

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Proteína α Klotho: da associação *in vitro* com o ER β ao perfil antitumoral no soro
de pacientes com câncer de mama**

Pedro Augusto do Amaral

UBERLÂNDIA, MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Proteína α Klotho: da associação *in vitro* com o ER β ao perfil antitumoral no soro
de pacientes com câncer de mama**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como parte de
obtenção do título de Mestre.

Pedro Augusto do Amaral

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

UBERLÂNDIA, MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A485p
2018 Amaral, Pedro Augusto do, 1991
Proteína α Klotho: da associação in vitro com o ER β ao perfil antitumoral no soro de pacientes com câncer de mama / Pedro Augusto do Amaral. - 2018.
62 f. : il.
- Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.790>
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Biomarcadores tumorais - Teses. 4. Receptor beta de estrogênio - Teses. I. Silva, Marcelo José Barbosa. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Pedro Augusto do Amaral

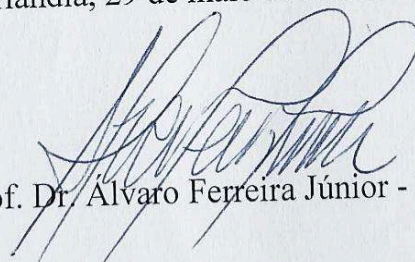
“Proteína α Klotho: da associação *in vitro* com o ER β ao perfil antitumoral no soro de pacientes com câncer de mama”

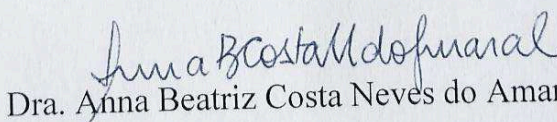
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

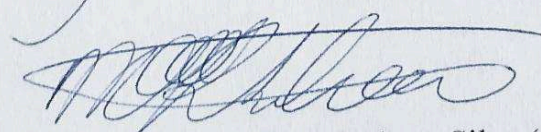
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de maio de 2018.


Prof. Dr. Alvaro Ferreira Júnior - UFG/GO


Dra. Anna Beatriz Costa Neves do Amaral - HC/UFU


Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva (orientador) - ICBIM/UFU

“A maior riqueza do homem é a sua incompletude.
Não aguento ser apenas um sujeito que abre portas,
que puxa válvulas, que olha o relógio. Perdoai. Mas
eu preciso ser outros”

Manoel de Barros

Dedico este momento e este trabalho a todos os pacientes oncológicos que passaram pela minha vida e sem saber moldaram e me transformaram no profissional que sou hoje, gerando o brilho, o amor e o valor que sempre procurei como profissional da saúde.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar e iluminar sempre meus caminhos e ter sido sustento durante essa árdua jornada. Agradeço meus pais e irmãos pelo apoio irrestrito e por todo o amor que sempre me alcança, apesar dos quilômetros que nos separam, vocês são minha base, meu refúgio, meus exemplos e o motivo que me faz lutar todos os dias.

Agradeço meus familiares, avós, tios e primos por todo carinho e apoio, vocês são a saudade diária e o meu combustível. De forma especial aos primos Eduardo e Thays, por terem me aberto as portas de Uberlândia, com isso ganhei morada e uma família por aqui, vocês terão sempre o meu amor e respeito.

Agradeço ao professor Marcelo por ter me acolhido, pelos ensinamentos transmitidos e por ter dado a oportunidade e os meios para que este projeto fosse feito. Aos demais professores da pós-graduação que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que ao longo do tempo se tornaram grandes amigos. Inicialmente devo agradecer a Livia pelo carinho e amizade por todos estes anos enquanto preceptora e companheira de trabalho e principalmente por ter sido o elo que me levou ao mundo dos experimentos. Agradeço imensamente ao Felipe, que foi mais que um colega, um co-orientador, não tenho dúvidas de que sem o seu conhecimento, disponibilidade e auxílio este projeto não aconteceria, a você minha gratidão e respeito.

Dani, Pultz, Fenandinha, Brunits e Isa, é tão amplo e singular tudo que vivi com vocês, seja no laboratório ou na vida pessoal, que não consigo dimensionar o quão importante vocês se tornaram ou como essa amizade é essencial para mim, obrigado por isso, contem comigo sempre!

Agradeço a Laysinha por todo o apoio e auxílio com os experimentos iniciais, parte deste trabalho também é fruto do seu companheirismo. Agradeço também a Mari, Ieda, Annelise, Samela e Edielly, pela amizade e apoio prestados durante esta caminhada.

Agradeço a todos os meus amigos, pessoas especiais com as quais tenho a honra de conviver e pegar um pouco da luz que transmitem, amigos da residência, do trabalho e da vida, obrigado por todo o apoio. Agradeço também ao Thiago, pelo companheirismo, carinho e por me impulsionar em todos os momentos, você é parte desta conquista, melinyel.

Agradeço ao Núcleo de Prevenção e Pesquisa de Câncer (NUPPEC), a cada um de seus membros pela disponibilização das amostras e dados de seus pacientes, além do apoio incondicional para que o projeto fosse realizado. Estendo este agradecimento também à equipe do Hospital do Câncer em Uberlândia, o Grupo Luta Pela Vida e ao Dr. Rogério Agenor de Araújo.

Agradeço aos membros do laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mário Endsfieldz Camargo”, na figura de seu responsável Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, pelo auxílio prestado e a disponibilidade de equipamentos para a realização de parte dos experimentos.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento que aportaram recursos para a pesquisa realizada, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do α Klotho de membrana e geração de sKL.....	18
Figura 2. Estratégia de <i>gate</i> para o ensaio de proliferação por CFSE em linhagem celular MCF-7.....	30
Figura 3. Expressão do mRNA de α Klotho após o uso de agonistas de ER em linhagens de câncer de mama.....	32
Figura 4. Ensaio de proliferação por MTT em linhagem MCF-7.....	33
Figura 5. Ensaio de proliferação por decaimento de CFSE em linhagem MCF-7.....	33
Figura 6. Ciclo celular após estímulo de agonistas dos ER na linhagem MCF-7.....	34
Figura 7. Expressão relativa do mRNA de reguladores do ciclo celular após ativação dos ER em MCF-7.....	35
Figura 8. EMT/MET após o agonismo de ER β na linhagem MCF-7.....	35
Figura 9. Níveis séricos de α Klotho em controles saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	38
Figura 10. Níveis séricos de α Klotho em pacientes com câncer de mama de acordo com marcadores imuno-histoquímicos.....	39
Figura 11. Níveis séricos de α Klotho em pacientes com câncer de mama de acordo com os subtipos moleculares do tumor.....	40
Figura 12. Porcentagem de Ki67 de acordo com a produção de α Klotho solúvel no soro de pacientes com câncer de mama.....	41
Figura 13. Níveis séricos de α Klotho de acordo com comprometimento linfonodal.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers para os genes alvo analisados por qPCR.....	28
Tabela 2. Características demográficas e clínicas entre pacientes com câncer de mama e grupo controle.....	36
Tabela 3. Características imuno-histoquímicas e histopatológicas das pacientes com câncer de mama.....	37
Tabela 4. Correlação entre status de ER <i>versus</i> status linfonodal.....	42

LISTA DE ABREVIACÕES

ADAM - uma desintegrina e metaloprotease

BCRJ – banco de células do Rio de Janeiro

Ca²⁺ - íon cálcio

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CFSE - carboxifluoresceína succinimidil éster

CSC - células-tronco cancerígenas

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPN - diarilpropionitrilo

E2 - estradiol

ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimático ou ensaio imunoenzimático

EMT - transição epitélio-mesênquima

ER - receptores de estrogênio

ER β - receptor de estrogênio beta

ER α - receptor de estrogênio alfa

ESR2 - gene receptor de estrogênio 2

FBS - soro fetal bovino

FGF - fator de crescimento de fibroblastos

FGF19 - fator de crescimento de fibroblastos 19

FGF21 - fator de crescimento de fibroblastos 21

FGF23 - fator de crescimento de fibroblastos 23

FGFR - receptores do fator de crescimento de fibroblastos

FSC - detector de luz frontal

FSC-A - área do parâmetro tamanho pelo detector de luz frontal

FSC-H - altura do parâmetro tamanho pelo detector de luz frontal

HC-UFU - Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

HEPES - ácido hidroxietil piperazinoetanossulfônico

HER2 - receptor do fator de crescimento epidérmico 2

IC - intervalo de confiança

IFN- γ – interferon gama

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina 1

IRS-1 – substrato 1 do receptor de insulina

IRS-2 – substrato 2 do receptor de insulina

KL1 - repetição interna 1 da porção extracelular da proteína α Klotho

KL2 - repetição interna 2 da porção extracelular da proteína α Klotho

MET - transição mesênquima-epitélio

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

NaPi-IIa - Proteína cotransportadora de sódio e fosfato tipo IIa

NUPPEC - Núcleo de Prevenção e Pesquisa de Câncer

PBS - solução salina tamponada com fosfato

Pi - íon fosfato

PgR - receptor de progesterona

qPCR - PCR em tempo real

RNA - ácido ribonucleico

ROS - espécies reativas de oxigênio

RR - risco relativo

SD - desvio padrão

SEM - erro padrão da média

SIH - Sistema de Informação Hospitalar

sKL – Klotho solúvel

SSC - detector de luz de dispersão lateral

ssDNA - ácido desoxirribonucleico de cadeia simples

TGF- β - fator de crescimento transformante beta

RESUMO

α Klotho é uma proteína de antisenescência celular, a qual está relacionada a ações antitumorais, regulando o crescimento, a proliferação e a invasividade em diversos tipos de tumores, incluindo o câncer de mama. O diagnóstico e prognóstico do câncer de mama são baseados em características intrínsecas do tumor, como a presença de receptores estrogênicos, especialmente o ER α . Por sua vez, o ER β apesar de demonstrar ações antitumorais, permanece com papel incerto na carcinogênese da mama e seu uso clínico é limitado. O objetivo do estudo foi analisar a relação entre α Klotho e os receptores de estrogênio, bem como avaliar os níveis séricos desta proteína em pacientes com câncer de mama de acordo com características histopatológicas e imunohistoquímicas do tumor. As linhagens luminal e triplo-negativa de câncer de mama MCF-7 e MDA MB-231 foram cultivadas e expostas aos agonistas dos ER, E2 e DPN, para determinação da expressão de α Klotho, posteriormente foram realizados ensaios de proliferação e de avaliação da EMT nas células MCF-7 tratadas com os mesmos agonistas. Para os ensaios de α Klotho solúvel, amostras de soro de 75 pacientes com câncer de mama e 63 controles saudáveis foram randomizadas e os níveis séricos foram avaliados por ELISA sanduíche. Dados clínicos e diagnósticos foram obtidos dos prontuários e bases de dados do hospital. Nas células MCF-7 houve um aumento considerável na expressão de α Klotho após estímulo do ER β com DPN ($p < 0,01$). A ativação do ER β também levou à diminuição da proliferação e parada do ciclo celular, bem como a inibição da transição epitélio-mesênquima (EMT). Nas análises de soro, mulheres saudáveis apresentaram níveis maiores de α Klotho solúvel do que pacientes ($p = 0,04$). Dentre as pacientes, aquelas com tumor inicial ($p = 0,02$), positivos para ER ($p = 0,03$), de subtipo luminal ($p = 0,04$) apresentaram níveis séricos mais elevados de α Klotho solúvel. Além disso, a produção de α Klotho em baixos ou altos níveis ($p = 0,04$ e $p = 0,03$) foi associada a maiores taxas de proliferação por Ki67. Por fim, pacientes com ausência de metástase linfonodal também apresentaram maiores níveis de α Klotho ($p = 0,03$). Esses dados sugerem que α Klotho solúvel foi relacionado a fatores de melhor prognóstico no câncer de mama, e confirmam a relação entre α Klotho e o ER β com a regulação positiva da expressão de α Klotho por parte deste receptor e seu perfil antitumoral em linhagem luminal de mama.

Palavras-chave: α Klotho; receptor de estrogênio beta; câncer de mama; biomarcador.

ABSTRACT

α Klotho, a cellular anti-senescence protein, is related to antitumor actions, regulating the growth, proliferation and invasiveness in several types of tumors, including breast cancer. The diagnosis and prognosis of breast cancer are based on intrinsic characteristics of the tumor, such as the presence of estrogen receptors, especially ER α . In turn, ER β despite demonstrating antitumor actions, remains with an uncertain role in breast carcinogenesis and its clinical use is limited. The aim of the study was to analyze the relationship between α Klotho and estrogen receptors, as well as to evaluate the serum levels of this protein in patients with breast cancer according to histopathological and immunohistochemical characteristics of the tumor. The luminal and triple-negative lineages of breast cancer, MCF-7 and MDA MB-231, were cultured and exposed to the agonists of ER, E2 and DPN, to determine the expression of α Klotho, then proliferation and EMT evaluation trials were performed on MCF-7 cells treated with the same agonists. For the soluble α Klotho assays, serum samples from 75 breast cancer patients and 63 healthy controls were randomized and serum levels were assessed by sandwich ELISA. Clinical and diagnostic data were obtained from hospital records and databases. In MCF-7 cells there was a considerable increase in α Klotho expression after stimulation of ER β with PND ($p < 0.01$). Activation of ER β also led to decreased proliferation and cell cycle arrest, as well as inhibition of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). In serum analyzes, healthy women had higher levels of soluble α Klotho than patients ($p = 0.04$). Among the patients, those with initial tumor ($p = 0.02$), ER positivity ($p = 0.03$), and luminal subtype ($p = 0.04$) had higher serum levels of soluble α Klotho. Furthermore, α Klotho production in low or high levels ($p = 0.04$ and $p = 0.03$) was associated with higher rates of proliferation by Ki67. Finally, patients with no lymph node metastasis also had higher levels of α Klotho ($p = 0.03$). These data suggest that soluble α Klotho was related to factors of better prognosis in breast cancer and confirm the relationship between α Klotho and ER β with the positive regulation of α Klotho expression by this receptor and its antitumor profile in breast lumen.

Keywords: α Klotho; estrogen receptor beta; breast cancer; biomarker.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Klotho e senescência celular.....	15
1.2 Proteína de membrana e suas funções homeostáticas	16
1.3 α Klotho, um hormônio circulante.....	17
1.4 α Klotho solúvel e carcinogênese	19
1.5 Câncer de mama e os receptores de estrogênio	20
1.6 α Klotho, estrogênio e seus receptores.....	22
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Cultura Celular.....	25
4.2 Reagentes e Tratamentos	27
4.3 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).....	27
4.4 Ensaio de proliferação por MTT.....	28
4.5 Ensaio de proliferação por decaimento de CFSE	29
4.6 Ensaio de ciclo celular	30
4.7 Pacientes e amostras de soro.....	25
4.8 Mensuração de α Klotho solúvel por ELISA.....	26
4.9 Aprovação ética e consentimento em participar	25
4.10 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Ativação do ER β aumenta expressão de α Klotho na linhagem MCF-7	32
5.2 Ativação do ER β diminui a proliferação estimulada por E2 em células MCF-7 .	32
5.3 Ativação do ER β causa parada do ciclo celular e aumento da expressão de p21 .	34
5.4 Ativação do ER β leva a diminuição de marcadores de EMT em células MCF-7	35
5.5 Análise em pacientes com câncer de mama: caracterização da amostra	36
5.6 Níveis séricos de α Klotho são maiores em indivíduos saudáveis e em pacientes com tumores iniciais de mama.....	38
5.7 Pacientes com tumores ER-positivos apresentaram níveis séricos elevados de α Klotho	38

5.8 Níveis séricos de α Klotho são maiores em pacientes com tumores de mama luminais.....	39
5.9 Pacientes positivos para α Klotho solúvel apresentam menores taxas de Ki67.....	40
5.10 Pacientes sem comprometimento linfonodal apresentam maiores níveis de α Klotho	41
5.11 Pacientes com tumores ER-negativos apresentam maior risco de metástase linfonodal	41
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49
8 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Klotho e senescência celular

Todos os organismos vivos passam pelo processo de envelhecimento que culmina com a sua morte, com isso, ano após ano, o aumento da expectativa de vida e a busca por um gene que determine a longevidade e tenha poder sobre a sobrevivência celular sempre foi um dos principais objetivos da ciência moderna. Em 1997, Kuro e colaboradores identificaram um gene que quando mutado levava camundongos a apresentarem fenótipos compatíveis com o envelhecimento, dando um passo de suma importância para o estudo da antisenescência fisiológica, sendo este gene então denominado Klotho. Na mitologia grega, tanto humanos como deuses tinham seus destinos determinados pelas Moiras, três irmãs, filhas de Zeus e Themis a deusa da justiça. Klotho era responsável por girar o fio da vida, Lachesis determinaria seu comprimento e Átropos o cortaria.

O gene Klotho é composto por cinco éxons, e está localizado no cromossomo 5 em camundongos, e no cromossomo 13 em humanos (MATSUMURA et al., 1998; SHIRAKI-IIDA et al., 1998). Camundongos que possuíam um alelo hipomórfico de Klotho gerando homozigose (kl/kl) apresentavam alterações fisiológicas de envelhecimento prematuro, como perda de massa óssea, calcificação vascular, atrofia genital, retardo de crescimento e sobrevivência extremamente pequena (KURO-O et al., 1997). Após sua descoberta, grande atenção no meio científico foi dada a este gene, e estudos posteriores validaram a associação de Klotho com senescência celular, determinando que a sua superexpressão em camundongos transgênicos aumentava consideravelmente a sobrevivência na comparação com camundongos tipo selvagem (-/-) (KUROSU et al., 2006). Além disso, nas últimas décadas tem sido associado a fisiopatologia de uma série de doenças relacionadas com a idade, como osteoporose, doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (ARKING, DAN E. et al., 2005; ARKING, D. E. et al., 2003; KAWANO et al., 2002; YAMAZAKI et al., 2010). Estudos com macacos demonstraram também que a expressão de Klotho é reduzida na substância branca de cérebros envelhecidos, indicando um papel fundamental de proteção do sistema nervoso (DUCE et al., 2008). Por fim, estudos têm sido conduzidos para desvendar as ações e mecanismos de Klotho com relação ao envelhecimento e doenças crônicas, inclusive em humanos, onde já foi determinado que Klotho tende a diminuir com a idade (YAMAZAKI et al., 2010).

1.2 Proteína de membrana e suas funções homeostáticas

O gene Klotho codifica uma glicoproteína transmembrana de passagem única do tipo I denominada α Klotho, contendo um domínio extracelular que é formado por duas repetições internas (KL1 e KL2) de aproximadamente 450 aminoácidos (Figura 1). Esta região possui grande homologia com enzimas da família das glicosidases, que são responsáveis por hidrolisar a ligação β -glicosídica em sacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios (KURO-O et al., 1997; TOHYAMA et al., 2004). Apesar de α Klotho não possuir em sua repetição resíduos de ácido glutâmico conservados, essenciais para atividade catalítica, pesquisas já relataram atividade sialidase e β -glucuronidase por parte desta proteína (CHA et al., 2008; CHANG, Q. et al., 2005). α Klotho é composto ainda por um domínio intracelular curto de 10 aminoácidos (KURO-O et al., 1997).

Além da membrana plasmática a proteína α Klotho também já foi relatada no complexo de Golgi, estando expressa em diversos tecidos e órgãos, com maior destaque para o rim onde é encontrado em maiores níveis, especificamente no túbulo contorcido distal e no túbulo proximal (HU et al., 2010; IMURA et al., 2007). Também é expresso no plexo coroide cerebral, glândula paratireoide, área adventícia da aorta, ovário, testículo e placenta (BEN-DOV et al., 2007; KURO-O et al., 1997; RITTER et al., 2015; SOPJANI; DĚRMAKU-SOPJANI, 2016).

α Klotho forma um complexo constitutivo obrigatório com os receptores de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), fornecendo afinidade de ligação seletiva destes receptores aos seus ligantes, os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) endócrinos, FGF19, FGF21 e o FGF23, sendo este último o responsável pelas principais ações homeostáticas descritas para α Klotho (IDE et al., 2016; KHARITONENKOV, 2009).

FGF23 é um hormônio derivado do osso que possui um papel central na homeostase de fosfato (Pi) e Ca^{2+} , bem como da vitamina D (calcitriol) (KURO-O, 2006; KUROSU et al., 2006). α Klotho converte FGFR canônicos em receptores altamente seletivos para FGF23, e este, ao atuar no complexo α Klotho-FGFR, inibe a recaptação de fosfato inorgânico nos túbulos proximais do rim por meio da NaPi-IIa, uma proteína cotransportadora de sódio-fosfato de tipo II, além de regular negativamente a expressão da 1α -hidroxilase (CYP27B1), enzima envolvida na síntese da forma ativa da vitamina D, o calcitriol, que é responsável pela reabsorção de Pi no intestino (KUROSU et al., 2006; URAKAWA et al., 2006). FGF23 atua ainda na reabsorção renal de Ca^{2+} por meio do TRPV5, um receptor transiente de canais catiônicos, ativando e mediando a ação deste receptor (ANDRUKHOVA et al., 2014). Com isso, a homeostase de Pi e Ca^{2+} , essencial

para uma série de funções fisiológicas vitais do organismo como o metabolismo ósseo, é intimamente ligada a presença de α Klotho de membrana enquanto coreceptor obrigatório de FGF23 (KUROSU et al., 2006; URAKAWA et al., 2006). Corroborando com essas funções, um estudo em camundongos mutados para α Klotho (kl/kl) apresentaram problemas graves de metabolismo mineral, crescimento e vida útil (KURO-O et al., 2006; KURO-O et al., 2017).

Dois outros membros da família Klotho foram detectados, o β Klotho e γ Klotho, sendo o beta expresso no fígado, pâncreas, tecido adiposo e rins, com ações descritas no metabolismo energético, e o gama detectado nos rins, olhos e pele com funções ainda a serem elucidadas (ITO et al., 2002; ITO et al., 2000; KIM, J. H. et al., 2015). Porém, α Klotho é o mais abundante e responsável pela maioria das ações antienvhecimento já descritas até o presente momento, apresentando além da isoforma transmembranar, uma forma solúvel originada na clivagem da porção extracelular e uma forma secretada gerada por *splicing* alternativo (MATSUMURA et al., 1998; SHIRAKI-IIDA et al., 1998).

1.3 α Klotho, um hormônio circulante

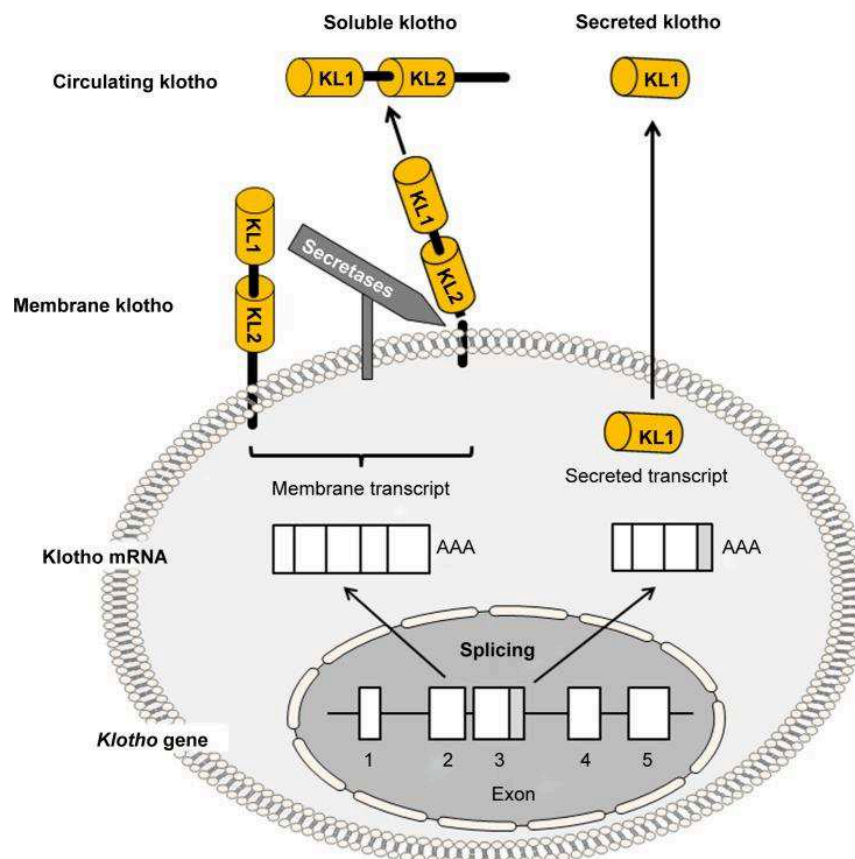
Além de ser um constituinte da membrana plasmática, o α Klotho pode ser clivado e liberado para atuar como um hormônio circulante autócrino, parácrino ou endócrino, presente no sangue, na urina e no líquido cefalorraquidiano (AKIMOTO et al., 2012; CHEN, C. D. et al., 2014). α Klotho solúvel (sKL) é originado após ação de uma família de proteínas denominadas *shedases*, como as proteínas desintegrinas e metaloproteinases (ADAM), especificamente ADAM10 e ADAM17, que clivam a porção externa de α Klotho com as duas repetições KL1 e KL2, como ilustrado na Figura 1 (BLOCH et al., 2009; CHEN, C. D. et al., 2007).

Após sua liberação, sKL atua de forma pleiotrópica no organismo, exercendo seu efeito biológico independentemente de FGFR ou seu ligante FGF23 (KUROSU et al., 2006). Estas ações antienvhecimento ocorrem pela regulação negativa de vias de fatores de crescimento, como a do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1/insulina), atuando na diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nesta sinalização, prolongando assim a sobrevivência celular (KUROSU et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005). Atua também na inibição da via do Wnt, que se sinalizada em excesso leva a diminuição de células estaminais e consequentemente impede a renovação celular favorecendo a senescência (LIU et al., 2007).

sKL pode agir ainda de forma anti-inflamatória sobre as citocinas $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$. Camundongos deficientes de Klotho e consequentemente com menor sKL apresentam um aumento da sinalização destas vias de citocinas o que contribui para um envelhecimento acelerado (LIU et al., 2007; THURSTON et al., 2010). Por fim, a homeostase de íons também faz parte dos mecanismos antisenescência gerados pelo sKL em diversos órgãos. Canais iônicos e transportadores de íons, com destaque para os de Pi e Ca^{2+} , sofrem ação direta do sKL através da modificação do N-glicano destes locais por sua atividade sialidase/ β -glucuronidase (CHA et al., 2008; CHANG, Q. et al., 2005; HU et al., 2010).

Baseado nestes diversos mecanismos de ação, sKL vem sendo descrito ao longo dos anos como um hormônio circulante capaz de proteger nosso organismo de várias doenças agudas e crônicas relacionadas à senescência, e com as descobertas da última década, desempenhando, sobretudo, proteção contra o câncer (KURO-O, 2010; SOPJANI; DËRMAKU-SOPJANI, 2016; XUAN, N. et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2005).

Figura 1. Diagrama esquemático do α Klotho de membrana e geração de sKL



Fonte: (BIAN et al., 2015)

1.4 α Klotho solúvel e carcinogênese

O avanço das descobertas trouxe uma nova perspectiva sobre sKL, determinando sua ação como uma proteína supressora de tumor, uma vez que demonstrou atuar por várias vias de sinalização, como a do FGF, Wnt, p53/p21, fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e IGF-1/insulina, influenciando assim o crescimento, proliferação, diferenciação e migração celular (CHEN, B. et al., 2012; CHEN, T. et al., 2016; DOI et al., 2011; PERRI et al., 2017; TANG, X. et al., 2016; WANG, Y. et al., 2013; WOLF et al., 2008; ZHOU, X.; WANG, 2015).

α Klotho é considerado um importante inibidor da via IGF-1/insulina, ligada a funções fisiológicas de sobrevivência celular (KUROSU et al., 2006). A desregulação dos componentes do eixo IGF/insulina pode levar a um processo carcinogênico pelo aumento do crescimento, sobrevivência e invasividade celular, bem como ações anti-apoptóticas, o que facilita a manutenção de um fenótipo maligno, verificada em diversos tipos tumorais (POLLAK; SCHERNHAMMER; HANKINSON, 2004; RAY; ALALEM; RAY, 2014).

A relação de antagonismo do sKL com a via IGF/insulina teve um importante impacto no processo oncogênico, no qual verificou-se uma influência na homeostasia celular em diversos pontos da cascata de sinalização (WOLF et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2005). Estudos utilizando linhagens celulares de câncer de mama, pulmão, pâncreas e hepático mostraram uma regulação negativa pela interação entre sKL e o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1R) ou o receptor de insulina (IR), suprimindo a fosforilação destes receptores e de seus substratos IRS-1 e IRS-2, inibindo o eixo PI3K/Akt com consequente efeito inibitório em cascata sobre o crescimento e proliferação celular (ABRAMOVITZ et al., 2011; CHEN, B. et al., 2010; SHU et al., 2013; WOLF et al., 2008).

Outro ponto crucial da via de sinalização do IGF-1/insulina é a sua ação anti-apoptótica, através da transcrição dos genes Bax/Bcl-2, que se mostraram regulados no tratamento com sKL, deixando estas células tumorais mais suscetíveis à apoptose (CHEN, B. et al., 2010).

α Klotho possui ainda antagonismo e consequente ação antitumoral pela via Wnt/ β -catenina, via de sinalização classicamente implicada em processos ligados à proliferação e sobrevivência celular, cuja desregulação propicia o crescimento e desenvolvimento tumoral (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008; POLAKIS, 2000; TANG, XIAOWEI et al., 2015). Foi demonstrado em linhagens celulares de câncer de pulmão que a exposição ao sKL levou a diminuição dos níveis da forma ativa da β -catenina por desfosforilação em resíduos de

aminoácidos, além da diminuição de seus alvos a jusante, como os transcritos dos genes c-Myc e ciclina D1, responsáveis pela progressão do ciclo celular (CHEN, B. et al., 2012).

Em adição, a inibição na sinalização da via Wnt/ β -catenina por parte de sKL parece estar relacionada a influência sobre os ligantes Wnt e a interação destes com os receptores, como no câncer de pulmão, em que foi observada diminuição de Wnt3A, mostrando que a sKL impediu sua internalização (CHEN, B. et al., 2012). Em linhagens celulares de melanoma mostrou que a ligação e internalização do ligante Wnt5A foi prejudicada pela ação sialidásica do sKL sobre os glicanos da superfície celular essenciais para a sinalização, ao mesmo tempo em que diminuiu a capacidade metastática da sinalização de Wnt5A através da inibição da calpaína, uma enzima que, por meio das alterações do citoesqueleto, confere mobilidade e capacidade migratória às células do melanoma (CAMILLI et al., 2011).

Por fim, α Klotho mostrou inibição sobre uma importante via ligada a invasividade tumoral, a do TGF- β . Células renais tratadas com sKL tiveram melhora de fibrose e consequentemente diminuição da chance de metástase tumoral por meio da inibição da transcrição de genes e outros marcadores ligados a transição epitélio-mesênquima (EMT), impedindo que estas células criassem características que facilitem sua migração e disseminação pelo organismo (DOI et al., 2011).

Com isso, por meio da inibição de uma ou múltiplas vias, sKL tem validado sua atuação sobre o processo carcinogênico, com impacto inclusive na sobrevida e na resposta à quimioterapia, confirmando assim, seu perfil antitumoral em diversos tipos de câncer, como pulmão, rim, cólon, próstata, ovário e colo uterino, além de ser protagonista em várias pesquisas contra a neoplasia mais prevalente entre as mulheres de todo o mundo, os tumores mamários (CHEN, T. et al., 2016; KIM, J. H. et al., 2016; LEE, J. et al., 2010; LI, X.-X. et al., 2014; RUBINEK, TAMI et al., 2012; SEO et al., 2017; USUDA et al., 2011; WANG, Y. et al., 2013; YAN et al., 2017).

1.5 Câncer de mama e os receptores de estrogênio

O câncer de mama é atualmente a segunda neoplasia que mais mata mulheres no mundo. No ano de 2012 foram estimadas mais de 500 mil mortes decorrentes desta malignidade (FERLAY et al., 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). No Brasil, a estimativa para o biênio 2018-2019 é de 59700 novos casos de câncer de mama ao ano, com risco estimado de 56,33 para 100 mil mulheres (BRASIL, 2017).

Por ser uma doença heterogênea em seus padrões genéticos e moleculares, o diagnóstico, estadiamento e tratamento do câncer de mama são atualmente baseados em diversas variáveis, que irão individualizar e definir a conduta clínica, sendo determinantes para o sucesso terapêutico (ALLRED et al., 1998; GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018; ZAHA, 2014). Dentre as características avaliadas estão os parâmetros histopatológicos, que definirão a morfologia do tumor e o acometimento de tecidos adjacentes ou a distância, como o tamanho tumoral, seu grau de diferenciação com relação ao tecido de origem e a presença de metástases na rede de linfonodos mais próxima da mama (AHMAD et al., 2009; FERNANDES; ROSEL; BRÁBEK, 2017; RAKHA et al., 2010). Somado a isso, características moleculares intrínsecas do tumor também são levadas em conta, como a presença de receptores hormonais e de fatores de crescimento, principalmente os receptores de estrogênio (ER), o receptor de progesterona (PgR) e o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2) (EARLY et al., 2011; HARBECK; THOMSEN; GNANT, 2013; MALHOTRA et al., 2010).

Os receptores de estrogênio (ER) estão ligados ao desenvolvimento fisiológico da glândula mamária por meio de estímulos provindos de hormônios esteróides (BOCCHINFUSO, WAYNE P.; KORACH, 1997; BOCCHINFUSO, W. P. et al., 2000; OMOTO; IWASE, 2015). Em contraste com a sua função fisiológica, a ativação destes receptores em contextos carcinogênicos gera a base para o desenvolvimento e progressão tumoral (SOMMER; FUQUA, 2001; ZHOU, Z. et al., 2014). As ações biológicas do estradiol (E2), um estrógeno natural, ocorrem então, por sua ligação a um dos membros desta família de receptores, o ER α ou ER β (LEE, H.-R. R.; KIM; CHOI, 2012; YAŞAR et al., 2017). O ER α está bem estabelecido no câncer de mama como um regulador de genes ligados ao crescimento e proliferação das células tumorais, por isso é o receptor mais pesquisado e sua presença é a base para as terapias hormonais existentes (ALI; COOMBES, 2000; DUFFY, 2008; HAYASHI et al., 2003). No entanto até 40% dos pacientes não respondem à terapia hormonal vigente baseada no ER α , sendo a resistência e a ocorrência de recidivas um problema clínico significativo, que expõe a necessidade da busca por novos alvos que definiriam melhor quais pacientes seriam beneficiados com este tipo de terapia, como o outro membro da família dos receptores de estrogênio, o ER β (HALDOSÉN; ZHAO; DAHLMAN-WRIGHT, 2014; LIAO et al., 2014; LIN et al., 2007; SIEUWERTS et al., 2014).

O ER β é amplamente expresso no tecido mamário normal, inclusive em quantidades maiores que o ER α , ao passo que em células malignas da mama sua expressão está

diminuída, apesar disso aproximadamente 50% dos tumores luminais são positivos para ER β , também presente em tumores triplo-negativos (MAROTTI et al., 2009). Durante o processo carcinogênico da mama, o gene ESR2, responsável pela expressão deste receptor é hipermetilado, e estas linhagens tendem a perder sua expressão, demonstrando que a sua presença pode desencadear ações que impeçam o desenvolvimento e progressão tumoral (RODY et al., 2005; ZHAO et al., 2003).

Apesar do perfil antitumoral demonstrado, muito tem sido discutido sobre a ação dicotômica do ER β . Kontos et al (2011) relataram que apesar de apresentar ações antiproliferativas e antiapoptóticas em linhagem celular de câncer de mama, quando o estudo foi expandido para modelos *in vivo* com camundongos foi verificado um aumento da massa tumoral induzido pela presença do ER β . No entanto, grande parte dos estudos conduzidos a fim de desvendar as ações do ER β , sustentam a sua atuação como um regulador negativo da via estrogênica ativada pelo ER α , em especial na expressão conjunta de ambos receptores, o que leva a uma diminuição da proliferação e consequentemente impede o desenvolvimento do tumor, demonstrando que o ER β deve ser considerado enquanto marcador promissor de prognóstico e de definição terapêutica no câncer de mama (KARAMOUZIS et al., 2016; PATERNI et al., 2014; PETTERSSON; DELAUNAY; GUSTAFSSON, 2000).

1.6 α Klotho, estrogênio e seus receptores

A interação biológica entre α Klotho e os ER é pouco delineada na literatura, quando descrita, geralmente está ligada à homeostase de íons e o metabolismo ósseo, e em raros estudos um efeito direto em α Klotho por parte destes receptores é descrito (TORRES et al., 2007). Öz et al. (2007), em um estudo sobre o impacto da ausência da aromatase na reabsorção renal de cálcio, mostraram que camundongos deficientes desta enzima, atuante na síntese periférica do estradiol, tiveram um aumento na expressão de α Klotho, que foi revertido após tratamento com estrogênio exógeno, sugerindo que o estrogênio é potencialmente supressor da expressão de Klotho. Carrillo-López et al (2009) também demonstraram esta interação, no entanto, verificaram que o tratamento hormonal estrogênico em ratos levou ao aumento dependente de dose nos níveis do mRNA de α Klotho na glândula paratireóide, possivelmente causado pelo efeito estimulatório do estrogênio sobre o FGF23. Contudo a interação de α Klotho com os receptores de estrogênio para o contexto do câncer de mama ainda não foi explorada.

2 JUSTIFICATIVA

O contexto oncológico atual mantém uma busca incessante por moléculas que tenham potencial definidor na carcinogênese, tanto diagnóstico, como prognóstico e terapêutico, sendo que o combate ao câncer e a busca de uma melhor qualidade de vida aos pacientes que sofrem desta doença perpassam pelo sucesso na busca por estes marcadores. Baseado neste fato, ambas as moléculas aqui discutidas, a proteína α Klotho e o receptor de estrógeno beta, trazem um novo frescor para a continuidade desta luta, visto que já demonstraram ações antitumorais marcantes. Para além disso, a premissa trazida pelo presente estudo de que estes marcadores possam estar relacionados entre si e/ou atuarem de forma conjunta contra a progressão tumoral, explicita um panorama de futuro com impacto direto no significado e uso clínico destes marcadores no câncer de mama, solidificando a necessidade e a importância do trabalho que se segue.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a relação entre os receptores de estrogênio e α Klotho na linhagem luminal de câncer de mama MCF-7, bem como dosar e correlacionar em amostras de soro de pacientes os níveis de α Klotho solúvel de acordo com perfis tumorais imuno-histoquímicos e histopatológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Elucidar a influência que a ativação dos ER ($ER\alpha$ e $ER\beta$) exerce sobre a expressão de α Klotho em células MCF-7;
- Elucidar, para efeito de comparação, esta mesma influência sobre a expressão de α Klotho em células de câncer de mama triplo negativo, MDA MB-231;
- Analisar o perfil proliferativo e de EMT induzido pelo agonismo de $ER\beta$ em células MCF-7, comparando ao já descrito na literatura para α Klotho;
- Avaliar como os níveis séricos de α Klotho se comportam no paralelo saúde-doença (pacientes com câncer de mama versus controles);
- Avaliar os níveis séricos de α Klotho de acordo com o estágio da doença (inicial e avançado), assim como o subtipo molecular para análise comparativa com resultados da cultura celular;
- Avaliar a relação entre a positividade ou não dos receptores ER, PgR e HER2 com os níveis séricos de α Klotho;
- Avaliar a relação entre os níveis séricos de α Klotho e a proliferação tumoral baseada nas taxas do marcador imuno-histoquímico Ki67;
- Analisar a relação dos níveis séricos de α Klotho com a disseminação da doença baseada no comprometimento linfonodal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação ética e consentimento em participar

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para uso de anotações médicas e amostras de soro foi assinado por todos os pacientes. Uma vez aceitos, os pacientes foram informados de que suas informações seriam utilizadas em estudos secundários eticamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário do Triângulo sob o parecer 1.230.380, de 16 de setembro de 2015. CAAE: 38930314.5.0000.5565. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo pelos pesquisadores.

4.2 Pacientes e amostras de soro

As amostras dos pacientes em estudo foram obtidas em parceria com o Núcleo de Prevenção e Pesquisa de Câncer (NUPPEC) do setor de oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). As amostras de sangue periférico de pacientes e controles foram coletadas por profissionais do NUPPEC durante a primeira consulta destes no serviço. Para participar os pacientes deveriam ter diagnóstico de câncer de mama comprovado por biópsia e não terem realizado nenhum tratamento prévio (cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico). Após coleta, o soro foi separado de acordo com o protocolo e armazenado a -80°C no banco de amostras NUPPEC. Para o presente estudo foram randomizadas amostras de soro de 75 pacientes, além de 63 familiares saudáveis sem história prévia de câncer para compor o grupo controle. Ambos os grupos foram compostos por amostras de indivíduos do sexo feminino.

Dados demográficos e clínicos de pacientes e controles foram coletados através de registros médicos e do banco de dados do NUPPEC. As variáveis histopatológicas e imuno-histoquímicas, como tamanho do tumor, grau histológico, status linfonodal, status do ER, status do receptor de progesterona (PgR), status do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2) e do marcador de proliferação Ki67 foram obtidas da biópsia registrada no Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do HC-UFU. Os anticorpos utilizados para pesquisa imuno-histoquímica dos marcadores segundo laudo do SIH foram os clones: 6F11 (anti-ER α), 16 (anti-PgR), 5A2 (anti-erbB2) e MIB1 (anti-Ki67).

Em uma análise mais aprofundada, os dados clínicos foram utilizados para estratificar os pacientes. O sistema de classificação de tumores malignos TNM,

ferramenta preconizada pela União Internacional de Controle do Câncer (UICC) para o estadiamento tumoral, baseada na extensão anatômica do tumor primário (T), no acometimento dos linfonodos da cadeia de drenagem próxima a localização do tumor (N) e a presença de metástases a distância (M), serviu de base para o agrupamento das pacientes por estágio tumoral nos grupos inicial e avançado (AMIN et al., 2017). Tumores com tamanho T1 ou T2, sem comprometimento linfonodal ou metástases à distância, foram considerados iniciais. Tumores com um ou mais linfonodos positivos e/ou metástases à distância e/ou tumores T3 (> 5cm) foram considerados avançados.

Posteriormente, os pacientes foram classificados de acordo com o perfil molecular de tumor. Esta classificação foi baseada no Consenso Internacional St. Gallen de Especialistas em Câncer de Mama (UNTCH et al., 2013). Tumores Luminais, compostos pelos subtipos Luminal A e Luminal B, são aqueles com positividade para ER e/ou PgR e negativos para HER2. Tumores Triplo Negativos são aqueles com negatividade para os três receptores ER, PgR e HER2. Por fim, os tumores com superexpressão de HER2 apresentaram positividade apenas para este receptor.

4.3 Mensuração de α Klotho solúvel por ELISA

O α Klotho solúvel no soro dos pacientes e no sobrenadante de cultura de células foi medido pelo ensaio imunoenzimático ELISA, kit DY5334-05 (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, OX, Reino Unido), conduzido de acordo com o protocolo do fabricante. O sobrenadante da cultura de células foi coletado após 72 horas de tratamento. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, em duplicata para as amostras de soro humano e triplicata para os sobrenadantes de células como controle intra-ensaio. A placa foi lida a 450 nm no Sistema GloMax® Discover (Promega, Madison, WI, EUA) e a absorbância foi obtida por densidade óptica. Os níveis de α Klotho solúvel foram determinados pela comparação com curva padrão da proteína recombinante α Klotho humana. O limite de sensibilidade do kit foi determinado em 50pg/ml.

4.4 Cultura Celular

As linhagens celulares MCF-7 e MDA MB-231 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Inicialmente estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo HEPES, bicarbonato de sódio, penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (FBS). Para a realização dos ensaios, a fim de evitar possível

interferência da ação hormonal sobre os receptores estrogênicos em estudo, realizou-se depleção hormonal durante 24 horas com meio RPMI 1640 livre de vermelho fenol, acrescido de 5% de FBS tratado com dextrano e carvão ativado para retirada de hormônios (DEMBINSKI; LEUNG; SHIU, 1985). As células foram cultivadas em ambiente úmido a 37°C com 5% de CO₂. Todos os ensaios foram realizados antes das células atingirem 80% de confluência.

4.5 Reagentes e Tratamentos

Após as células serem submetidas a 24 horas de depleção hormonal, administrouse para cada grupo em estudo seu respectivo reagente, sendo estes, o estradiol (E2) um agonista não específico de ER e o diarilpropionitrilo (DPN), um agonista específico do ER β , ambos na concentração de 10nM. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como veículo para as drogas e como reagente para o grupo controle. Todos os reagentes foram adquiridos da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). O tratamento ocorreu durante 48 horas para os ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) e durante 72hs para os ensaios de proliferação (MTT e decaimento de CFSE) e de ciclo celular.

4.6 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

As células foram cultivadas em placas de 48 poços e tratadas como supracitado. Após isso, a expressão gênica dos alvos propostos na linhagem MCF-7 foi avaliada por qPCR. Primeiramente o RNA total foi extraído utilizando o kit do Sistema de Isolamento de RNA SV Total no equipamento Maxwell[®] RSC Instrument (Promega, Madison, WI, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir do RNA total utilizando o kit de Transcrição Reversa do Sistema GoScript[™] (Promega, Fitchburg, WI, EUA) para um volume total de 20 μ l realizado no Termociclador SimpliAmp[™] (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). RNA e cDNA foram então quantificados por meio dos kits GoScript[™] RNA System e ssDNA System (Promega, Fitchburg, WI, USA) e a leitura realizada no Fluorometro Quantus[™] (Promega, Madison, WI, USA). Por fim, para a reação de qPCR foi utilizado o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e realizado no StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Todos os ensaios foram conduzidos de acordo com os protocolos dos fabricantes.

Os primers utilizados para amplificação estão descritos na Tabela 1. As sequências foram projetadas com a ferramenta Primer Quest (IDTDNA) e analisadas com o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A curva de eficiência foi realizada para todos os primers. 100ng de cDNA foi utilizado por reação, para um total de 40 ciclos. Os parâmetros das reações foram selecionados de acordo com o protocolo do fabricante. A expressão semiquantitativa foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando $\beta 2$ -microglobulina como gene endógeno e a amostra de referência foram as células não tratadas.

Tabela 1. Sequência dos primers para os genes alvo analisados por qPCR

Gene	Locus	Sequência do Primer
<i>αKlotho</i>	NM_004795.3	Fw: 5'-GCTCTCAAAGCCCACATACTG-3' Rv: 5'-GCAGCATAACGATAGAGGCC-3'
<i>$\beta 2$-microglobulina</i>	NM_004048	Fw: 5'-TATCCAGCGTACTCCAAAGA-3' Rv: 5'-GGATGAAACCCAGACACATAG-3'
<i>Ciclina D1 (CCND1)</i>	NM_053056.2	Fw: 5'-TCACGCTTACCTC-3' Rv: 5'-CTCTCGATACACACAACATCCA-3'
<i>P21</i>	NM_001291549.1	Fw: 5'-CCAGCCTCTGGCATTAGAATTA-3' Rv: 5'-CGGGATGAGGAGGCTTTAAATA-3'
<i>SNAIL</i>	NM_005985	Fw: 5'-CCACGAGGTGTGACTAACTATG-3' Rv: 5'-ACCAAACAGGAG GCTGAAATA-3'
<i>TWIST1</i>	NM_000474	Fw: 5'-CGGAGACCTAGATGTCATTGTTT-3' Rv: 5'-ACGCCCTGTTTCTTTGAATTTG-3'
<i>Vimentina</i>	NM_003380	Fw: 5'-ACTAGAGATGGACAGGTTATCA-3' Rv: 5'-GTAGGAGTGTGCGTTGTTAAG-3'
<i>ZEB1</i>	NM_001128128	Fw: 5'-CTCACATTCTCACTGCCTAAC-3' Rv: 5'-GAGAACATAGCTGAGCTCCATAAA-3'

4.7 Ensaio de proliferação por MTT

Para o ensaio MTT, após o tratamento as células foram incubadas com uma solução contendo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-17-tetrazólio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 5mg/ml em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Subsequentemente, 10 μ l de solução de MTT mais 90 μ l de meio RPMI 1640 sem vermelho fenol com 10% de FBS livre de hormônios foram adicionados para uma concentração final de 0,5mg/ml. As células foram então incubadas durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂, em ambiente úmido protegido da luz. Por fim, a solução de MTT foi retirada e 100 μ l de DMSO puro foram adicionados para a solubilização dos cristais de

formazan. A leitura foi feita usando o sistema GloMax® Discover (Promega, Madison, WI, EUA) a 570nm.

4.8 Ensaio de proliferação por decaimento de CFSE

Para o ensaio de proliferação por decaimento de CFSE, após o tratamento as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 livre de vermelho fenol a uma concentração de 5×10^5 células/ml. Posteriormente, CFSE (Invitrogen, Eugene, OR, USA) foi adicionado a uma concentração final de $5 \mu\text{M}$ e as células foram incubadas durante 15 minutos a 37°C em homogeneização constante. Após este período, as células foram lavadas novamente com PBS e a intensidade do CFSE foi avaliada no tempo zero. Na sequência, as células foram semeadas em placas de 12 poços por 72 horas na concentração de 5×10^4 células por poço. As análises foram feitas por citometria de fluxo no CytoFlex (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

Os dados gerados no citômetro de fluxo foram analisados no software FlowJo® (FlowJo LCC, Ashland, OR, EUA), seguindo a estratégia de *gates* exemplificadas na Figura 2. Cerca de 10000 eventos foram adquiridos. Inicialmente o *gate* MCF-7 (Figura 2A) foi dimensionado para delimitar a população desta linhagem celular por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), seguido pelo *gate singlets* (Figura 2B), delimitando apenas os eventos adquiridos isoladamente pelo citômetro, por FSC-A (área do parâmetro tamanho) e FSC-H (altura do parâmetro tamanho). Dentro desta subpopulação foi avaliada a diminuição gradativa da intensidade de fluorescência do CFSE (Figura 2C), em que um *gate* negativo foi determinado pelo sinal das células não marcadas com CFSE na hora 0, e o *gate* positivo pelo sinal das células marcadas com CFSE na hora 0. Ao centro do histograma se apresentam os sinais de fluorescência de CFSE emitido pelas células em seus diversos tratamentos após 72 horas, onde a diminuição deste sinal é inversamente proporcional a proliferação celular específica.

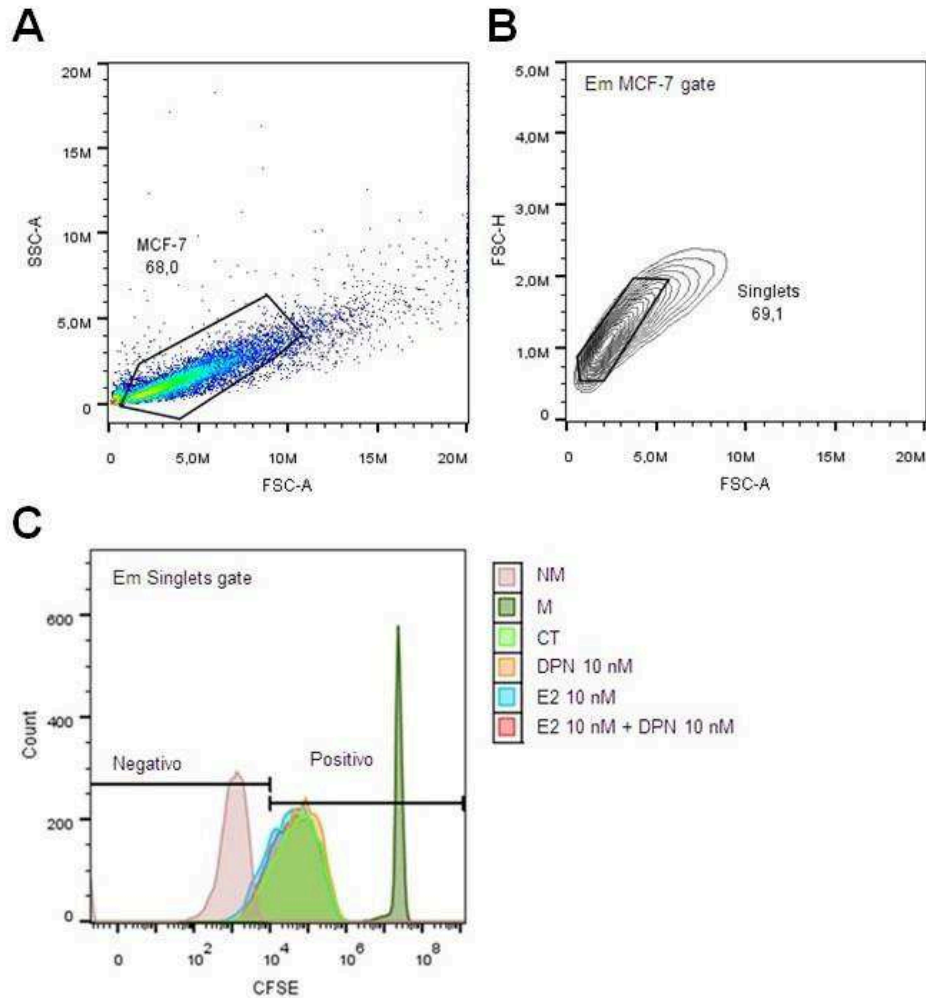


Figura 2. Estratégia de *gate* para o ensaio de proliferação por CFSE em linhagem celular MCF-7. (A) *gate* MCF-7 para delimitação da população viável destas células. (B) *gate singlets* para delimitação dos eventos isolados adquiridos. (C) Histograma para avaliação do decaimento da fluorescência de CFSE após 72 horas de tratamento. NM: células não maracadas em 0 horas (*gate* negativo), M: células marcadas em 0 horas (*gate* positivo) e CT: controle.

4.9 Ensaio de ciclo celular

Após 72 horas de incubação com os reagentes, as células foram tripsinizadas e lavadas em PBS. Estas foram então fixadas com paraformaldeído a 4% e incubadas durante 30 minutos a 8°C. Para a permeabilização 0,1% de TWEEN 20 e 1% de albumina de soro bovino (BSA) foram utilizados durante 10 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas novamente, 100µL de RNase foi adicionado a 1µg/ml e então foram incubadas por 30 minutos de 2 a 8°C. Subsequentemente, 100µl de iodeto de propídio (PI) foram adicionados a 1µg/ml e as células foram novamente incubadas a 8°C por 30 minutos. As amostras foram analisadas de acordo com o protocolo por citometria de fluxo

no CytoFlex (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), e os dados interpretados utilizando o software FlowJo® (FlowJo LCC, Ashland, OR, EUA).

4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS (versão 21 para Windows, SPSS Inc., Burlingame, CA, EUA) e GraphPad Prism 6.0 © (GraphPad Software Inc., 2007, San Diego, CA, EUA). A estatística descritiva foi utilizada para avaliação das características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes, sendo esses dados representados em números absolutos e relativos. Além disso, o teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar a homogeneidade entre os grupos (pacientes versus controle). O teste de normalidade de D'Agostino foi usado para determinar se o conjunto de dados (níveis séricos de Klotho) se encaixava em uma distribuição normal. Nas distribuições normais, o teste t com correção de Welch foi utilizado para comparar a média entre os grupos, e nas distribuições não normais, o teste U não-paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar a mediana entre dois grupos. A mediana global dos níveis séricos detectáveis de α Klotho nos indivíduos que compõe a amostra (pacientes e controles) foi determinada, 150pg/ml, e este valor foi utilizado como cut-off para classificação dos pacientes em “alta produção” de α Klotho solúvel para os valores acima e “baixa produção” para valores abaixo deste limiar. Para a análise de correlação (status ER versus status linfonodal) foi utilizado o teste exato de Fisher com avaliação de risco relativo. Finalmente, em análises de mais de dois grupos foi utilizado o teste one-way ANOVA com análise post hoc de Tukey. A significância estatística foi considerada em todas as análises se o alfa fosse menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Ativação do ER β aumenta expressão de α Klotho na linhagem MCF-7

Primeiramente, foi avaliada a influência dos ER na expressão do gene α Klotho em células tumorais de mama luminais MCF-7 e triplo negativas MDA MB-231. Estas células foram tratadas com E2, agonista ambíguo de ER, e DPN, agonista específico para o ER β . Ambos induziram a expressão de mRNA de α Klotho na linhagem MCF-7. No entanto, a ativação específica do ER β triplicou a expressão do gene α Klotho na comparação com o controle ($p < 0,01$) (Figura 3A). O mesmo não foi observado na linhagem MDA MB-231, na qual os agonistas não mostraram qualquer efeito sobre a expressão de α Klotho (Figura 3B).

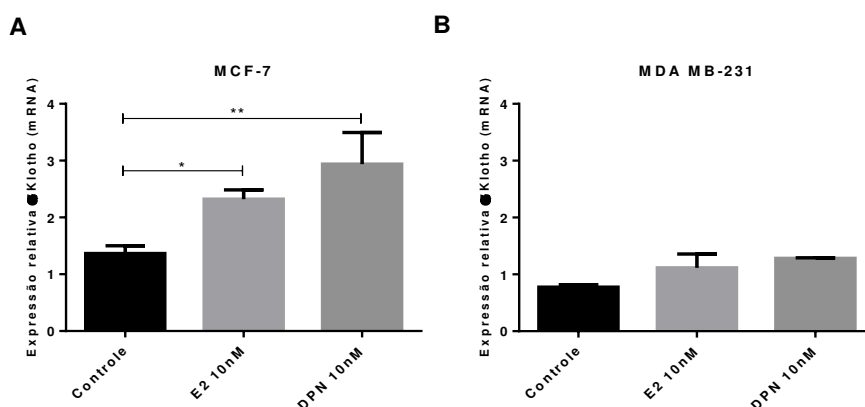


Figura 3. Expressão do mRNA de α Klotho após o uso de agonistas de ER em linhagens de câncer de mama. (A) Linhagem luminal de câncer de mama, MCF-7. (B) Linhagem triplo negativa de câncer de mama, MDA MB-231. Ambas linhagens foram incubadas com os reagentes dos respectivos tratamentos por 48 horas. As barras representam média \pm SEM ($n= 3$). Teste estatístico: One-way ANOVA, $p= 0,004$.

O sobrenadante das culturas de células MCF-7 e MDA MB-231 também foi avaliado para a presença de α Klotho solúvel por meio do ensaio imunoenzimático ELISA, no entanto, a proteína não foi detectada em nenhum dos grupos avaliados.

5.2 Ativação do ER β diminui a proliferação estimulada por E2 em células MCF-7

A expressão de α Klotho aumentou em células MCF-7 após estímulo do ER β . Uma vez que α Klotho possui ações antiproliferativas bem definidas, avaliamos se este mesmo perfil é válido para ER β nesta linhagem luminal após ativação por seu agonista específico. Para isso, foram realizados ensaios de proliferação por MTT (Figura 4) e decaimento de

CFSE (Figura 5). As células MCF-7 expostas a E2 proliferaram, enquanto as células expostas ao DPN não apresentaram alteração em ambos ensaios. No entanto, na exposição conjunta a ambos os agonistas, foi observada uma diminuição da proliferação celular estimulada por E2 (Figuras 4 e 5B).

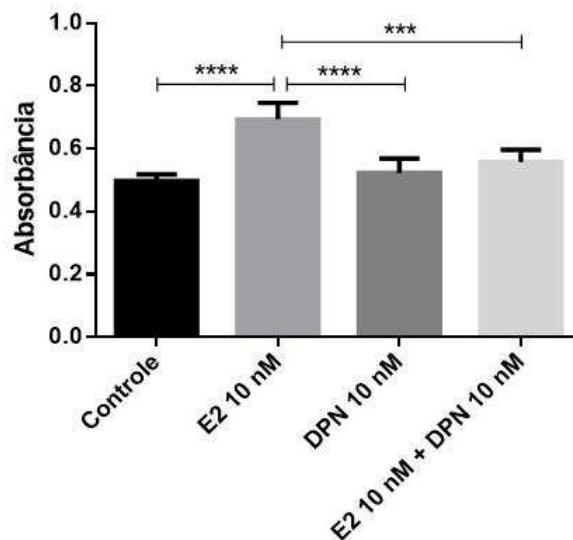


Figura 4. Ensaio de proliferação por MTT em linhagem MCF-7. As células foram incubadas com os reagentes dos respectivos tratamentos por 72 horas. A proliferação foi avaliada por MTT. Barras representam média \pm SEM (n= 5). Teste estatístico: One-way ANOVA, $p < 0,0001$.

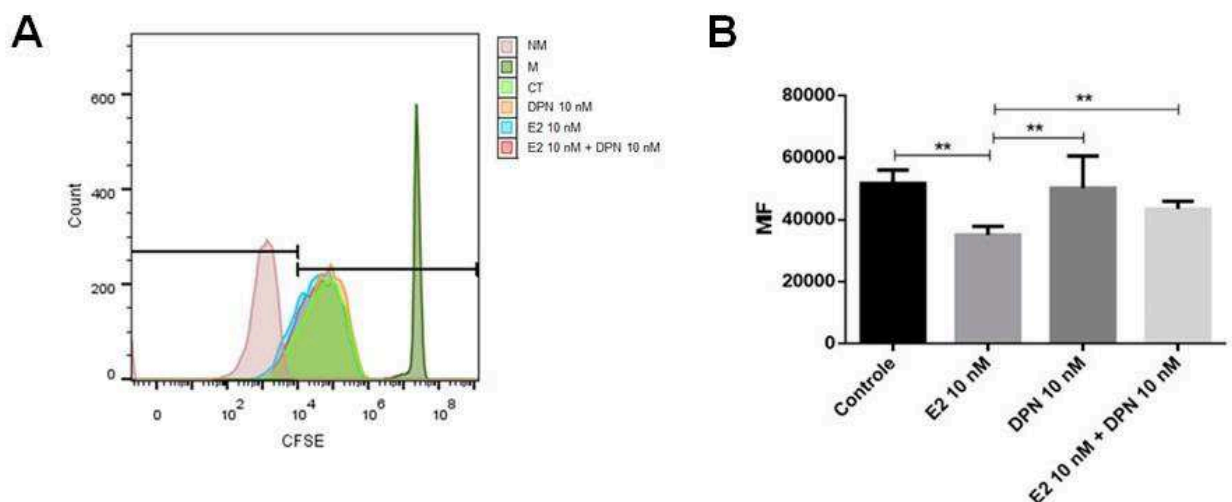


Figura 5. Ensaio de proliferação por decaimento de CFSE em linhagem MCF-7. As células foram incubadas com os reagentes dos respectivos tratamentos por 72 horas. Proliferação avaliada pelo decaimento da CFSE. (A) Histograma, NM: células não marcadas em 0 horas, M: células marcadas em 0 horas e CT: controle. (B) Gráfico de barras representativo. Barras representam média \pm SEM (n=6). Teste estatístico: One-way ANOVA, $p = 0,0012$.

5.3 Ativação do ER β causa parada do ciclo celular e aumento da expressão de p21

Para confirmação do perfil proliferativo do ER β foi realizado ainda o ensaio de ciclo celular e avaliada a expressão de genes relacionados à regulação deste ciclo, ciclina D1 (CCND1) e p21. Ficou evidenciado que o tratamento com DPN na linhagem MCF-7 aumentou a porcentagem de células na fase G1 (Figuras 6A e 6B), enquanto diminuiu na fase G2/M (Figuras 6A e 6D), $p < 0,0001$.

Além disso, a ativação do ER β também levou ao aumento da expressão do gene p21, regulador de transição de fases G1/S, $p < 0,01$ (Figura 7B), o mesmo não foi observado para ciclina D1 (Figura 7A).

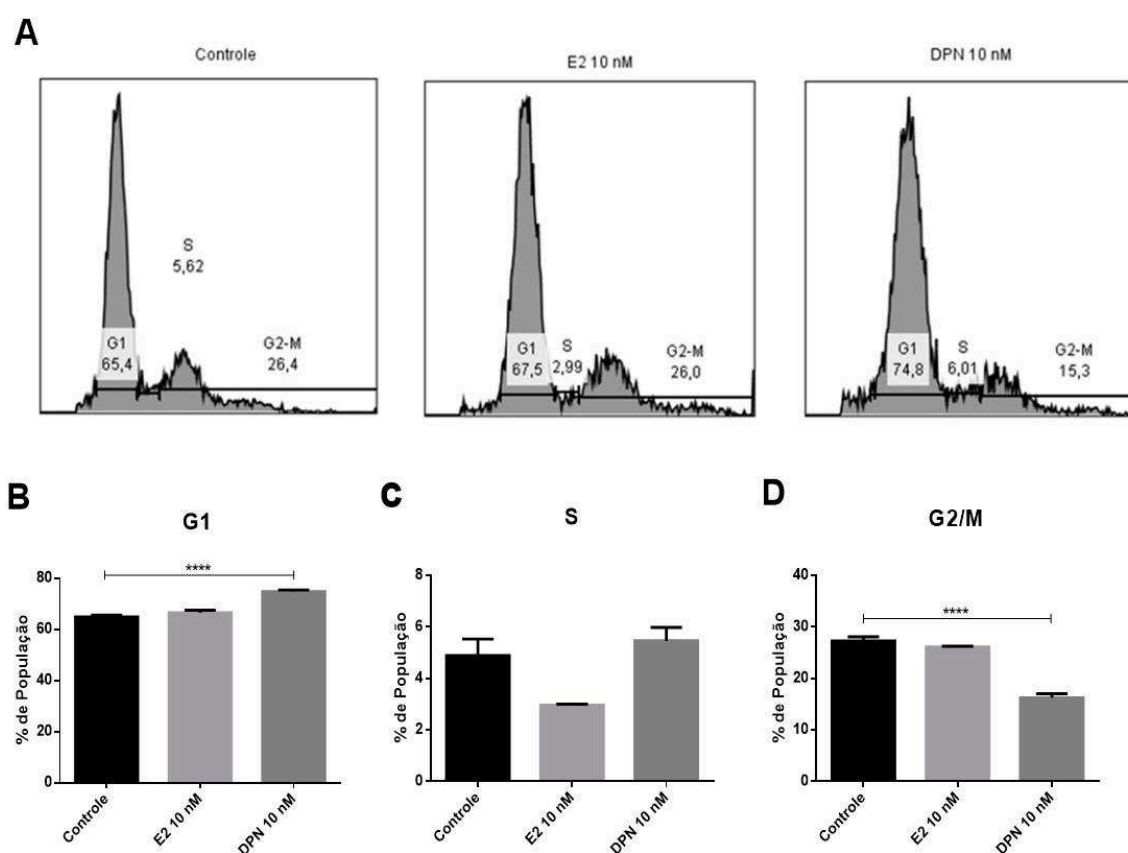


Figura 6. Ciclo celular após estímulo de agonistas dos ER na linhagem MCF-7. (A) Histograma evidenciando as alterações nas porcentagens de células nos grupos controle, E2 e DPN. (B-D) Gráficos mostrando as significâncias estatísticas no aumento ou diminuição de células nas fases G1 (B), S (C) e G2/M (D). As células foram incubadas com os reagentes dos respectivos tratamentos por 72 horas. As barras representam média \pm SEM ($n = 3$). Teste estatístico: One-way ANOVA, $p < 0,0001$.

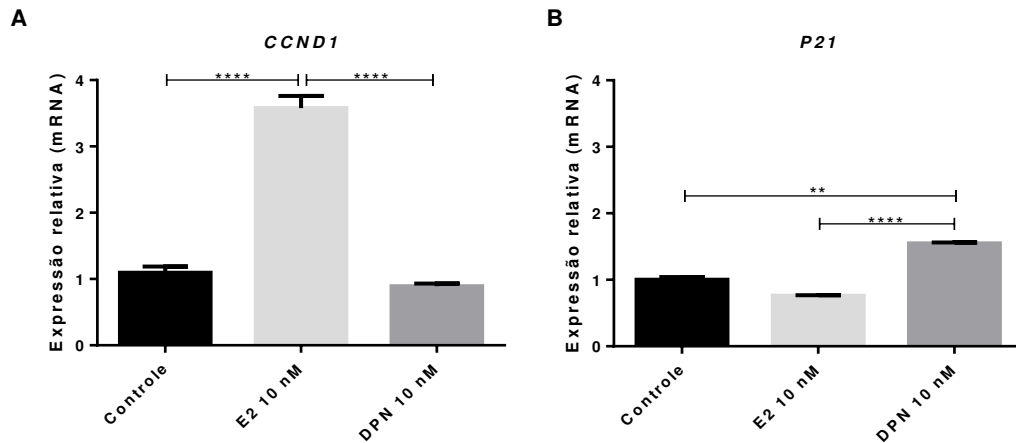


Figura 7. Expressão relativa do mRNA de reguladores do ciclo celular após ativação dos ER em MCF-7. (A) CCND1 e (B) P21 em MCF-7 após o agonismo de ER β . O estradiol (E2) foi utilizado como controle positivo. As células foram incubadas com os reagentes dos respectivos tratamentos por 48 horas. As barras representam média \pm SEM (n= 3). Teste estatístico: One-way ANOVA, p <0,0001.

5.4 Ativação do ER β leva a diminuição de marcadores de EMT em células MCF-7

A fim de confirmar o perfil antitumoral do ER β , avaliamos também a influência da sua ativação sobre o evento de EMT em células MCF-7, verificando a expressão gênica dos fatores de transcrição SNAIL, TWIST1 e ZEB1, além da vimetina (Figura 8).

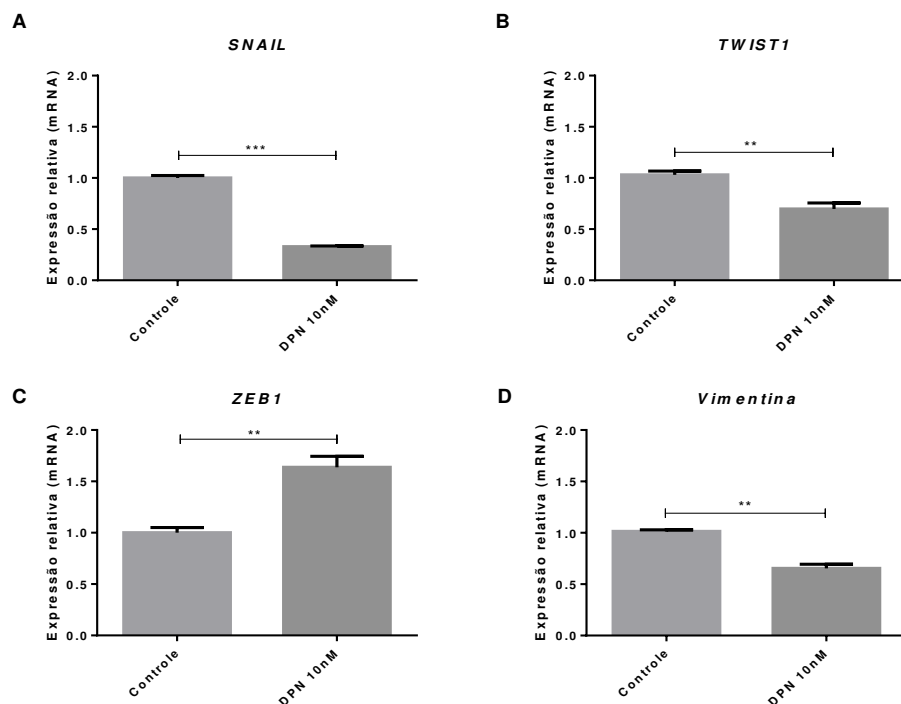


Figura 8. EMT/MET após o agonismo de ER β na linhagem MCF-7. Expressão gênica dos fatores de transcrição de EMT (A-C) e um produto final confiável de EMT, vimentina, (D). Os tratamentos ocorreram por 48 horas. As barras representam média \pm SEM (n= 3). Teste estatístico: teste t de Student, p= 0,0002 (A), p= 0,0085 (B), p= 0,0086 (C) e p= 0,0011 (D).

As células tratadas com DPN mostraram uma diminuição na expressão gênica dos transcritos de SNAIL e TWIST1, $p=0,0002$ e $p=0,0085$, respectivamente (Figura 8A-B), combinada com diminuição da expressão de vimentina, um marcador confiável de EMT, $p= 0,0011$ (Figura 8D), evidenciando um perfil relacionado ao evento de transição mesênquima-epitélio (MET).

5.5 Análise em pacientes com câncer de mama: caracterização da amostra

Em uma segunda etapa, utilizando amostras de soro humano de pacientes com câncer de mama, foram analisados os níveis de α Klotho solúvel e estes correlacionados com parâmetros histopatológicos e imuno-histoquímicos de prognóstico, buscando confirmar o perfil desta proteína para os tumores mamários, bem como, verificar se a relação encontrada nas linhagens de células luminais de câncer de mama entre ER β e α Klotho se faz verdadeira no contexto das amostras humanas.

Foram selecionadas e analisadas amostras de soro de 75 pacientes com câncer de mama e 63 familiares saudáveis (grupo controle). A faixa de idade encontrada nas pacientes foi de 31 a 79 anos, enquanto que a idade no grupo controle variou de 34 a 68 anos.

Tabela 2. Características demográficas e clínicas entre pacientes com câncer de mama e grupo controle.

		Pacientes	Controles	
		N (%)		
		75 (100)	63 (100)	<i>p</i> valor
<i>Idade (anos)</i>	≤ 50	37 (49,3)	29 (46,0)	0,699
	> 50	38 (50,7)	34 (54,0)	
<i>Raça/cor</i>	<i>Branca</i>	31 (41,3)	43 (68,3)	0,006*
	<i>Preta</i>	9 (12,0)	5 (7,9)	
	<i>Parda</i>	35 (46,7)	15 (23,8)	
<i>Status Menopausal</i>	<i>Pré menopausa</i>	31 (41,3)	17 (27,0)	0,078
	<i>Pós menopausa</i>	44 (58,7)	46 (73,0)	

Dados apresentados em números absolutos (N) e relativos (%). Teste estatístico: o qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar a homogeneidade entre os grupos. * A significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

Os grupos em estudo apresentaram uma distribuição homogênea, exceto para a variável raça, com maioria parda entre as pacientes (46,7%) enquanto que o grupo controle é formado em grande parte por mulheres brancas (68,3%), como demonstrado na Tabela 2.

A caracterização dos pacientes de acordo com dados clínicos é apresentada na Tabela 3. Tumores com tamanho entre 2cm e 5cm (T2, 36,78%), moderadamente diferenciados (Grau 2, 65,52%), com pelo menos um linfonodo positivo (52,87%) foram mais prevalentes. Além disso, os tumores ER-positivos foram predominantes (58,63%) em comparação com outros marcadores imuno-histoquímicos, como HER2 e PgR.

Tabela 3. Características imuno-histoquímicas e histopatológicas das pacientes com câncer de mama.

	Pacientes	N (%)
<i>Idade no diagnóstico (anos)</i>		
	<i>≤ 50</i>	37 (49,3)
	<i>> 50</i>	38 (50,7)
<i>Tamanho do tumor*</i>	<i>T1</i>	12 (16,0)
	<i>T2</i>	28 (37,3)
	<i>T3</i>	18 (24,0)
	<i>T4</i>	17 (22,7)
<i>Grau histológico</i>	<i>1</i>	4 (5,3)
	<i>2</i>	48 (64,0)
	<i>3</i>	23 (30,7)
<i>Status linfonodal</i>	<i>Negativo</i>	36 (48,0)
	<i>Positivo</i>	39 (52,0)
<i>Status de ER</i>	<i>Negativo</i>	36 (48,0)
	<i>Positivo</i>	39 (52,0)
<i>Status de PgR</i>	<i>Negativo</i>	46 (61,3)
	<i>Positivo</i>	29 (48,7)
<i>Status de HER2</i>	<i>Negativo</i>	52 (69,3)
	<i>Positivo</i>	23 (30,7)

Dados apresentados em números absolutos (N) e relativos (%). * O tamanho do tumor foi classificado como ≤2cm (T1), 2-5cm (T2), >5cm (T3) e qualquer tamanho com invasão de estruturas adjacentes (T4). ER: receptor de estrogênio, PgR: receptor de progesterona, HER2: receptor fator de crescimento epidérmico 2.

5.6 Níveis séricos de α Klotho são maiores em indivíduos saudáveis e em pacientes com tumores iniciais de mama

Em uma primeira análise buscou-se avaliar os níveis séricos de α Klotho na comparação entre o grupo das pacientes com câncer de mama e o grupo controle (Figura 9A). Ficou evidenciado que o grupo controle, formado por mulheres saudáveis, apresentou níveis maiores de α Klotho solúvel do que o grupo das pacientes diagnosticadas com câncer de mama ($p=0,04$). Posteriormente, as pacientes foram divididas para a comparação de acordo com o estágio do tumor que apresentavam, classificados em inicial ou avançado (Figura 9B). Pacientes com tumores iniciais apresentaram níveis séricos mais elevados de α Klotho solúvel do que pacientes com tumores avançados ($p=0,03$).

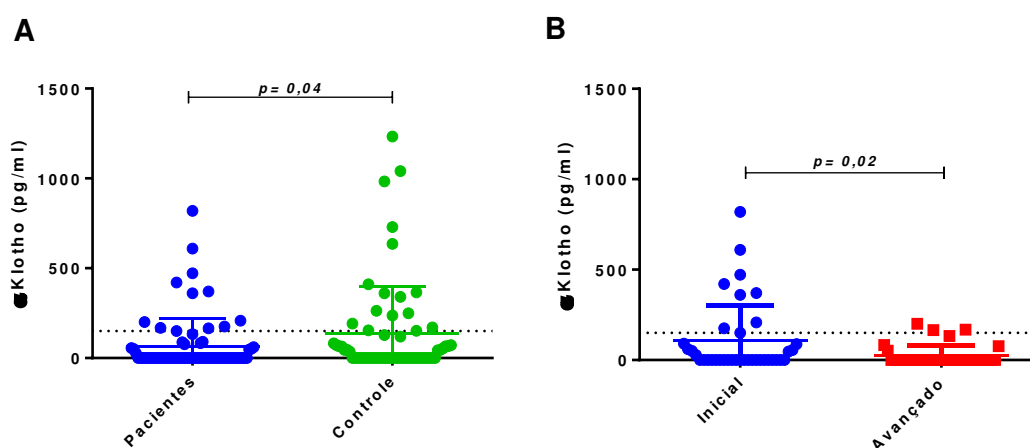


Figura 9. Níveis séricos de α Klotho em controles saudáveis e pacientes com câncer de mama. (A) Comparação de α Klotho solúvel entre pacientes ($n=75$) e grupo controle ($n=63$). (B) Comparação de α Klotho solúvel de acordo com o estágio do tumor. A classificação TNM foi considerada para a estratificação dos tumores das pacientes em inicial ($n=38$) e avançada ($n=37$). Os resultados são expressos como mediana, IC 95%. Linha pontilhada representa o cut-off de 150pg/ml que determina baixa ou alta produção de α Klotho solúvel. Teste estatístico: o teste U de Mann-Whitney foi utilizado e a significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

5.7 Pacientes com tumores ER-positivos apresentaram níveis séricos elevados de α Klotho

Posteriormente, baseado na importância dos receptores hormonais e de fatores de crescimento na carcinogênese da mama, somado aos resultados obtidos em cultura celular com a linhagem MCF-7 em que os ER ativados aumentaram a expressão de α Klotho (Figura 3A), buscou-se avaliar os níveis séricos desta proteína de acordo com a positividade dos marcadores imuno-histoquímicos do tumor, ER, PgR e HER2 (Figura 10). Pacientes com tumores ER-positivos apresentaram maiores níveis séricos de α Klotho

do que pacientes ER-negativos ($p=0,03$), como mostra a figura 7A. Este fato não foi observado para os status de PgR e HER2 (Figuras 10B e 10C).

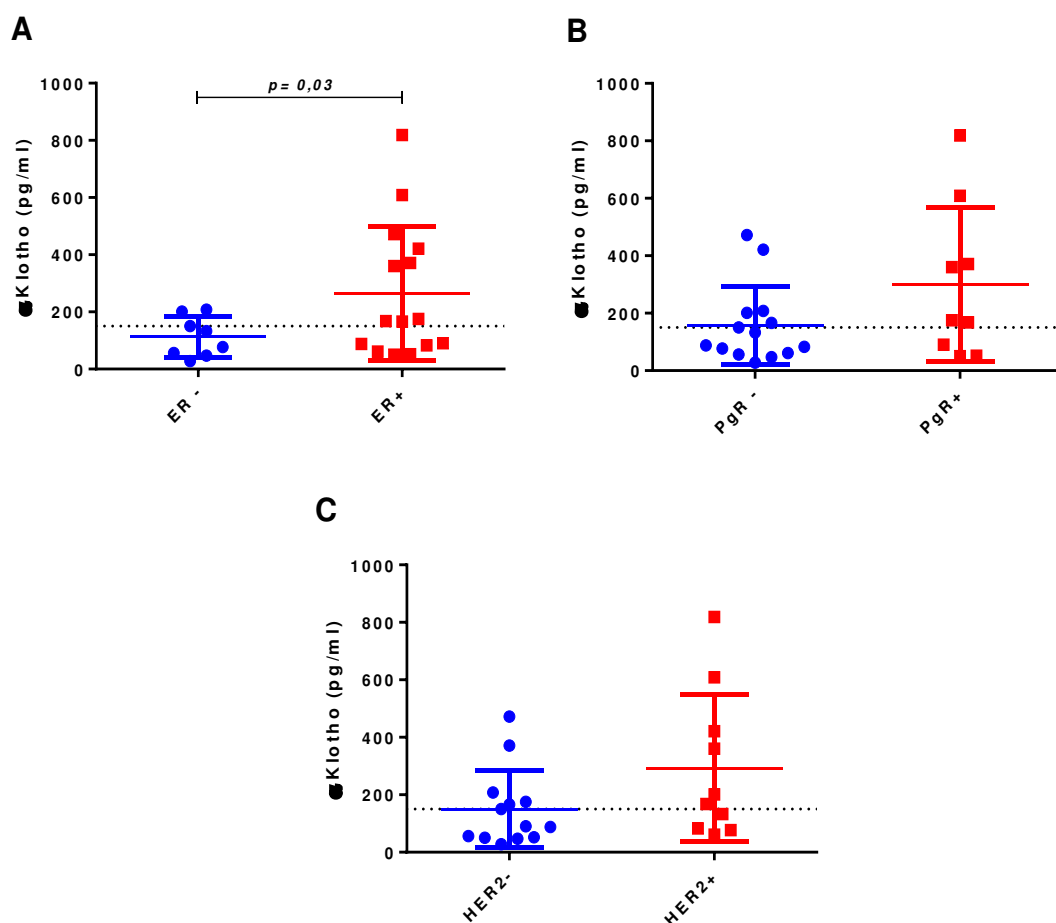


Figura 10. Níveis séricos de α Klotho em pacientes com câncer de mama de acordo com marcadores imuno-histoquímicos. (A) ER: receptor de estrogênio alfa, (B) PgR: receptor de progesterona e (C) receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2). A análise foi realizada com todos os pacientes que apresentaram níveis detectáveis α Klotho solúvel ($n=23$). Linha pontilhada representa o cut-off de 150pg/ml que determina baixa ou alta produção de α Klotho solúvel. Testes estatísticos: o teste t com correção de Welch foi utilizado para o status de ER com resultados expressos em média \pm DP e o teste U de Mann-Whitney para PgR e HER2 com resultados expressos em mediana, IC95%. Significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

5.8 Níveis séricos de α Klotho são maiores em pacientes com tumores de mama luminais

Uma vez que os níveis séricos de α Klotho estão elevados em pacientes com tumores ER-positivos (Figura 10A) e que a ativação destes receptores levou ao aumento da expressão de α Klotho na linhagem luminal de câncer de mama, fato não evidenciado na linhagem triplo-negativa (Figura 3), foi analisado α Klotho solúvel no soro destas pacientes de acordo com o subtipo molecular do tumor (Figura 11). Esta classificação foi

baseada na positividade dos marcadores imuno-histoquímicos supracitados, ER, PgR e HER2. Pacientes com tumores luminais apresentaram maiores níveis séricos de α Klotho do que pacientes com tumores triplo-negativos ($p=0,03$).

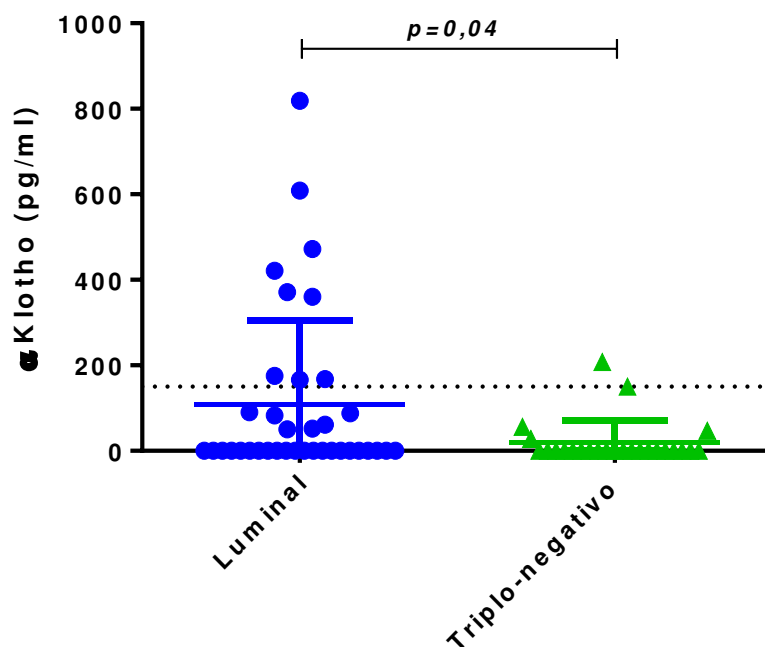


Figura 11. Níveis séricos de α Klotho em pacientes com câncer de mama de acordo com os subtipos moleculares do tumor. A classificação dos pacientes de acordo com os subtipos moleculares em luminal (n= 37) e triplo-negativo (n= 25) foi baseada no Consenso de St. Gallen. Os resultados estão expressos como mediana, IC95%. Linha pontilhada representa o cut-off de 150pg/ml que determina baixa ou alta produção de α Klotho solúvel. Teste estatístico: o teste U de Mann-Whitney foi utilizado e a significância estatística foi considerada em $p < 0.05$.

5.9 Pacientes positivos para α Klotho solúvel apresentam menores taxas de Ki67

Com a finalidade de avaliar o perfil de proliferação apresentado pelos tumores das pacientes com α Klotho solúvel, a relação entre a produção de α Klotho sérico e as taxas tumorais do marcador imuno-histoquímico de proliferação Ki67 foi analisada. Para tal, foi determinado o cut-off de 150pg/ml, baseado na mediana global dos níveis séricos detectáveis de α Klotho encontrados na amostra. Pacientes que não produziram α Klotho solúvel apresentaram índices consideravelmente maiores de proliferação tumoral por Ki67 do que as pacientes com baixa ($p=0,04$) ou alta produção de α Klotho ($p=0,03$). A presença de α Klotho no soro foi então relacionada a baixas taxas de proliferação por Ki67, independentemente dos níveis de produção desta proteína, uma vez que não houve diferença entre as pacientes com baixos e altos níveis de α Klotho solúvel (Figura 12).

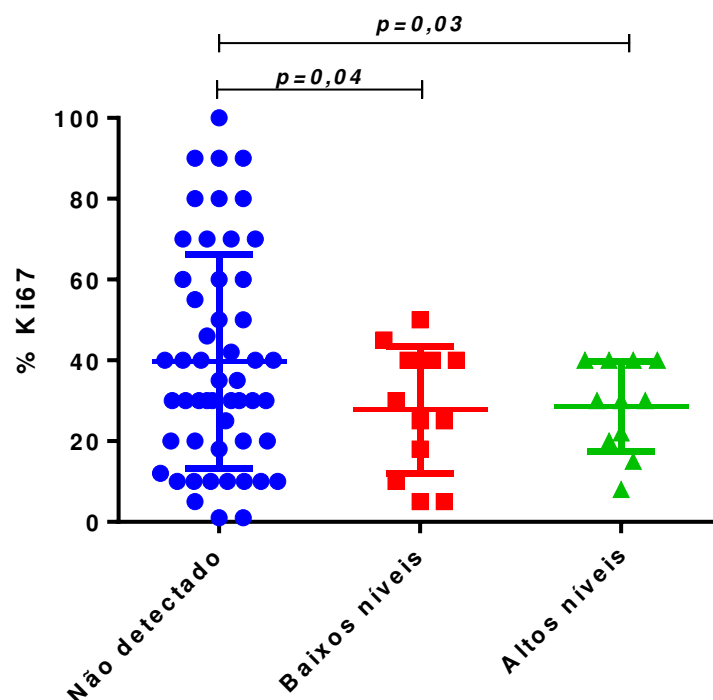


Figura 12. Porcentagem de Ki67 de acordo com a produção de α Klotho solúvel no soro de pacientes com câncer de mama. Pacientes foram consideradas com baixa produção (n=12) quando apresentavam níveis de α Klotho solúvel abaixo do cut-off de 150pg/ml, enquanto que as pacientes com alta produção (n=11) apresentavam níveis de α Klotho solúvel acima de 150pg/ml, também compõem a análise as pacientes sem produção de α Klotho solúvel no soro (n=52). Os resultados são expressos como média \pm DP. Teste estatístico: teste t com correção de Welch foi utilizado e a significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

5.10 Pacientes sem comprometimento linfonodal apresentam maiores níveis de α Klotho

Subsequentemente, buscou-se avaliar os níveis séricos de α Klotho de acordo com o perfil de disseminação do tumor, baseado na presença de metástases linfonodais (Figura 13). Ficou evidenciado que pacientes sem comprometimento metastático nos linfonodos apresentaram níveis de α Klotho solúvel em soro maiores do que as pacientes com sítios tumorais secundários positivos para linfonodos ($p=0,03$).

5.11 Pacientes com tumores ER-negativos apresentam maior risco de metástase linfonodal

Por fim, com base nos resultados dos níveis elevados de α Klotho solúvel apresentados por pacientes com tumores ER-positivos e pacientes sem comprometimento linfonodal, a associação e o risco relativo desses fatores foram determinados (Tabela 4). Houve correlação entre a negatividade para ER e a progressão da doença para os linfonodos

($p=0,0054$). Pacientes com tumores ER-negativos têm um risco 93,5% maior de desenvolver metástases linfonodais do que aqueles com tumores ER-positivos ($RR=1,935$).

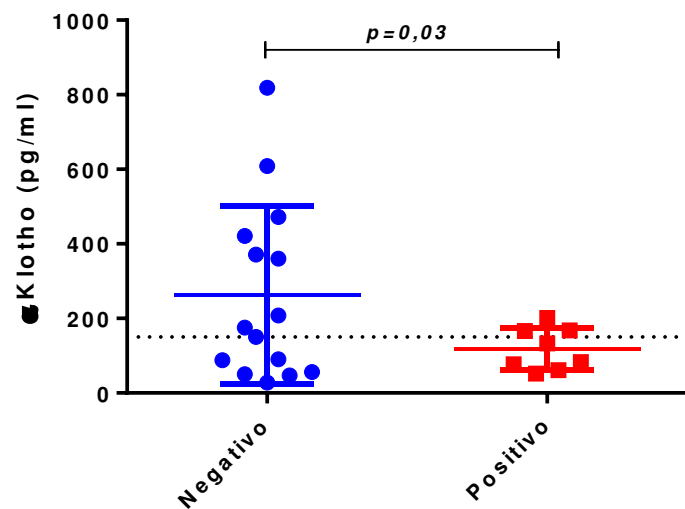


Figura 13. Níveis séricos de α Klotho de acordo com comprometimento linfonodal. Pacientes positivas (n=8) e negativas (n=15) para metástases em linfonodos estão ilustradas na figura. A análise foi realizada com todos os pacientes que apresentaram níveis detectáveis α Klotho solúvel (n=23). Linha pontilhada representa o cut-off de 150pg/ml que determina baixa ou alta produção de α Klotho solúvel. Teste estatístico: o teste t com correção de Welch foi utilizado, resultados expressos em média \pm DP. Significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

Tabela 4. Correlação entre status de ER *versus* status linfonodal.

		Status linfonodal		Total
		Positivo	Negativo	
Status de ER	Negativo	25	11	36
	Positivo	14	25	39
Total		39	36	75

A tabela de contingência 2x2 representa o grau de correlação entre as duas variáveis categóricas independentes, o status ER e o comprometimento linfonodal, observados como positivos e negativos. Teste estatístico: teste exato de Fisher, $p=0,0054$, $RR=1,935$.

6 DISCUSSÃO

Esse trabalho identificou a relação entre a proteína α Klotho e o ER β pela primeira vez no contexto do câncer de mama. Estudos anteriores demonstraram várias ações antitumorais de α Klotho, tais como inibição da proliferação, inibição do crescimento, indução de apoptose e autofagia (DAI et al., 2015; MENCKE; OLAUSON; HILLEBRANDS, 2017; SHU et al., 2013). Os receptores hormonais também têm sua importância estabelecida no diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer de mama, especialmente o ER α (KARAMOUZIS et al., 2016; ROTHENBERGER; SOMASUNDARAM; STABILE, 2018). O ER β , no entanto, não tem sua influência bem estabelecida no que diz respeito a tumorigênese da mama, exceto por ações antagônicas ao ER α já comprovadas, associadas a um bom prognóstico, a uma boa resposta ao tratamento e a maior sobrevida (HALDOSEN et al., 2014; LEUNG et al., 2012; TAN et al., 2016).

Em um primeiro momento, como forma de desvendar esta relação entre os receptores de estrogênio e a expressão de α Klotho, foi realizada uma análise *in vitro* utilizando duas linhagens celulares de câncer de mama, a linhagem luminal MCF-7 e a linhagem triplo-negativa MDA MB-231 como controle. A expressão do gene α Klotho foi aumentada em células MCF-7 após a estimulação com E2 e DPN, sendo que o DPN, um agonista específico de ER β , foi mais eficiente em induzir a produção de α Klotho, o que reforça a tese de um perfil antitumoral por parte deste receptor em células luminais. Esta interação foi observada também em um estudo com neurônios do hipocampo de ratos ooforectomizados, que evidenciou o aumento na expressão do gene α Klotho após tratamento sistêmico com DPN nestes animais, gerando um ambiente de neuroproteção (SÁRVÁRI et al., 2016). Por sua vez, a expressão de α Klotho em células MDA MB-231 não sofreu alteração após incubação com os agonistas.

No entanto, apesar do aumento da expressão gênica, a proteína α Klotho solúvel não foi detectada nos sobrenadantes de nenhuma das linhagens pesquisadas após o agonismo do ER β . As principais proteínas responsáveis pela clivagem do α Klotho da membrana celular são *shedases*, especificamente ADAM10 e ADAM17, funcionando como um mecanismo regulatório pós-traducional. Estas *shedases* sofrem um estímulo por parte da insulina, o que acarreta um aumento da liberação de α Klotho da membrana. Esta proteína solúvel atua como um feedback negativo dos efeitos biológicos da insulina,

uma vez que é forte inibidor de sua via de sinalização, a IGF-1/insulina (BLOCH et al., 2009). A condição do meio de cultura utilizado nos ensaios do presente estudo, em que foi realizada a depleção hormonal, pode então ter afetado a liberação de α Klotho da membrana das células (CHEN, C. D. et al., 2007).

Demonstrado que a ativação de ER β aumenta a expressão de α Klotho em células MCF-7, o real perfil deste receptor para a proliferação e disseminação das células luminais de câncer de mama foi avaliado. Inicialmente foram realizados ensaios de proliferação em células MCF-7 após a ativação dos ER. Foi evidenciado que apesar de não gerar um efeito antiproliferativo direto, o agonismo de ER β foi capaz de diminuir a proliferação causada por E2, agonista ambíguo. Esses achados evidenciam uma possível ação antagônica do ER β , mostrando a capacidade em inibir efeitos pró-tumorais gerados por ER α , fato já demonstrado por diversos estudos (HARTMAN; STRÖM; GUSTAFSSON, 2009; LEUNG et al., 2012; OMOTO; IWASE, 2015). Além disso, no ciclo celular, foi observado um acúmulo de células na fase G1 e diminuição na fase G2/M após ativação do ER β . Estes achados, somados ao aumento na expressão da proteína p21, regulador de transição de fase G1/S (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016), confirma o perfil antiproliferativo do ER β .

De forma semelhante ao ER β , α Klotho tem ações antiproliferativas em vários tipos de tumores. A superexpressão de α Klotho em linhagem celular de câncer de pulmão levou ao acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo celular, mostrando uma tendência decrescente de células em G2/M (WANG; CHEN et al., 2011). No câncer gástrico, por outro lado, a superexpressão de α Klotho levou à inibição do crescimento com expressão aumentada de p21 (WANG; WANG et al., 2011). O aumento da isoforma β Klotho, da mesma forma, levou à parada do ciclo celular na fase G1, resultando em um efeito antiproliferativo no hepatocarcinoma (YE et al., 2013).

As ações antiproliferativas de α Klotho são evidenciadas principalmente pela inibição da via do IGF-1/insulina (RUBINEK, T.; MODAN-MOSES, 2016; WOLF et al., 2008). O ER β já demonstrou ter reatividade cruzada com esta via no câncer de mama. Estudos anteriores mostraram que após a regulação positiva de ER β em células MCF-7, a expressão de IGF-1R diminuiu gradualmente, assim como sua inativação aumentou (CHEN, J. et al., 2014; CHEN, J. et al., 2013). Esses achados sugerem fortemente a participação de ER β e α Klotho nos perfis antiproliferativos, uma vez que o ER β aumenta a expressão de α Klotho e ambos exercem efeitos reguladores sobre a via do IGF-1/insulina, ligada à proliferação celular e ao crescimento do câncer de mama

(CHRISTOPOULOS; MSAOUEL; KOUTSILIERIS, 2015; DUPONT, 2001; EKYALONGO; YEE, 2017).

Sabe-se que o processo de EMT leva a alterações morfológicas que facilitam a geração de células-tronco cancerígenas (CSC), com características mesenquimais e auto renováveis que favorecem a disseminação e o estabelecimento de sítios tumorais secundários (HOLLIER; EVANS; MANI, 2009; REIMAN; KNUTSON; RADISKY, 2010; WANG, YIFAN; ZHOU, 2011). Estudos recentes mostram que a indução da EMT pela via do TGF- β aumenta a capacidade das células do câncer de se espalharem pelo sistema linfático (KARLSSON et al., 2017; PANG et al., 2016). Além disso, Markiewicz et al (2014) mostraram que as células metastáticas linfonodais apresentam maior expressão de TWIST1, SNAIL1 e SNAIL2 do que células primárias de tumores de mama.

Para verificar se o agonismo de ER β está ligado à EMT, marcadores relacionados com este evento foram avaliados após a ativação do ER β em MCF-7. A exposição de células MCF-7 ao DPN diminuiu a expressão gênica dos fatores de transcrição SNAIL, TWIST1 e vimentina, evidenciando a supressão da EMT e ações compatíveis com a promoção do evento contrário, denominado de transição mesênquima-epitelial (MET), o que expõe um perfil protetor do ER β contra a disseminação para sítios tumorais secundários. Estudos prévios com células MCF-7 já haviam demonstrado a regulação de fatores relacionados à EMT por parte do ER β (MAK et al., 2013; VOUTSADAKIS, 2016). Similarmente a este, α Klotho possui atividade anti-EMT por inibição das vias TGF- β 1, IGF-1 e Wnt, com diminuição da expressão a jusante de marcadores de EMT, como E-caderina, SNAIL 1 e 2, e vimentina em vários tipos de câncer, como renal, pulmonar, ovário e colo uterino (CHANG, B. et al., 2012; CHEN, B. et al., 2010; DOI et al., 2011; LANDOLT et al., 2017; LIU et al., 2007; LOJKIN et al., 2015).

Na segunda etapa do estudo, buscou-se confirmar a relação de α Klotho com contextos clínicos de melhor prognóstico por meio da pesquisa de sua forma solúvel no soro de pacientes com câncer de mama, bem como verificar se os achados evidenciados em cultura celular, no que tange a relação com o ER β , se mostram verdadeiros também em amostras humanas.

Os dados iniciais evidenciaram que mulheres saudáveis apresentam níveis séricos mais elevados de α Klotho solúvel do que pacientes com câncer de mama. Fato bem consolidado na literatura, na qual α Klotho, enquanto um hormônio circulante, é descrito em maiores níveis para indivíduos saudáveis, mais jovens e em condições clínicas de melhor prognóstico (ALSOFYANI et al., 2017; CHEN, C. D. et al., 2014; CRASTO et

al., 2012; DALTON et al., 2017; IMURA et al., 2004; XIAO et al., 2004; XUAN, N. T.; HAI, 2018).

Na análise que toma por base o estágio tumoral em inicial ou avançado, o grupo de pacientes que apresentavam tumores da mama em estágio inicial mostravam níveis maiores de α Klotho solúvel sérico em comparação com o grupo das pacientes com tumores avançados. Estes mesmos resultados foram encontrados em estudos de carcinoma hepatocelular e carcinoma renal de células claras, onde pacientes em estágios tumorais mais avançados apresentaram uma menor concentração de α Klotho em comparação com os estágios iniciais do tumor (KIM, J. H. et al., 2016; TANG, X. et al., 2016). No câncer de mama, o gene α Klotho tende a ser hipermetilado durante a transformação maligna, o que inibe sua expressão, fazendo com que esta proteína seja mais abundante em tecidos mamários normais (LIGUMSKY et al., 2015; RUBINEK, TAMI et al., 2012). Este evento é explicado pelo fato de α Klotho mostrar potente inibição de vias importantes na carcinogênese, levando a diminuição do crescimento e da progressão tumoral. Com isso, o silenciamento de α Klotho, funciona como uma manobra de resistência por parte das células tumorais (LIU et al., 2007; WOLF et al., 2008).

A relação entre α Klotho solúvel e marcadores imuno-histoquímicos, como receptores hormonais e de fatores de crescimento, também foi avaliada. Níveis séricos elevados de α Klotho solúvel foram observados em pacientes com tumores ER-positivos. Os receptores hormonais, com destaque para os receptores de estrogênio, são importantes na classificação e definição da terapia nos tumores de mama (DUNNWARD; ROSSING; LI, 2007; ONITILO et al., 2009; UNTCH et al., 2013). A grande maioria das triagens feitas em biópsias para a presença destes receptores privilegia a pesquisa do ER α , uma vez que sua ação é melhor delineada na literatura e mais determinante para a tomada de decisões clínicas por parte dos oncologistas nos dias atuais (ALI; COOMBES, 2000; GIULIANO et al., 2018). Os laudos de imuno-histoquímica das pacientes em estudo também foram baseados na marcação com anticorpo específico para o ER α , especificamente o clone 6F11, no entanto, este anticorpo reconhece o comprimento total do ER α e não um epítipo específico, comprimento este homólogo ao do ER β , sendo o domínio N-terminal o principal ponto de diferença entre estes dois receptores, sítio que não é atingido pelo clone utilizado (ASCENZI; BOCEDI; MARINO, 2006; DELISLE et al., 2001). Um estudo para distinção de sítios metastáticos da mama de tumores pulmonares iniciais demonstrou que o anticorpo 6F11 apresenta reatividade cruzada com o ER β (GOMEZ-FERNANDEZ et al., 2010). Estes dados mostram que os níveis elevados

de α Klotho solúvel encontrados nas pacientes com tumores ER-positivos podem não ser produto exclusivamente do ER α , mas também da presença de ER β , o que estaria em acordo com os resultados encontrados na linhagem MCF-7 para a expressão de α Klotho após ativação deste receptor. Contudo, esta afirmação não poder feita com base apenas nestes dados, uma vez que não foi realizada marcação do ER β nos laudos disponíveis no sistema hospitalar.

Os tumores ER-positivos são classificados em luminais, de acordo com o subtipo molecular, sendo considerados subtipos de bom prognóstico e melhor resposta terapêutica (KIM, H.-S. et al., 2012; YERSAL; BARUTCA, 2014). Na comparação dos níveis séricos de α Klotho entre os subtipos moleculares dos tumores das pacientes em estudo, observou-se que em pacientes com tumores luminais foram detectados maiores níveis de α Klotho solúvel na comparação com as pacientes que possuíam tumores triplo-negativos. Corroborando, assim, com os dados de cultura celular, em que a linhagem luminal mostrou aumento da expressão desta proteína enquanto que a expressão na linhagem triplo-negativa não foi alterada, o que confirma também a importância dos receptores hormonais neste contexto, especialmente o ER β .

Para verificar o perfil de proliferação tumoral nas pacientes de acordo com os níveis de α Klotho solúvel, foi utilizado o marcador imuno-histoquímico de proliferação Ki67. Pacientes com ausência de α Klotho sérico no soro apresentaram tumores com maiores taxas de Ki67 em comparação com pacientes positivos para esta proteína, independentemente do nível de produção. Wolf et al. (2008) relataram anteriormente essa relação entre a expressão de α Klotho com baixas taxas de Ki67 em células de tumor de mama. O mesmo fato foi evidenciado no linfoma de células B, no qual a superexpressão de α Klotho em camundongos xenoinxertados levou a uma diminuição na taxa de Ki67 (ZHOU, XIANGXIANG et al., 2017). Estes resultados confirmam o perfil antiproliferativo de α Klotho, resultado de mecanismos inibitórios de vias de sinalização proliferativas já descritas anteriormente.

Finalmente, para analisar como a presença de α Klotho solúvel está relacionada com a disseminação tumoral, os níveis desta proteína foram avaliados de acordo com o status de acometimento linfonodal. Pacientes com linfonodos negativos apresentaram maiores níveis séricos de α Klotho do que pacientes linfonodo positivos. Estudos anteriores já demonstraram a relação entre a expressão de α Klotho e o estado de acometimento dos linfonodos em tumores de pulmão, esôfago e rins (TANG, X. et al., 2016; USUDA et al., 2011; ZHU et al., 2013). Além disso, o aumento do envolvimento

linfonodal foi associado com a regulação negativa da isoforma β Klotho nos carcinomas ductais invasivos da mama (LI, P. et al., 2017).

Baseado no fato de que ambas as características, positividade do ER e ausência de comprometimento nodal, determinam altos níveis de α Klotho solúvel, a correlação entre essas duas variáveis foi analisada. Ficou evidenciado que pacientes negativos para ER possuem maior risco em desenvolver sítios metastáticos nos linfonodos. Fato relatado anteriormente por Han et al (2013), confirmando que a presença dos ER α e ER β são negativamente correlacionadas com metástases nodais e parecem gerar proteção.

Todos estes dados se alinham com os resultados mostrados no presente estudo para a linhagem MCF-7, no qual ER β foi capaz de diminuir não só a proliferação, mas também inibir o processo de EMT que daria condições para uma possível disseminação tumoral. Além disso, ER β mostrou possuir ações antitumorais em consonância com a proteína α Klotho, a qual foi o responsável por aumentar a expressão após ativação por seu agonista específico. Em amostras de soro humano, a forma solúvel de α Klotho foi associada, por sua vez, à presença de ER, se apresentando em maiores níveis nas situações clínicas de melhor prognóstico e contextos tumorais de menor proliferação e risco de disseminação.

7 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi demonstrada a relação entre a proteína α Klotho e o ER β no câncer de mama. Este receptor ativado foi capaz de aumentar a expressão de α Klotho, ao mesmo tempo em que inibiu a proliferação e o evento de EMT na linhagem MCF-7, confirmando seu papel antitumoral em células luminais da mama. Uma relação próxima a esta foi verificada nas análises de soro humano, nas quais pacientes com tumores mamários iniciais, positivos para ER, de subtipo luminal, com ausência de metástases linfonodais, apresentaram altos níveis de α Klotho solúvel, sendo esta alta produção associada também a menores taxas de proliferação tumoral. Em adição, na comparação com mulheres saudáveis, os níveis desta proteína no soro das pacientes foram consideravelmente menores. Ainda que a natureza da relação entre α Klotho e ER β continue desconhecida e a necessidade de novos estudos se faça necessária, os resultados aqui apresentados solidificam o perfil antitumoral de α Klotho solúvel em pacientes com câncer de mama, ao passo que destaca o ER β como um agente estimulador da expressão desta proteína, tornando ambos alvos terapêuticos promissores para esta neoplasia.

8 REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITZ, L. et al. KL1 Internal Repeat Mediates Klotho Tumor Suppressor Activities and Inhibits bFGF and IGF-I Signaling in Pancreatic Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4254-4266, 2011. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2749>
- AHMAD, Z. et al. Breast carcinoma grading, estimation of tumor size, axillary lymph node status, staging, and nottingham prognostic index scoring on mastectomy specimens. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 477-481, 2009. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.56123>
- AKIMOTO, T. et al. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. **BMC Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-155>
- ALI, S.; COOMBES, C. R. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 3, p. 271-281, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1009594727358>
- ALLRED, D. C. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 11, n. 2, p. 155-168, 1998.
- ALSOFYANI, A. A. et al. Prognostic potential of KLOTHO and SFRP1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 4, p. 459-465, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13353-017-0404-7>
- AMIN, M. B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93-99, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-40618-3>
- ANDRUKHOVA, O. et al. FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. **The EMBO journal**, v. 33, n. 3, p. 229-246, 2014. <https://doi.org/10.1002/embj.201284188>
- ARKING, D. E. et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation research**, v. 96, n. 4, p. 412-418, 2005. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000157171.04054.30>
- ARKING, D. E. et al. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. **Am J Hum Genet**, v. 72, n. 5, p. 1154-61, May 2003. <https://doi.org/10.1086/375035>
- ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; MARINO, M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 4, p. 299-402, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.07.001>

BEN-DOV, I. Z. et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 12, p. 4003-4008, 2007. <https://doi.org/10.1172/JCI32409>

BIAN, A. et al. Klotho, stem cells, and aging. **Clinical interventions in aging**, v. 10, p. 1233-1243, 2015. <https://doi.org/10.2147/CIA.S84978>

BLOCH, L. et al. Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. **FEBS letters**, v. 583, n. 19, p. 3221-3224, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.009>

BOCCHINFUSO, W. P.; KORACH, K. S. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 323-334, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1026339111278>

BOCCHINFUSO, W. P. et al. Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. **Endocrinology**, v. 141, n. 8, p. 2982-2994, 2000. <https://doi.org/10.1210/endo.141.8.7609>

BRASIL. Ministério da Saúde; Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>> Acesso em 20 mar. 2018.

CAMILLI, T. C. et al. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 1, p. 175-186, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00792.x>

CARRILLO-LÓPEZ, N. et al. Indirect Regulation of PTH by Estrogens May Require FGF23. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 9, p. 2009-2017, 2009. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008121258>

CHA, S.-K. K. et al. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 28, p. 9805-9810, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803223105>

CHANG, B. et al. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer. **Oncology reports**, v. 28, n. 3, p. 1022-1028, 2012. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1865>

CHANG, Q. et al. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. **Science (New York, N.Y.)**, v. 310, n. 5747, p. 490-493, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1114245>

CHEN, B. et al. Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. **Cancer biology & therapy**, v. 13, n. 12, p. 1221-1228, 2012. <https://doi.org/10.4161/cbt.21420>

CHEN, B. et al. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2010. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-99>

CHEN, C. D. et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 50, p. 19796-801, Dec 11 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709805104>

CHEN, C. D. et al. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. **Biochemistry**, v. 53, n. 34, p. 5579-87, Sep 2 2014. <https://doi.org/10.1021/bi500409n>

CHEN, J. et al. Calycosin Suppresses Breast Cancer Cell Growth via ER β -Dependent Regulation of IGF-1R, p38 MAPK and PI3K/Akt Pathways. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091245>

CHEN, J. et al. Estrogen Receptor Beta-Mediated Proliferative Inhibition and Apoptosis in Human Breast Cancer by Calycosin and Formononetin. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1790-1797, 2013. <https://doi.org/10.1159/000356612>

CHEN, T. et al. Decreased Level of Klotho Contributes to Drug Resistance in Lung Cancer Cells: Involving in Klotho-Mediated Cell Autophagy. **DNA Cell Biol**, v. 35, n. 12, p. 751-757, Dec 2016. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3437>

CHRISTOPOULOS, P. F.; MSAOUEL, P.; KOUTSILIERIS, M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0291-7>

CRASTO, C. L. et al. Relationship of Low-Circulating “Anti-Aging” Klotho Hormone with Disability in Activities of Daily Living among Older Community-Dwelling Adults. **Rejuvenation Research**, v. 15, n. 3, p. 295-301, 2012. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1268>

DAI, D. et al. Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1. **Oncology reports**, v. 35, n. 1, p. 552-558, 2015. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4358>

DALTON, G. D. et al. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 323, 2017. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00323>

DELISLE, R. K. et al. Homology modeling of the estrogen receptor subtype beta (ER-beta) and calculation of ligand binding affinities. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 20, n. 2, p. 155-167, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(01\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(01)00115-2)

DEMBINSKI, T. C.; LEUNG, C. K.; SHIU, R. P. Evidence for a novel pituitary factor that potentiates the mitogenic effect of estrogen in human breast cancer cells. **Cancer research**, v. 45, n. 7, p. 3083-3089, 1985.

DOI, S. et al. Klotho Inhibits Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Signaling and Suppresses Renal Fibrosis and Cancer Metastasis in Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8655-8665, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.174037>

DUCE, J. A. et al. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. **Glia**, v. 56, n. 1, p. 106-117, 2008. <https://doi.org/10.1002/glia.20593>

DUFFY, M. J. Estrogen Receptors: Role in Breast Cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 43, n. 4, p. 325-347, 2008. <https://doi.org/10.1080/10408360600739218>

DUNNWALD, L. K.; ROSSING, M.; LI, C. I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 1, 2007. <https://doi.org/10.1186/bcr1639>

DUPONT, J. Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. **Molecular Pathology**, v. 54, n. 3, p. 149-154, 2001. <https://doi.org/10.1136/mp.54.3.149>

EARLY et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **Lancet (London, England)**, v. 378, n. 9793, p. 771-784, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60993-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8)

EKYALONGO, R.; YEE, D. Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 14, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0017-y>

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, 2015. <https://doi.org/doi:10.1002/ijc.29210>

FERNANDES, M.; ROSEL, D.; BRÁBEK, J. Breast-Cancer Tumor Size and Screening Effectiveness. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 1, p. 93-95, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1614282>

GIULIANO, A. E.; EDGE, S. B.; HORTOBAGYI, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, p. 1-3, 2018. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6486-6>

GOMEZ-FERNANDEZ, C. et al. Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor in Adenocarcinomas of the Lung: The Antibody Factor. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 18, n. 2, p. 137, 2010. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181bec23b>

HALDOSÉN, L.-A.; ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Estrogen receptor beta in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 665-672, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.005>

HAN, S.-J. et al. Prognostic Significance of Interactions Between ER Alpha and ER Beta and Lymph Node Status in Breast Cancer Cases. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 10, p. 6081-6084, 2013. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.10.6081>

HARBECK, N.; THOMSEN, C.; GNANT, M. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. **Breast Care**, v. 8, n. 2, p. 102-109, 2013. <https://doi.org/10.1159/000351193>

HARTMAN, J.; STRÖM, A.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen receptor beta in breast cancer—Diagnostic and therapeutic implications. **Steroids**, v. 74, n. 8, p. 635-641, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.02.005>

HAYASHI, S. I. et al. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, n. 2, p. 193-202, 2003. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100193>

HOLLIER, B. G.; EVANS, K.; MANI, S. A. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: A Coalition Against Cancer Therapies. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 14, n. 1, p. 29-43, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9110-3>

HU, M. C. et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 9, p. 3438-3450, 2010. <https://doi.org/10.1096/fj.10-154765>

IDE, N. et al. In vivo evidence for a limited role of proximal tubular Klotho in renal phosphate handling. **Kidney International**, v. 90, n. 2, p. 348-362, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.04.009>

IMURA, A. et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS Letters**, v. 565, n. 1-3, p. 143-147, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.090>

IMURA, A. et al. α -Klotho as a Regulator of Calcium Homeostasis. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1615-1618, 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1135901>

ITO, S. et al. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1576, n. 3, p. 341-345, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00281-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00281-6)

ITO, S. et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse β klotho, which encodes a novel Klotho family protein. **Mechanisms of Development**, v. 98, n. 1-2, p. 115-119, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00439-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00439-1)

- KARAMOUZIS, M. V. et al. Targeting Androgen/Estrogen Receptors Crosstalk in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 1, p. 35-48, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.12.001>
- KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, v. 42, p. 63-71, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- KARLSSON, M. C. et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 7, p. 781-791, 2017. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12092>
- KAWANO, K.-I. et al. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 10, p. 1744-1751, 2002. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.10.1744>
- KHARITONENKOV, A. FGFs and metabolism. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 805-810, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.001>
- KIM, H.-S. et al. Analysis of the Potent Prognostic Factors in Luminal-Type Breast Cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 15, n. 4, p. 401-406, 2012. <https://doi.org/10.4048/jbc.2012.15.4.401>
- KIM, J. H. et al. Klotho plays a critical role in clear cell renal cell carcinoma progression and clinical outcome. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 20, n. 3, p. 297-304, May 2016. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.3.297>
- KIM, J. H. et al. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. **J Lifestyle Med**, v. 5, n. 1, p. 1-6, Mar 2015. <https://doi.org/10.15280/jlm.2015.5.1.1>
- KLAUS, A.; BIRCHMEIER, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 5, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2389>
- KONTOS, S. et al. Expression of ER β and its co-regulators p300 and NCoR in human transitional cell bladder cancer. **Urologia internationalis**, v. 87, n. 2, p. 151-158, 2011. <https://doi.org/10.1159/000324262>
- KURO-O, M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 15, n. 4, p. 437-441, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000232885.81142.83>
- KURO-O, M. Klotho. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 2, p. 333-343, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0722-7>
- KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45-51, 1997. <https://doi.org/10.1038/36285>

KURO-O, M. The FGF23 and Klotho system beyond mineral metabolism. **Clinical and experimental nephrology**, v. 21, Suppl. 1, p. 64-69, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10157-016-1357-6>

KUROSU, H. et al. Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by Klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120-6123, 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500457200>

KUROSU, H. et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5742, p. 1829-1833, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1112766>

LANDOLT, L. et al. Clear Cell Renal Cell Carcinoma is linked to Epithelial-to-Mesenchymal Transition and to Fibrosis. **Physiological Reports**, v. 5, n. 11, 2017. <https://doi.org/10.14814/phy2.13305>

LEE, H.-R. R.; KIM, T.-H. H.; CHOI, K.-C. C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. **Laboratory animal research**, v. 28, n. 2, p. 71-76, 2012. <https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.2.71>

LEE, J. et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2010. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-109>

LEUNG, Y.-K. et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. **Steroids**, v. 77, n. 7, p. 727-737, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.03.008>

LI, P. et al. Downregulation of klotho β is associated with invasive ductal carcinoma progression. **Oncology Letters**, v. 14, n. 6, p. 7443-7448, 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7110>

LI, X.-X. et al. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway. **International journal of oncology**, v. 45, n. 2, p. 611-618, 2014. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2430>

LIAO, X. H. et al. Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 927-942, 2014. <https://doi.org/10.1111/febs.12658>

LIGUMSKY, H. et al. Tumor Suppressor Activity of Klotho in Breast Cancer Is Revealed by Structure-Function Analysis. **Molecular cancer research : MCR**, v. 13, n. 10, p. 1398-1407, 2015. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0141>

LIN, Z. et al. Novel Estrogen Receptor- α Binding Sites and Estradiol Target Genes Identified by Chromatin Immunoprecipitation Cloning in Breast Cancer. **Cancer**

Research, v. 67, n. 10, p. 5017-5024, 2007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3696>

LIU, H. et al. Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803-806, 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1143578>

LOJKIN, I. et al. Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer. **Cancer Letters**, v. 362, n. 2, p. 149-157, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.035>

MAK, P. et al. Estrogen receptor β sustains epithelial differentiation by regulating prolyl hydroxylase 2 transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. 4708-4713, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221654110>

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>

MARKIEWICZ, A. et al. Epithelial-mesenchymal transition markers in lymph node metastases and primary breast tumors - relation to dissemination and proliferation. **American journal of translational research**, v. 6, n. 6, p. 793-808, 2014.

MAROTTI, J. D. et al. Estrogen receptor- β expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. **Modern Pathology**, v. 23, n. 2, 2009. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.158>

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the HumanKlothoGene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and SecretedKlothoProtein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626-630, 1998. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.8019>

MENCKE, R.; OLAUSON, H.; HILLEBRANDS, J.-L. Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 85-100, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.009>

OMOTO, Y.; IWASE, H. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast and prostate cancer from biological aspects. **Cancer Sci**, v. 106, n. 4, p. 337-43, Apr 2015. <https://doi.org/10.1111/cas.12613>

ONITILO, A. A. et al. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. **Clinical Medicine & Research**, v. 7, n. 1-2, p. 4-13, 2009. <https://doi.org/10.3121/cmr.2008.825>

ÖZ, O. K. et al. Aromatase Deficiency Causes Altered Expression of Molecules Critical for Calcium Reabsorption in the Kidneys of Female Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1893-1902, 2007. <https://doi.org/10.1359/jbmr.070808>

- PANG, M. F. et al. TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. **Oncogene**, v. 35, n. 6, p. 748-760, 2016. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.133>
- PATERNI, I. et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13-29, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>
- PERRI, F. et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 111, p. 166-172, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.020>
- PETTERSSON, K.; DELAUNAY, F.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. **Oncogene**, v. 19, n. 43, p. 1203828, 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203828>
- POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. **Genes & development**, v. 14, n. 15, p. 1837-1851, 2000. <https://doi.org/10.1101/gad.14.15.1837>
- POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505-518, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1387>
- RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 207, 2010. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>
- RAY, A.; ALALEM, M.; RAY, B. K. Insulin signaling network in cancer. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 51, n. 6, p. 493-498, 2014.
- REIMAN, J. M.; KNUTSON, K. L.; RADISKY, D. C. Immune Promotion of Epithelial-mesenchymal Transition and Generation of Breast Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3005-3008, 2010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4041>
- RITTER, C. S. et al. Differential expression and regulation of Klotho by paricalcitol in the kidney, parathyroid, and aorta of uremic rats. **Kidney international**, v. 87, n. 6, p. 1141-1152, 2015. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.22>
- RODY, A. et al. Methylation of estrogen receptor β promoter correlates with loss of ER- β expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, n. 4, p. 903-916, 2005. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01088>
- ROTHENBERGER, N. J.; SOMASUNDARAM, A.; STABILE, L. P. The Role of the Estrogen Pathway in the Tumor Microenvironment. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19020611>
- RUBINEK, T.; MODAN-MOSES, D. Vitamins & Hormones. **Vitamins and hormones**, v. 101, p. 85-118, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.02.009>

RUBINEK, T. et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 2, p. 649-657, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1824-4>

SÁRVÁRI, M. et al. Long-Term Estrogen Receptor Beta Agonist Treatment Modifies the Hippocampal Transcriptome in Middle-Aged Ovariectomized Rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p. 149, 2016. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00149>

SEO, M. et al. Epigenetic suppression of the anti-aging gene KLOTHO in human prostate cancer cell lines. **Animal Cells and Systems**, v. 21, p. 223-232, 2017. <https://doi.org/10.1080/19768354.2017.1336112>

SHIRAKI-IIDA, T. et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. **FEBS Lett**, v. 424, n. 1-2, p. 6-10, Mar 6 1998. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00127-6)

SHU, G. et al. Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. **Cellular Oncology**, v. 36, n. 2, p. 121-129, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13402-012-0118-0>

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>

SIEUWERTS, A. M. et al. Evaluation of the ability of adjuvant tamoxifen-benefit gene signatures to predict outcome of hormone-naïve estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with tamoxifen in the advanced setting. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 8, p. 1679-1689, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.003>

SOMMER, S.; FUQUA, S. Estrogen receptor and breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 5, p. 339-352, 2001. <https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0389>

SOPJANI, M.; DËRMAKU-SOPJANI, M. Vitamins & Hormones. **Vitamins and hormones**, v. 101, p. 59-84, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.02.003>

TAN, W. et al. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 7, n. 9, p. 10373-10385, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7219>

TANG, X. et al. Expression of klotho and β -catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance. **Diseases of the Esophagus**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2016. <https://doi.org/10.1111/dote.12289>

TANG, X. et al. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 96, n. 2, p. 197-205, 2015. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.86>

THURSTON, R. D. et al. Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1384, 2010. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.002>

TOHYAMA, O. et al. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 11, p. 9777-9784, 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312392200>

TORRES, P. U. U. et al. Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. **Kidney international**, v. 71, n. 8, p. 730-737, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002163>

UNTCH, M. et al. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013). **Breast care (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 3, p. 221-229, 2013. <https://doi.org/10.1159/000351692>

URAKAWA, I. et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 770-774, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05315>

USUDA, J. et al. Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 72, n. 3, p. 355-359, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.10.008>

VOUTSADAKIS, I. A. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. **Journal of clinical medicine**, v. 5, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.3390/jcm5010011>

WANG, L. et al. Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. **American journal of cancer research**, v. 1, n. 1, p. 111-119, 2011.

WANG, X. et al. Combined effects of klotho and soluble CD40 ligand on A549 lung cancer cells. **Oncology reports**, v. 25, n. 5, p. 1465-1472, 2011. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1178>

WANG, Y. et al. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57391, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057391>

WANG, Y.; ZHOU, B. P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 9, p. 603-611, 2011. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10226>

WOLF, I. et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, 2008. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.292>

XIAO, N.-M. et al. Klotho is a serum factor related to human aging. **Chinese medical journal**, v. 117, n. 5, p. 742-747, 2004.

- XUAN, N. et al. Regulation of dendritic cell function by insulin/IGF-1/PI3K/Akt signaling through klotho expression. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 37, n. 3, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1080/10799893.2016.1247862>
- XUAN, N. T.; HAI, N. V. Changes in expression of klotho affect physiological processes, diseases, and cancer. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 21, n. 1, p. 3-8, 2018.
- YAMAMOTO, M. et al. Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 38029-38034, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509039200>
- YAMAZAKI, Y. et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 398, n. 3, p. 513-8, Jul 30 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.110>
- YAN, Y. et al. Reduced Klotho expression contributes to poor survival rates in human patients with ovarian cancer, and overexpression of Klotho inhibits the progression of ovarian cancer partly via the inhibition of systemic inflammation in nude mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 1777-1785, 2017. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6172>
- YAŞAR, P. et al. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. **Reproductive medicine and biology**, v. 16, n. 1, p. 4-20, 2017. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- YE, X. et al. β Klotho suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma by regulating Akt/GSK-3 β /cyclin D1 signaling pathway. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055615>
- YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 412-424, 2014. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
- ZAHA, D. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 382-392, 2014. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.382>
- ZHAO, C. et al. Expression of estrogen receptor β isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. **Oncogene**, v. 22, n. 48, p. 1207100, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207100>
- ZHOU, X. et al. Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 37, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0391-5>
- ZHOU, X.; WANG, X. Klotho: a novel biomarker for cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 141, n. 6, p. 961-9, Jun 2015. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1788-y>

ZHOU, Z. et al. Regulation of estrogen receptor signaling in breast carcinogenesis and breast cancer therapy. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 8, p. 1549, Apr 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1376-3>

ZHU, Y. et al. Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3 β /Snail signaling in renal cell carcinoma. **Cancer Science**, v. 104, n. 6, p. 663-671, 2013. <https://doi.org/10.1111/cas.12134>