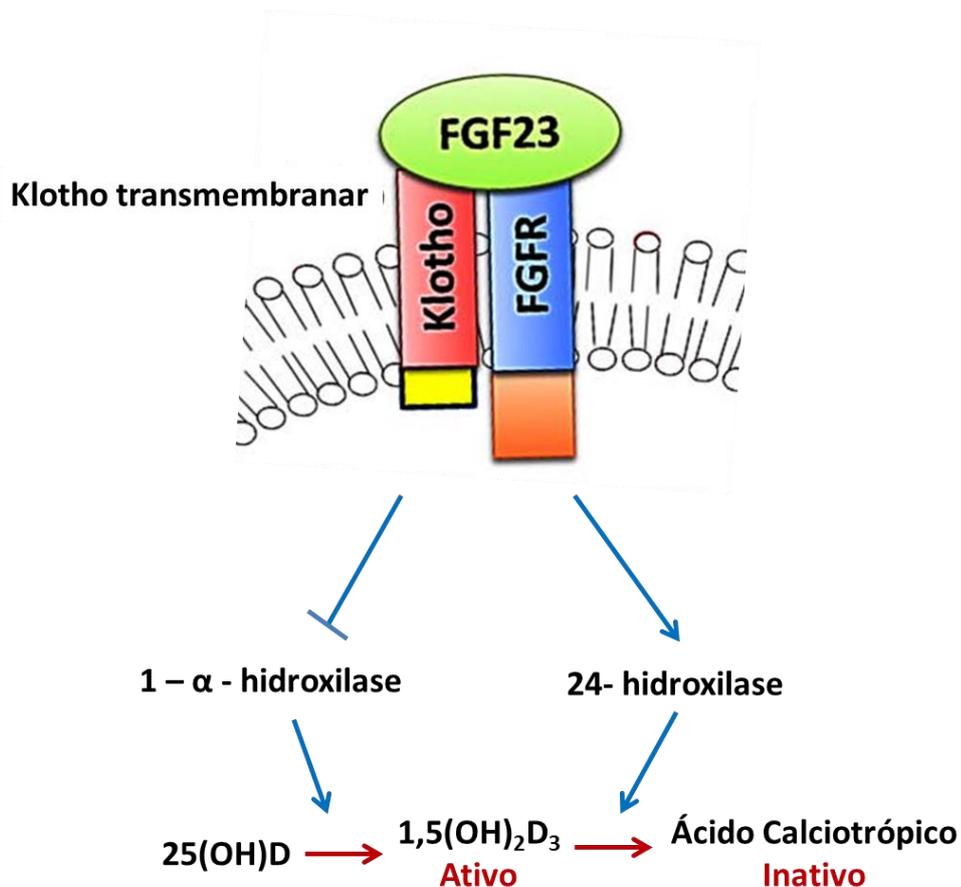


Figura 6. Esquema da sinalização de klotho/FGF23 no metabolismo de vitamina D. A sinalização de klotho/FGF23 reduz os níveis plasmáticos de vitamina D por inibir a expressão de 1 - α - hidroxilase e por induzir 24-hidroxilase. Dessa forma diminui a

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 renal 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].

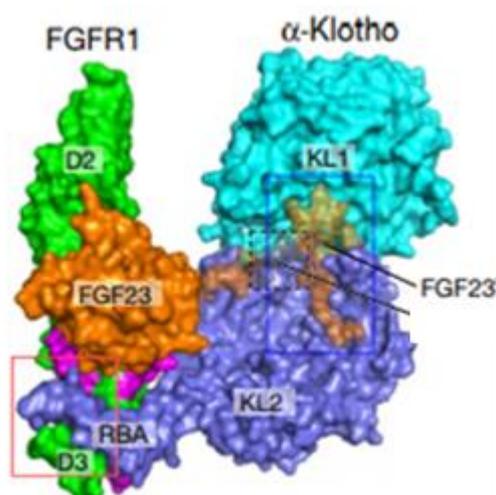


Figura 7. Representação estrutural da superfície do complexo FGF23-Klotho-FGFR1. A imagem baseia-se na cristalografia de raios-X, confirmando a formação do complexo FGF23-Klotho-FGFR1. Adaptado de Chen et al. 2018 [64].

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].

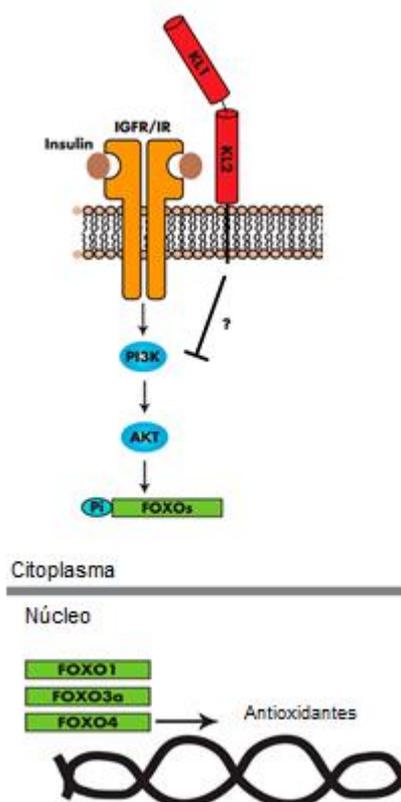


Figura 8. Klotho inibe a via de insulina e IGF1. Klotho inibe a via de insulina e IGF1, sem se ligar diretamente ao seu receptor. A inibição dessa via favorece a ativação das FOXOs, que conferem resistência ao estresse oxidativo. Adaptado de Xu, et al. 2015 [51].

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].

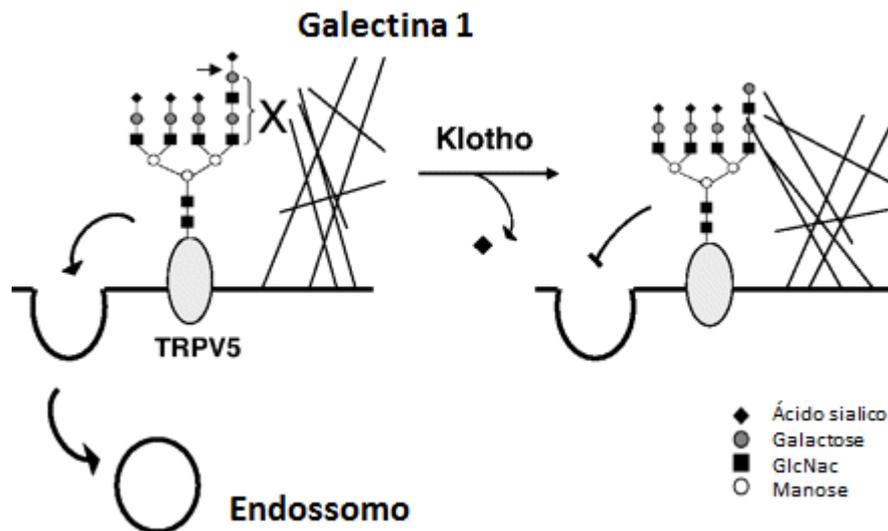


Figura 9. Klotho estabiliza canal TRPV5 na membrana plasmática. Klotho hidrolisa um resíduo de ácido siálico do canal TRPV5 (seta), permitindo a ligação do canal com polímero de galectina -1 e conseqüentemente retardando sua endocitose. Modificado de Che, et al. 2008 [76].

2 Justificativa

As vias acima descritas estão entre as muitas vias que regulam o desenvolvimento normal da glândula mamária e que são frequentemente associadas com sua progressão tumoral [4, 29]. Assim, torna-se interessante encontrar e estudar moléculas que as regulem simultaneamente, buscando uma melhor compreensão do desenvolvimento da glândula mamária e possivelmente um novo alvo terapêutico.

Nesse contexto, o estudo do papel de klotho na glândula mamária torna-se relevante, pois a interação de Klotho com essas vias [51, 4] levanta a hipótese de que klotho possa ter um papel importante no órgão. Além disso, alguns estudos mostram evidências de que klotho é um supressor do câncer de mama [45, 78].

Foi mostrada uma alta expressão de klotho em células provenientes de glândula mamária humana saudável e expressão de klotho diminuída em parte das células tumorais mamárias provenientes de pacientes, principalmente em tumor com perfil invasivo. Ainda, células provenientes de tumor invasivo que apresentavam uma maior expressão de klotho tinham uma menor taxa de proliferação do que não expressavam klotho em grande quantidade [45].

Um mecanismo mostrado para o silenciamento de klotho em tumores mamários é a alteração epigenética de seu promotor. Em 1/3 das células tumorais provenientes de pacientes e em diversas linhagens celulares tumorais (MCF-7, MDA-MB-231, Hs578T, T47D, and BT474) foi mostrado que há metilação na região promotora do gene klotho. Não foi observada metilação em células provenientes de glândula saudável ou de linhagem mamária não tumoral. Essa metilação ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral e é condizente com uma diminuição de mRNA para klotho, sugerindo que a supressão de klotho na célula é um evento precoce na tumorigênese mamária [79].

Em cultura de células de tumor mamário MCF-7 e MDA-MB-231, foi visto que a maior expressão de klotho ou o tratamento com klotho solúvel aumenta a transcrição de um gene supressor de tumor: o da proteína de ligação ao intensificador de sinal CCAAT β . Isso ocorre por meio da inibição de IGF-1 e, em células extraídas de tumor mamário humano, klotho aumenta a ativação da via de FGF [45].

Sabe-se que mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 aumentam o risco para câncer de mama, porém, mesmo em indivíduos com a mesma mutação, a

penetrância do surgimento de tumor varia, indicando que outros fatores regulam o risco de desenvolvimento tumoral nesses indivíduos. Klotho possui uma forma variante, que difere da klotho selvagem em seis sequências e que tem uma atividade enzimática diminuída. Essa forma variante de klotho foi mostrada como um dos fatores que modificam o risco de câncer de mama para indivíduos com mutação para BRCA1 e BRCA2. O animal heterozigoto para klotho variante tem o risco para câncer mama e para seu aparecimento precoce aumentado, se comparado ao animal homozigoto para klotho selvagem [80].

Esses dados indicam que klotho tem importante papel no desenvolvimento da glândula mamária e na sua tumorigênese, portanto seu estudo traz perspectivas para um novo alvo terapêutico para o câncer de mama. Apesar disso, o papel de klotho na glândula mamária nunca foi estudado. Assim, o objetivo deste trabalho foi trazer uma compreensão inicial de seu papel na morfogênese e diferenciação da glândula mamária murina.

3 Objetivo

Investigar o papel de klotho no desenvolvimento pós-natal da glândula mamária murina utilizando animais deficientes nessa proteína como modelo.

3.1 Objetivos específicos

- I- Fazer a caracterização morfológica da glândula mamária murina deficiente em klotho;
- II- Investigar o papel de klotho na resposta do epitélio mamário ao estímulo proliferativo de estrógeno e progesterona;
- III- Avaliar o papel autônomo de klotho na glândula mamária e
- IV- Investigar o papel de klotho na morfogênese de organóides de células primárias cultivadas em meio tridimensional.

4 Materiais e Métodos

4.1 Experimentação Animal

Os animais transgênicos foram cedidos pelo Dr Makoto Kuro-O, do Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Japão. Esses animais foram gerados através da inserção de um transgene de 8 kb no locus de *klotho*, na região 5' do gene. Portanto, esses animais não são knockout para *klotho*, mas sim “severamente hipomorfos”. A deleção de *klotho* especificamente no rim resulta em animais idênticos aos hipomórficos utilizados nesse estudo, indicando que o *klotho* expresso por esse órgão é o principal responsável pelo fenótipo observado nesses animais [81, 82]. O fenótipo só é observado nos homozigotos, heterozigotos são idênticos aos selvagens [50]. Os animais deficientes em *klotho* são inférteis. Portanto, os animais utilizados nesse estudo foram gerados pelo acasamento entre animais heterozigotos. Os animais foram mantidos em salas com luz (ciclos de 12 horas claro e escuro) e temperatura (23 °C) controladas. A dissecação da glândula mamária foi realizada após a eutanásia em câmara de CO₂.

4.2 Injeção de estrógeno e progesterona

A injeção hormonal foi feita por 9 dias, iniciando-se após o desmame. Foi utilizada injeção subcutânea de 1ng de progesterona (Abcan: ab141252) e 1µg de 17b-estradiol (Abcan: ab1206570) aplicada no dorso do animal. Utilizou-se como veículo álcool etílico absoluto. Como controle animais da mesma idade foram injetados somente com o veículo pelo mesmo período.

4.3 Whole Mount

Os ensaios de whole mount seguiram o protocolo fornecido pelo Bissell Lab [83]. A glândula mamária do 4o par foi extraída a partir do mamilo e estirada em lâmina de vidro, sendo exposta ao ar por 5 min para secagem. A fixação foi feita em solução de Carnoy overnight. Posteriormente o tecido foi corado em Carmim Alum, descorado em solução de ácido clorídrico 2% em etanol 70% e desidratada e desengordurada em xilol absoluto.

As imagens foram obtidas em estereomicroscópio (Axiozoo v16). A quantificação dos ductos foi feita com o software ImageJ, pela medida em pixels da área ocupada pela árvore ductal e da área total ocupada pelo fat pad.

4.4 Preparo dos cortes histológicos para HE

Para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), o tecido extraído foi fixado em paraformaldeído 4% e processado para emblocamento em parafina. Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo na espessura de 5µm.

4.5 Transplante da glândula mamária inteira

30 minutos antes da cirurgia, foi injetado analgésico/antiinflamatório subcutâneo (cetoprofeno 0,5 mg/kg). O animal receptor foi então anestesiado com Avertin (25µL/Kg) e posicionado em placa rígida na posição decúbito dorsal. A pele foi cortada na região em volta do mamilo e a glândula mamária inteira (epitélio e estroma) foi puxada pelo corte e extraída por completo. Uma glândula mamária recém extraída de animal deficiente em klotho ou selvagem foi então introduzida por essa cavidade e esticada com auxílio de pinças, na região correspondente ao quarto par recém extraído (Figura 10, A). Foi realizado tratamento com analgésico por injeção subcutânea (cetoprofeno 05 mg/kg) durante os dois dias que seguem a cirurgia e o animal transplantado foi mantido por 5 semanas após o procedimento .

4.6 Transplante de epitélio em *cleared fat pad*

30 minutos antes da cirurgia, foi injetado analgésico/antiinflamatório subcutâneo (cetoprofeno 05 mg/kg). O animal receptor foi então anestesiado com Avertin (25µL/Kg) e posicionado em placa rígida na posição decúbito dorsal. A pele foi cortada na região em volta do mamilo e a glândula mamária puxada pelo corte até que seja possível visualizar o linfonodo. Foi feita então o corte da parte proximal da glândula mamária (da região que compreende do linfonodo até o mamilo), deixando o restante do fat pad no local. Um fragmento correspondente a porção epitelial da glândula recém-dissecada de um animal deficiente em klotho ou selvagem foi transplantado em uma cavidade feita no *cleared fat pad* (Figura 10, B).

Foi realizado tratamento com analgésico por injeção subcutânea (cetoprofeno 05 mg/kg) durante os dois dias que seguem a cirurgia e o animal transplantado foi mantido por 4 semanas após o procedimento.

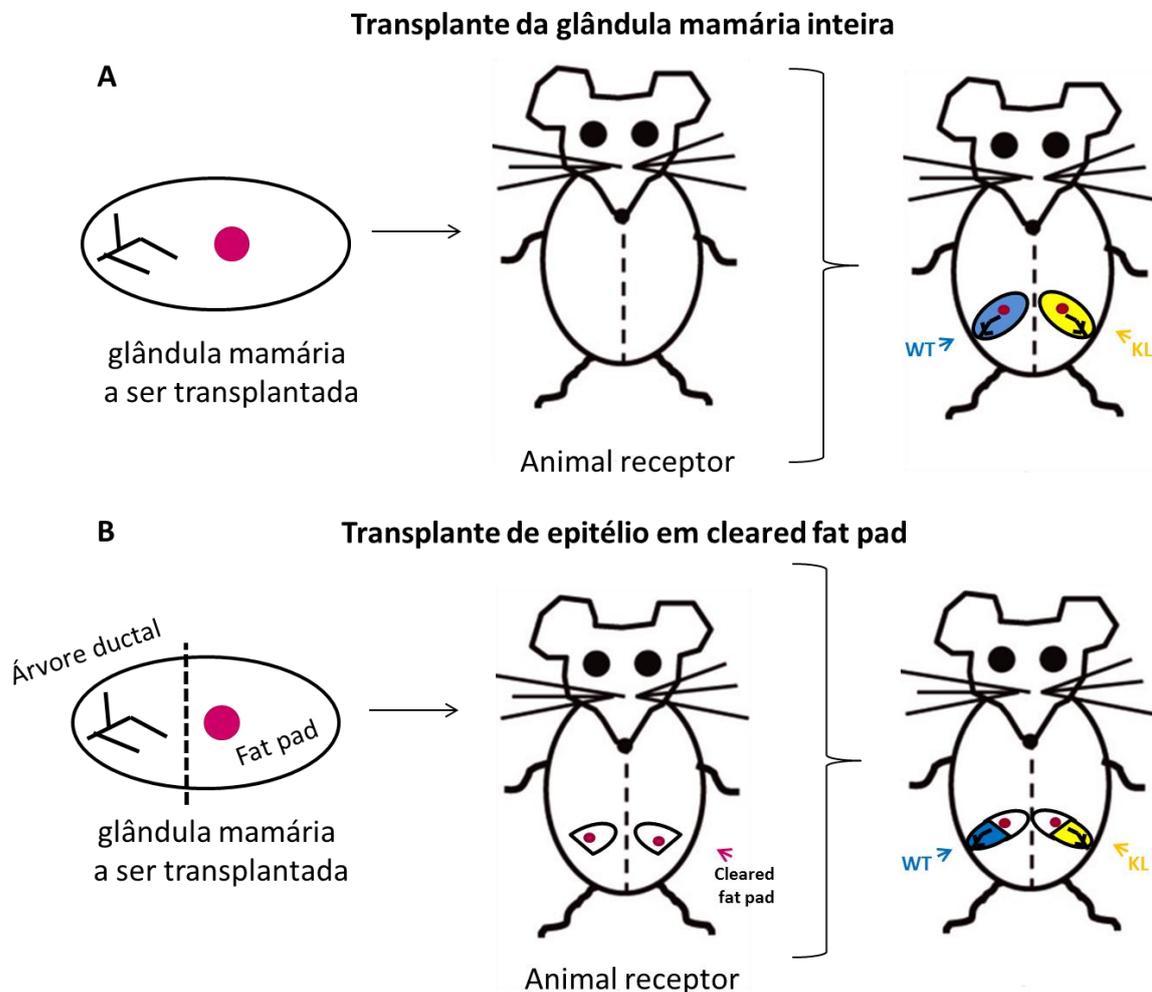


Figura 10. Modelo esquemático dos transplantes realizados. A – Transplante da glândula mamária inteira. Foi transplantado a glândula mamária inteira de animal selvagem (WT) ou deficiente em klotho (KL) no animal mastectomizado. B- Transplante de epitélio em *cleared fat pad*. O epitélio da glândula mamária WT ou KL foi transplantado em *cleared fat pad*. O círculo cor de rosa representa o linfonodo da glândula.

4.7 Cultura tridimensional em suspensão de células epiteliais primárias

A cultura tridimensional foi feita seguindo o protocolo de Bissel, et al ^[84]. As glândulas mamárias foram extraídas do animal eutanasiado após 9 dias de injeção

com E+P. As glândulas foram picadas com auxílio de bisturi e submetidas à digestão em solução de colagenase 1%. Após digestão, foi feita centrifugação diferencial, a fim de obter apenas grumos de células epiteliais. Esses grumos foram colocados para agregar em suspensão em placas de 35 mm recobertas com poly-hema contendo 1,5mL de DMEM/F12 enriquecido com soro fetal bovino e Insulin, Transferrin, Sodium (ITS). Após 48h o meio foi acrescido de 2% matrigel para indução da formação dos organoides.

4.8 Imunofluorescência dos organoides

As placas contendo as culturas tridimensionais foram mantidas no gelo por 15 min. Os organoides foram então separados do meio por centrifugação em tubo de 15mL e ressuspensos em 1mL de PBS. Em uma lâmina silanizada foram demarcados espaços de 1 cm² utilizando-se caneta hidrofóbica PAP pen. A suspensão de organoides em PBS foi espalhada nesses espaços e deixada em estufa à 37°C até secar. Os organoides foram fixados com PFA 4% por 20 minutos, lavados em PBS glicina 0,5M. O bloqueio foi feito por 1 hora com solução de BSA 5% e tween 0,1% em PBS. Foi incubado o anticorpo primário, anti - E-caderina (Santa Cruz – sc7870) overnight, em solução de bloqueio, ou foi feita a incubação com faloidina, em solução de bloqueio, por 1h. Utilizou-se secundário anti-Rabbit Alexa 568, por 1 hora, a temperatura ambiente. Após lavagem do anticorpo secundário, os organoites foram incubados com DAPI 1/5000 por 5 min, e montados em meio Prolong Gold Antifade Mountant (Life technologies).

4.9 Análise estatística

Todos os gráficos e as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 6. Em todas as comparações foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica da glândula mamária deficiente em klotho

Buscamos inicialmente caracterizar a morfologia da glândula mamária deficiente em klotho, em comparação com a do animal selvagem em desenvolvimento. Como os animais deficientes em klotho morrem precocemente ^[50] (por volta da oitava semana de vida), essa análise limitou-se do período pré-púbere ao final da puberdade. Para isso, foi feita a extração e whole mount da glândula mamária do quarto par proveniente de animais deficientes em klotho (KL) e selvagens (WT), em diferentes etapas do desenvolvimento mamário, sendo: pré-púbere (3 semanas), púbere (4 semanas) e virgem adulta (8 semanas) (Figura 11). Uma vez que o desenvolvimento mamário na puberdade se dá pela extensão e ramificação do epitélio mamário até o preenchimento do fat pad ^[4], foi medida a área ocupada pelo estroma e pela árvore ductal em cada fase. Obteve-se, a partir dessas medidas, a porcentagem de ocupação do estroma pelo epitélio como parâmetro para comparar o desenvolvimento mamário.

A literatura mostra que os animais KL e selvagens são idênticos até a puberdade ^[50]. No entanto, esse estudo não avaliou a glândula mamária. De fato, nota-se que as glândulas são semelhantes no animal de 3 semanas (Figura 11, A e B), sendo que o epitélio da glândula WT ocupou 7,69% do estroma, enquanto o KL teve uma ocupação de 11,99%, diferindo portanto em 0.64 vezes quanto a porcentagem de ocupação (Figura 11, G).

Entre a terceira e quarta semana de vida, se dá o início da puberdade murina e conseqüentemente a morfogênese mamária pós-natal. O epitélio mamário, em resposta aos hormônios ovarianos, passa a proliferar, ocupando o estroma ^[3]. Assim, na glândula mamária do animal WT com 4 semanas, pode-se observar a expansão do epitélio, que passa a ocupar 23,68% do fat pad (Figura 11, C e G). Esse aumento da árvore epitelial, porém, não é observado no animal KL (Figura 11, D e G), que começa a divergir do animal WT. A porcentagem de ocupação epitelial do animal KL permanece semelhante à pré-púbere, ocupando apenas 8,36% do estroma mamário (Figura 11, G), sendo portanto 2,83 vezes menor que a porcentagem de ocupação do animal selvagem.

Ao término da puberdade, o epitélio se estende por todo o fat pad, como pode-se notar no animal WT de 8 semanas, em que a área ocupada pela árvore ductal é a mesma que a área do fat pad (Figura 11, E e G). No animal adulto, a diferença entre os animais WT e KL fica mais evidente, sendo que a porcentagem de ocupação do animal WT é 39,82 vezes maior que a porcentagem preenchida pelo tecido epitelial do animal KL, que é de apenas 2,51% (Figura 11, G).

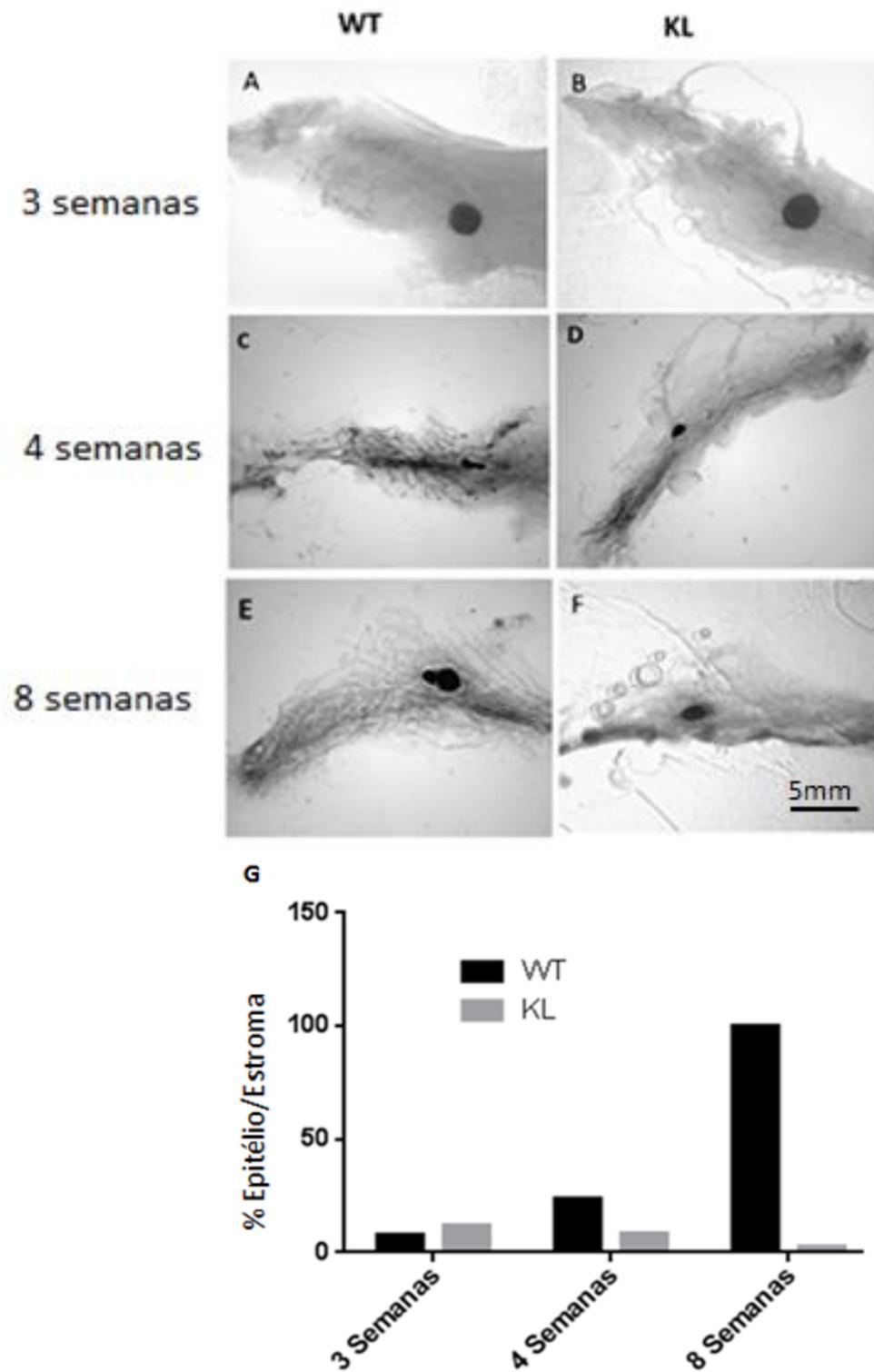


Figura 11. Animais selvagens e deficientes em klotho divergem quanto ao desenvolvimento ductal a partir da quarta semana. Comparação entre whole mounts de animais selvagens (WT) e deficientes em klotho (KL), com 3 (A e B), 4 (C e D) e 8 (E e F)

semanas de idade. A proporção entre tecido epitelial e estroma é maior no animal WT a partir da quarta semana (n=1). A barra de escala representa 5 mm.

Esses dados sugerem que klotho tem uma função autônoma ou não autônoma (ou, possivelmente, ambas) no desenvolvimento da glândula mamária murina, uma vez que o tecido epitelial mamário do animal deficiente em klotho se mostrou incapaz de preencher o fat pad durante a puberdade. Ainda, o fato da diferença entre a glândula KL e a WT só ser observada após a puberdade sugere um possível papel de klotho na resposta do epitélio mamário aos hormônios ovarianos.

É interessante notar que, enquanto a porcentagem de ocupação do estroma pelo epitélio do animal WT cresce ao longo do seu desenvolvimento, a mesma medida diminui no animal KL. Essa diferença poderia ser explicada por um crescimento do fat pad que não é acompanhado pelo crescimento epitelial do animal deficiente em klotho, sugerindo que klotho não é necessário para o crescimento do estroma mamário. Porém, esse dado ainda não pôde ser avaliado estatisticamente, portanto tal diferença pode ser devida à variação natural entre os indivíduos.

5.2 Avaliação do papel de klotho na resposta da glândula mamária aos hormônios ovarianos

O animal deficiente em klotho não apresenta gônadas funcionais e, portanto, não possui os hormônios ovarianos requeridos para o desenvolvimento da glândula mamária durante a puberdade ^[50]. Não se sabe, portanto, se a incapacidade do tecido epitelial em preencher o fat pad mostrada anteriormente (Figura 9), é exclusivamente devida à falta do estímulo hormonal, ou seja, não se sabe se a glândula mamária deficiente em klotho seria capaz de responder ao estímulo proliferativo de estrógeno e progesterona caso ele estivesse presente.

Para avaliar sua capacidade de resposta, animais WT e KL foram injetados diariamente, durante 9 dias, com estrógeno e progesterona (E+P) em dose suprafisiológica ou apenas com veículo, etanol absoluto. Após esse período, o animal foi eutanasiado e a glândula mamária do quarto par foi extraída e processada para whole mount (Figura 12) ou emblocada em parafina para corte histológico (Figura 13).

Foi medida então a porcentagem do estroma ocupada pelo tecido epitelial em cada amostra (Figura 12, B). Ao comparar a glândula KL injetada com E+P como seu controle negativo, injetado apenas com etanol, pode-se notar que houve um aumento na porcentagem do estroma ocupada pelo tecido epitelial. Esse dado mostra que a glândula mamária deficiente em klotho é capaz de responder ao estímulo proliferativo de estrógeno e progesterona, expandindo seu epitélio.

Nota-se, porém, uma diferença acentuada quando a glândula KL injetada com E+P é comparada à glândula WT tratada com E+P. A glândula mamária deficiente em klotho apresenta claramente um atraso no desenvolvimento da sua árvore ductal. Enquanto, no animal WT, a porcentagem média de ocupação do estroma foi de 41%, no animal KL esse valor foi de apenas 18% (Figura 12, B).

Ainda, notamos que a morfologia dos ductos formados no animal deficiente em klotho difere visivelmente dos ductos selvagens, apresentando-se mais ramificados e com terminais mais dilatados. Para confirmar essa diferença, medimos o número de ramificações por comprimento ductal (Figura 12, C) e a área dos TEBs (figura 12, D).

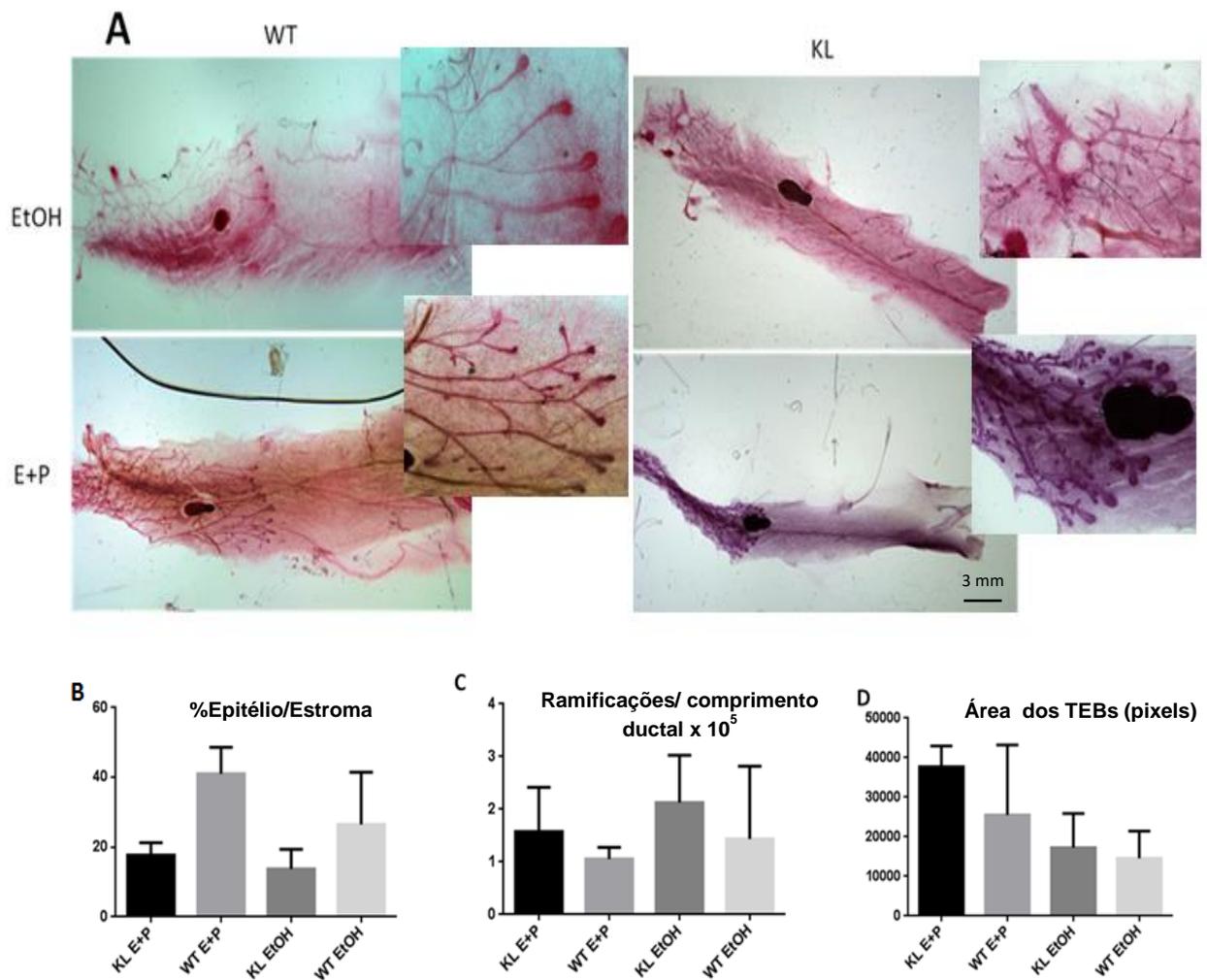


Figura 12. Klotho é necessária na morfogênese mamária murina em resposta ao estímulo hormonal de estrógeno e progesterona. Foram comparados whole mounts de animais selvagens (WT) e deficientes em klotho (KL) após nove dias de injeção subcutânea de estrógeno e progesterona (E+P) ou controle, injetado apenas com veículo (etanol). O animal KL apresentou um atraso no crescimento dos ductos, com dutos mais ramificados e TEBs maiores (KL e WT E+P, n=3; KL e WT EtOH, n=2). A barra de escala representa 3 mm.

Para quantificar o número de ramificação, utilizou-se como base 3 ramos representativos de cada whole mount, sendo medido, em cada whole mount, o comprimento dos 3 ramos selecionados e a quantidade de ramificações secundárias em cada um desses ramos, obtendo-se assim uma razão de ramificações por comprimento (Figura 12, C). Apesar da diferença aparente entre as glândulas WT e KL coletadas, a variação entre indivíduos se mostrou bastante acentuada, por isso esse parâmetro não teve diferença significativa para o número amostral obtido.

A área dos terminais ductais, TEBs, também foi medida, através do perímetro de todos os TEBs encontrados em cada whole mount (Figura 12, D). De forma semelhante à medida anterior, a variação não foi significativa, embora visualmente perceptível.

Comparamos então os ductos mamários do animal selvagem e deficiente em klotho quanto à espessura dos ductos e à área da luz do lúmen. Para essas medidas, utilizamos cortes histológicos corados com HE (Figura 13). Foram considerados apenas os ductos em corte transversal para ambas as medidas.

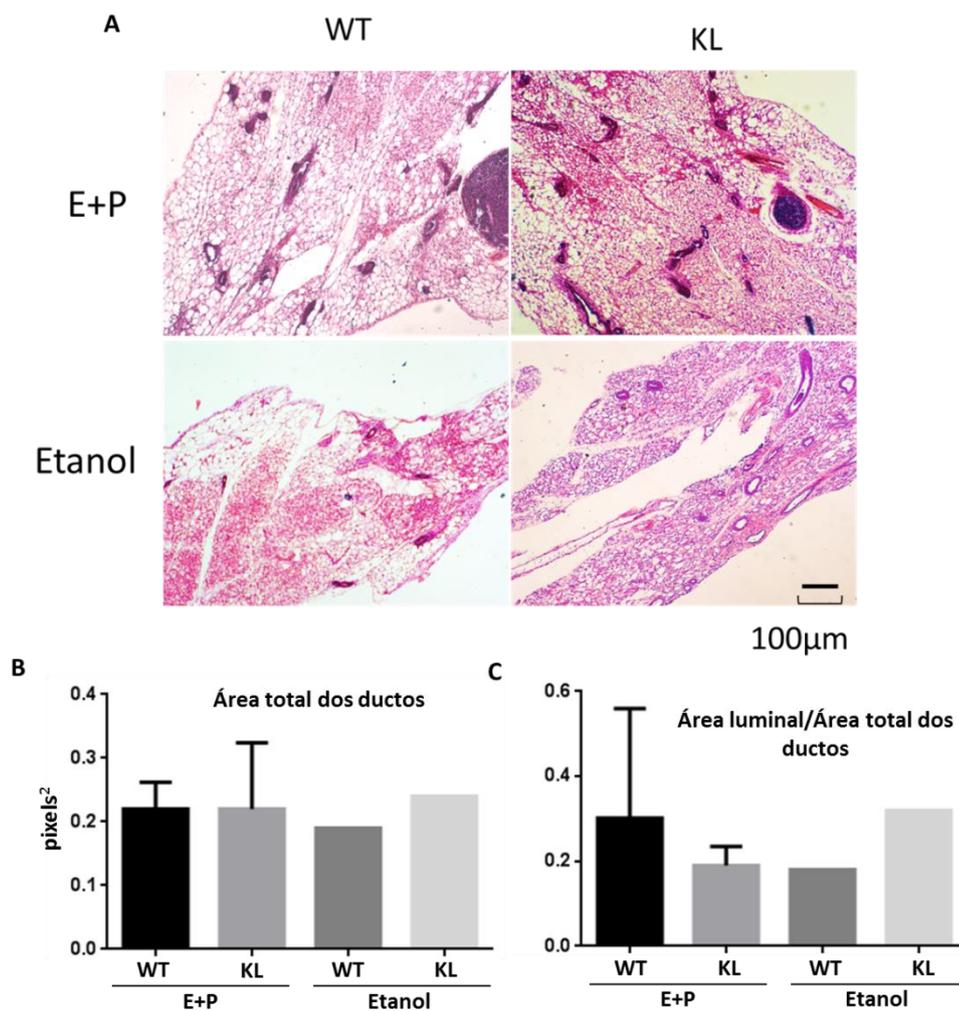


Figura 13. A ausência de klotho não altera a espessura dos ductos e do lúmen no tecido epitelial mamário murino. Foram feitos cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais selvagens (WT) e deficientes em klotho (KL) injetados com estrógeno e progesterona (E+P) ou veículo (Etanol) - A. Medida da área total, em pixels, dos ductos em corte transversal - B. Razão entre a área luminal e a área total dos

ductos - C. Variação não significativa para essas medidas (WT E+P, n=6; KL E+P, n=5; WT e KL etanol, n=1). A barra de escala representa 100 μ m.

Não notamos diferença significativa quanto à espessura ductal do animal deficiente em klotho, quando comparado com selvagem (Figura 13, B), bem como da luz dos lúmens em relação à área ductal total (Figura 13, C). Pode-se notar, pelo gráfico, que há uma grande variação entre os indivíduos medidos, que pode ser, em parte, uma limitação da técnica, uma vez que não podemos precisar em que altura da árvore ductal os cortes histológicos foram feitos.

Embora não tenham alcançado significância estatística, os dados sugerem que klotho tem um papel autônomo ou não autônomo no desenvolvimento da árvore epitelial mamária murina em resposta aos hormônios ovarianos, possivelmente atuando na extensão, ramificação e formação dos TEBs

Estudo anterior verificou que fêmeas deficientes em klotho têm níveis séricos de progesterona elevados, em comparação aos animais selvagens, por razão desconhecida [85]. Isso sugere que a deficiência no desenvolvimento da glândula mamária na puberdade se deve primariamente a ausência de estrógeno. Esse fato não é totalmente inesperado, uma vez que estrógeno é essencial na expressão do receptor de progesterona [86]. Dada a complexidade da rede de fatores parácrinos regulados pelos hormônios ovarianos na glândula mamária, klotho poderia estar interferindo na resposta a esses hormônios indiretamente, comprometendo, por exemplo, as vias de FGF e Wnt, sabidamente orquestradas por esses hormônios.

Klotho circulante é transferido da membrana apical para a basal do epitélio renal através de transcitose [87]. Essa observação sugere que klotho tenha ampla distribuição espacial e que poderia assim modular as interações parácrinas através de vários mecanismos.

Quanto à sua função não autônoma, é difícil especular sobre o mecanismo, uma vez que esses animais apresentam inúmeras alterações de ordem metabólica e hormonal [50,51]. A ausência de ovários funcionais em fêmeas deficientes em klotho se deve a um papel não autônomo de klotho, pois quando esses ovários foram transplantados em fêmeas selvagens, essas foram capazes de engravidar. Nesse caso, foi demonstrado que klotho interfere no eixo pituitário-hipotalâmico, comprometendo a produção/secreção de gonadotropinas [88].

5.3 Avaliação do papel autônomo de klotho na glândula mamária

Os dados apresentados até aqui sustentam a hipótese de que klotho tem um papel no desenvolvimento da glândula mamária murina, porém, pelos dados obtidos não é possível determinar se o papel de klotho nesse órgão é autônomo ou se ocorre de forma indireta, devido às diversas alterações do animal deficiente em klotho.

Para avaliar se a ação de klotho é intrínseca à glândula mamária ou devida exclusivamente a um efeito sistêmico, foram utilizadas duas abordagens diferentes de transplante da glândula mamária deficiente em klotho em animal selvagem.

Na primeira abordagem experimental, retiramos por completo, através do mamilo, ambas as glândulas mamárias do quarto par do animal selvagem receptor. No espaço correspondente ao quarto par, foi transplantada a glândula mamária completa extraída de um animal KL e contralateralmente a glândula mamária extraída de um animal WT. Tanto o animal receptor, quanto os animais doadores tinham entre 3 e 4 semanas, idade em que não há diferença entre as glândulas mamárias WT e KL.

Após o transplante, os animais receptores foram mantidos por 5 semanas, tempo necessário para o fat pad da glândula transplantada ser preenchido pelo tecido epitelial. O animal receptor foi então eutanasiado e as glândulas transplantadas foram extraídas e preparadas para whole mount (Figura 14).

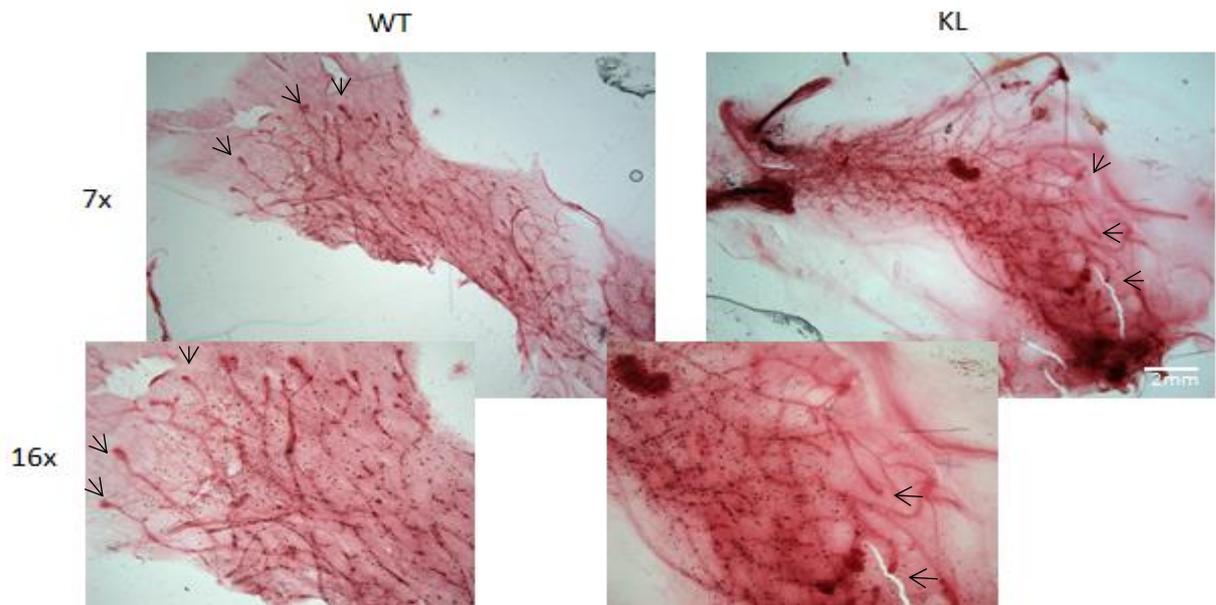


Figura 14. Klotho atua de forma autônoma na glândula mamária murina. Whole mount de glândula mamária proveniente de animal selvagem (WT) ou deficiente em klotho (KL) após 5 semanas de transplante em animal WT, pré-púbere, mastectomizado. A glândula mamária KL apresenta mais ramificações laterais e terminais mais dilatados (setas) (n=1). Barra de escala representa 2 mm.

Nota-se que ambas as glândulas mamárias foram capazes de preencher o fat pad, não havendo diferença quanto à extensão ductal. No entanto observa-se que, na glândula mamária KL, os ductos apresentam-se mais ramificados e com terminais mais dilatados (Figura 14, setas), fenótipo semelhante ao observado no camundongo KL injetado com E+P.

Este dado sugere que klotho exerce um papel autônomo na glândula mamária murina. Uma vez que a glândula deficiente em klotho foi transplantada por inteiro, não podemos, por essa abordagem, identificar se klotho atua no tecido epitelial, no estroma ou em ambos.

DeOme et al, 1959 padronizou a técnica de transplante do epitélio mamário de um animal doador no fat pad receptor livre do epitélio endógeno, o chamado *cleared fat pad* [89]. Utilizamos portanto essa técnica para investigar se klotho atua no epitélio mamário murino. Utilizamos animais no início da puberdade, portanto, retiramos a parte da glândula mamária que compreende do mamilo ao linfonodo, garantindo assim a remoção completa da árvore ductal endógena, conforme esquematizado na Figura 9. No estroma (*cleared fat pad*), foi transplantada a parte

epitelial extraída do animal doador KL ou WT. Após 4 semanas, as glândulas transplantadas foram extraídas e preparadas para whole mount (Figura 15).

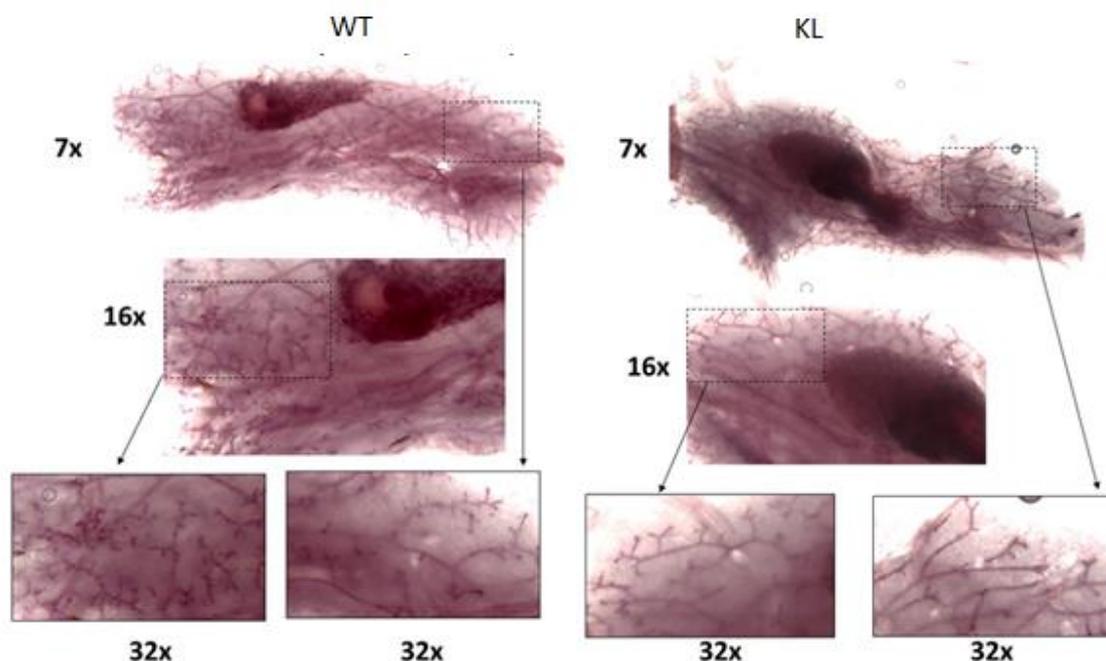


Figura 15. Klotho é importante no desenvolvimento do epitélio mamário murino. Whole mount de transplante da porção epitelial da glândula mamária proveniente de animal selvagem (WT) ou deficiente em klotho (KL) após 4 semanas de transplante em *cleared fat pad* de animal WT, pré-púbere. O transplante proveniente de animal KL apresenta-se menos ramificados e com terminais mais dilatados (n=1).

Novamente, em ambos os transplantes, o tecido epitelial foi capaz de preencher todo do estroma, sugerindo que a ação de klotho não é autônoma no órgão, no que se refere à extensão do epitélio. Observamos que mais uma vez o fenótipo dos ductos difere: KL apresenta terminais mais dilatados, de forma semelhante ao observado quando a glândula foi transplantada por inteiro.

Curiosamente, ao contrário dos resultados anteriores, a glândula transplantada com epitélio KL mostra-se com menos ramificações que a transplantada com epitélio WT.

A partir desta observação, podemos levantar a hipótese de que a ramificação exacerbada da glândula mamária deficiente em klotho se deve a algum possível papel de klotho no fat pad. Ainda, sabe-se que, a cada ciclo estral, a glândula mamária sofre um estímulo proliferativo, que leva ao aumento temporário das

ramificações terciárias ^[90]. Assim, outra hipótese seria de que o epitélio deficiente em klotho não responde a essa flutuação hormonal, não formando ramificações terciárias da mesma forma que o epitélio WT.

Mais análises são necessárias para uma melhor compreensão da atuação autônoma de klotho na glândula mamária, apesar disso, os dados observados sugerem que klotho é importante no desenvolvimento do epitélio mamário murino na puberdade.

5.4 Cultura tridimensional de células epiteliais mamárias

A baixa expectativa de vida dos camundongos deficientes em klotho e a falta de gônadas funcionais ^[50] torna desafiador o estudo da glândula mamária desses animais. Buscamos então padronizar a cultura tridimensional das células primárias provenientes dos animais WT e KI, a fim de ter um novo modelo para investigar o papel de klotho na morfogênese *in vitro* de organoides mamários e inferir o mecanismo envolvido.

Após expansão das células epiteliais, por meio de 9 dias de injeção subcutânea com E+P, as glândulas mamárias foram coletadas e as células epiteliais separadas por centrifugação de forma que, ao final do processo, tinha-se uma suspensão de pequenos grumos de células epiteliais. Esses grumos formaram agregados maiores, após 48 horas em suspensão, e foram então colocados em meio contendo 2% de matrigel, a fim de formar organoides.

Os organoides foram fixados em lâmina e corados com DAPI (Figura 16, A', B', C', D') e faloidina (Figura 16, A'' e B''). A expressão e padrão de localização de E-caderina foi avaliado por imunofluorescência (Figura 16, C'' e D''), permitindo a visualização da morfologia dos organoides formados. Notamos que os organoides provenientes das células deficientes em klotho tinham pouca resistência, não mantendo a coesão durante o manuseio para fixação e imunofluorescência. Esse fenótipo pode ser observado pela marcação mais dispersa e menos circular dos organoides derivados de células KL, quando comparadas aos organoides WT, que mostram uma marcação bem definida nos limites celulares.

Esse dado sugere que, em cultura primária tridimensional em suspensão, klotho tem um papel nos fatores de interação célula- célula, responsáveis por manter a arquitetura do organóide.

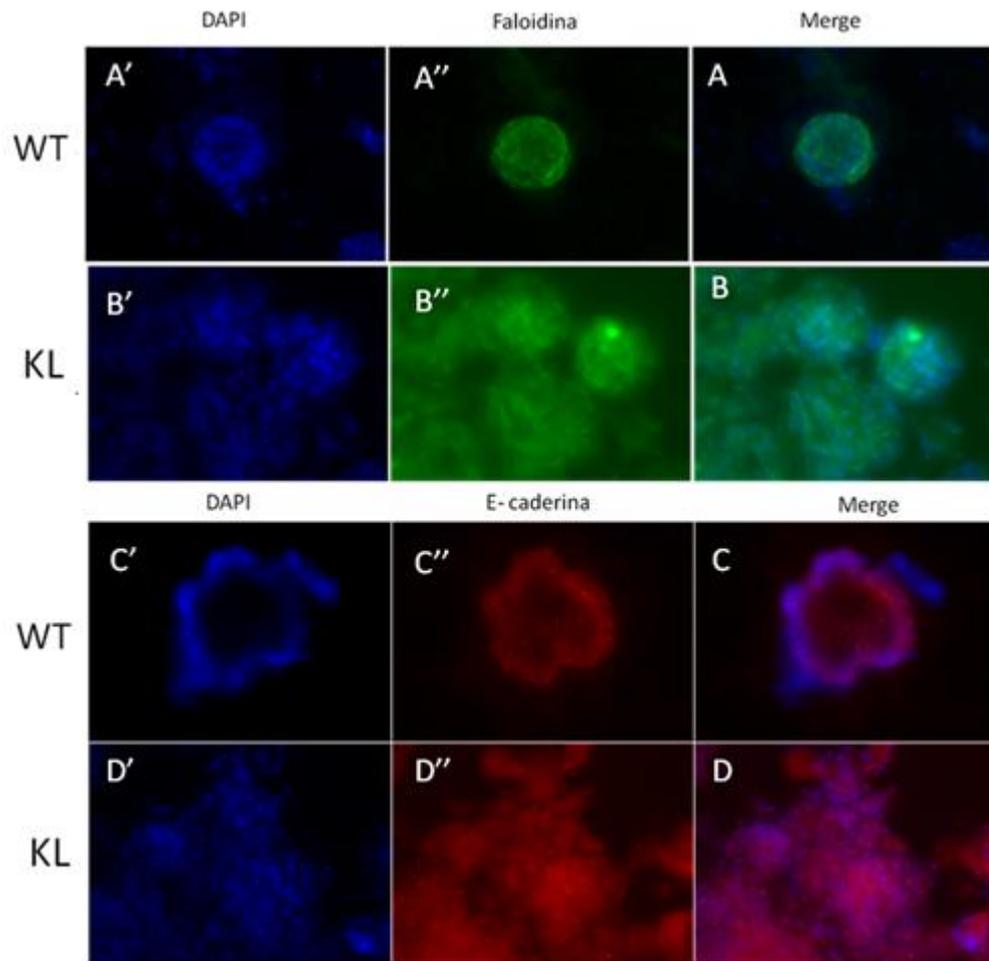


Figura 16. Marcação com faloidina e anti e-caderina em culturas tridimensionais de células primárias murinas. Células epiteliais provenientes de animais selvagens (WT) e deficientes em klotho (KL) foram cultivadas em suspensão, formando culturas tridimensionais em meio com 2% de matrigel. As estruturas provenientes de células WT (A e C) formam organóides mais estruturados, com marcação característica para faloidina (A'') e E-caderina (C'').

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.