JOÃO VICTOR CABRAL-COSTA

EFEITOS MODULATÓRIOS DA PTEN SOBRE A COGNIÇÃO E A PLASTICIDADE SINÁPTICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INTERVENÇÕES NÃO-FARMACOLÓGICAS: A Dieta Intermitente e o Exercício Físico

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

São Paulo
2017

JOÃO VICTOR CABRAL-COSTA

EFEITOS MODULATÓRIOS DA PTEN SOBRE A COGNIÇÃO E A PLASTICIDADE SINÁPTICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INTERVENÇÕES NÃO-FARMACOLÓGICAS: A Dieta Intermitente e o Exercício Físico

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Versão original.

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cabral-Costa, João Victor
EFEITOS MODULATÓRIOS DA PTEN SOBRE A COGNIÇÃO E A PLASTICIDADE SINÁPTICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INTERVENÇÕES NÃO-FARMACOLÓGICAS: A Dieta Intermitente e o Exercício Físico / João Victor Cabral-Costa; orientadora Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe. -- São Paulo, 2017.
85 p.

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

1. Neurociências. I. Mitiko Kawamoto Iwashe, Elisa, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: João Victor Cabral Costa

Título da Dissertação: Efeitos Modulatórios da PTEN sobre a Cognição e a Plasticidade Sináptica em Camundongos Submetidos a Intervenções Não-Farmacológicas: a Dieta Intermitente e o Exercício Físico

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../2017**, considerou o candidato:

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **167** nas fls. **113** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Elisa Mitiko Kawamoto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Avaliação da compartimentalização da Pten na neurogênese e plasticidade sináptica influenciada por fatores ambientais"* do qual participam o(s) aluno(s) **Andrea Rodrigues Vasconcelos, Sabrina Degaspari, Paula Fernanda Kinoshita, Ana Maria Orellana e os pesquisadores Rui Curi, Luiz Roberto G. Britto,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **03.11.2011, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 07 de novembro de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.021/2014.

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao Certificado 167/11/CEUA, datado de 03.11.11, e por solicitação da Profa. Dra. **Elisa Mitiko Kawamoto**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **João Victor Cabral Costa** ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação da compartimentalização da Pten na neurogênese e plasticidade sináptica influenciada por fatores ambientais*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 083.14

São Paulo, 31 de outubro de 2014.

REF.: Protocolo nº 167/11.

" Avaliação da compartimentalização da Pten na neurogênese e plasticidade sináptica influenciada por fatores ambientais"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 03.11.17.**

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

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.
Profa Dra. Elisa Mitiko Kawamoto
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho aos meus pais, Carminha e Jésus, meus maiores exemplos de sabedoria, perseverança, carinho e amor ao próximo.

AGRADECIMENTOS

À Juçara, minha noiva, companheira e amiga, por ter caminhado ao meu lado durante todo este percurso. Sempre que precisei fui consolado, desafiado e encorajado por você – se consegui perseverar no meu caminho, foi porque pude contar com seu apoio, com seu carinho, com seu amor.

À minha mãe (*in memorian*), que, mesmo que não fisicamente, esteve presente durante todo o processo de realização deste trabalho – por meio de seu exemplo, seus ensinamentos, seu carinho e força de vontade, fatores que ainda reverberam marcantemente em minha vida. Ao meu pai, verdadeiro mecenas deste trabalho, cujo apoio incondicional foi essencial para que eu tivesse a oportunidade de seguir a carreira que escolhi. Seus conselhos – sábios, instigantes e sempre questionadores – me fortaleceram e, sem dúvida alguma, foram um dos meus principais combustíveis. À Edilene, pelo acolhimento, por ter me adotado de forma tão carinhosa.

Às minhas irmãs. À Patrícia, meu exemplo de perseverança, por me ensinar a importância de sempre lutar com coragem por aquilo que acredito. À Débora, meu exemplo de ousadia, por me ensinar que não há nenhum sonho que não valha a pena ser sonhado. À Cristiane, meu exemplo de serenidade, por me ensinar que olhar para dentro é tão importante quanto olhar para fora – descobrir o que faz de mim quem eu sou é o primeiro passo para que eu possa, enfim, entender e ajudar o outro.

Aos meus sobrinhos, meus exemplos de simplicidade, por me ensinarem – e sempre me relembrarem – o imenso valor da sutileza.

Ao Carlos e à Lamara Vercelino, meus sogros, pelo constante e incondicional apoio e por me acolherem em casa como um dos seus.

Ao Caio Zeidler e ao Anderson Baraldo, meus irmãos da vida, por dividirem comigo tantas corridas, conversas, risadas e discussões – cômicas e filosóficas. A vida é muito mais leve e alegre na companhia de vocês.

À Jornada Científica dos Acadêmicos de Farmácia e Bioquímica, meu pedaço de Utopia, por me ajudar a lembrar dos motivos pelos quais escolhi este caminho, contribuindo para que a minha chama da docência não se apagasse.

À Profa. Primavera Borelli, meu modelo de docência, por demonstrar que é possível ser um exemplo de professora, pesquisadora e praticante de extensão universitária, além de ser um modelo de integridade moral e ética.

À Profa. Tânia Marcourakis e ao Prof. Fernando Abdulkader, meus mentores, pelos conselhos e pelo intenso incentivo em perseverar na carreira acadêmica.

***

À Profa. Elisa Kawamoto, minha orientadora, pela confiança depositada em mim ao se dispor a me ensinar as bases técnicas deste trabalho e a compartilhar a bancada comigo, ao me aceitar como aluno e me acolher em seu grupo de pesquisa. O início da carreira acadêmica é uma etapa turbulenta, uma verdadeira aventura, mas pude aprender e crescer muito com a realização deste projeto.

Ao Prof. Cristoforo Scavone, meu co-orientador, cujo entusiasmo e alegria contribuíram para que os dias fossem mais leves, as discussões mais interessantes e a ciência mais instigante.

À Diana Andreotti, minha parceira de trabalho, por compartilhar comigo as dificuldades do dia-a-dia, nunca hesitando a oferecer ajuda. Sua contribuição e paciência foram fundamentais para que este trabalho fosse possível.

À Larissa Lima, amparo imprescindível, pela imensa ajuda nos experimentos, nas análises, nas dúvidas e discussões.

Aos meus colegas de laboratório, Jacqueline Alves, Ana Maria Orellana, Marina Cararo, Andrea Vasconcelos, Fabia Tano, Amanda Galvão, Andrea Dietzius, Natália Mello, por dividirem comigo tantos momentos de dificuldades, alegrias, experimentos frustrados e comemorações – de aniversários, de artigos publicados ou mesmo aquelas quase sem motivo, talvez as mais divertidas. Ao Vinicius Nakao, pelo empenho em aprender e ajudar – foi um privilégio poder ter contribuído no seu caminho na vida acadêmica.

À Beatriz Sakashita, pelas conversas, pelos quitutes e por ter trazido a música de volta à minha rotina – é possível ser leve e divertido enquanto se luta pelos seus ideais. À Paula Kinoshita, ouvinte paciente, pelos conselhos que muito me impulsionaram. Ao Caio Mazucanti, pelas discussões abstratas, ideias ousadas e provocações – sua visão de ciência, e como a pratica, são um exemplo inspirador.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, Miriam, Camila e, em especial, Mônica, pela paciência e empenho em sempre ajudar.

À Dra. Simonetta Camandola, ao Dr. Mark Mattson e ao Prof. José Donato Junior, pelas importantes contribuições, materiais e científicas, que permitiram a realização deste projeto.

***

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos #2011/21308-8, #2013/20594-2 e #2014/18689-8) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, crucial para a execução deste trabalho.

"*I cannot pretend I am without fear. But my predominant feeling is one of gratitude. I have loved and been loved; I have been given much and I have given something in return; I have read and traveled and thought and written. I have had an intercourse with the world, the special intercourse of writers and readers. Above all, I have been a sentient being, a thinking animal, on this beautiful planet, and that in itself has been an enormous privilege and adventure.*"

[Oliver Sacks (1)]

RESUMO

Cabral-Costa JV. Efeitos Modulatórios da PTEN sobre a Cognição e a Plasticidade Sináptica em Camundongos Submetidos a Intervenções Não-Farmacológicas: a Dieta Intermitente e o Exercício Físico. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Inicialmente caracterizada como proteína supressora de tumor, a PTEN (*phosphatase and tensin deleted on chromosome 10*) tem sido objeto de estudo de trabalhos relacionados a outros processos envolvendo proliferação, sobrevivência e migração celulares, apresentando um potencial papel modulatório na neurogênese e plasticidade sináptica. Fatores ambientais, como a dieta intermitente e o exercício físico, também podem modular estes processos, podendo ser utilizados como intervenções para neuroproteção e melhora de déficits de aprendizado e memória. A ausência de PTEN em neurônios ocasiona anomalias anatômicas e funcionais, culminando em sinaptogênese aumentada e redução do LTP e LTD. Levando-se em consideração a potencial modulação da via PI3K/AKT pela dieta intermitente e pelo exercício físico, a avaliação da influência destas intervenções sobre os efeitos da deleção neuronal da PTEN constitui uma interessante ferramenta de estudo para melhor elucidação dos mecanismos associados à plasticidade sináptica. Este trabalho objetivou caracterizar bioquímica e funcionalmente o hipocampo e o córtex de camundongos adultos com deleção neuronal da PTEN, avaliando seus efeitos sob influência de intervenções não-farmacológicas. Para isto, foram utilizados camundongos com nocaute neuronal condicionado da PTEN (*Pten*$^{loxP/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$). Os animais foram submetidos à dieta intermitente ou exercício físico voluntário por um período de 30 dias, avaliados por ensaios comportamentais (labirinto em cruz elevado, campo aberto, reconhecimento do objeto novo ou da localização do objeto, labirinto aquático de Morris e esquiva inibitória) e, posteriormente, foram realizadas as análises de *Western Blotting*, da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e dosagem do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). A deleção neuronal da PTEN induziu macrocefalia por aumento da massa cortical. A deleção condicionada da PTEN, sob estímulo de intervenção não-farmacológica – dieta intermitente ou exercício físico – induz um efeito ansiolítico nos animais, no labirinto em cruz elevado. Os resultados do campo aberto, porém, paradoxalmente não reforçam este resultado. Interessantemente, o isolamento social – intrínseco ao estudo do exercício físico – induziu um aumento do perfil de ansiedade nos animais, independentemente do genótipo ou tratamento. Os resultados do labirinto aquático de Morris não foram conclusivos, porém apontam para um possível déficit de memória espacial nos animais HT, além de, supreendentemente, um efeito deletério do exercício físico – também observado nos níveis corticais de BDNF. Na esquiva inibitória, o déficit dos animais HT foi efetivamente resgatado pela dieta e pelo exercício físico. O hipocampo não apresentou alterações bioquímicas significativas. No córtex, pode-se confirmar a diminuição da expressão da PTEN e possível ativação da AKT, embora nenhum efeito sobre os receptores ionotrópicos glutamatérgicos tenha sido observado. O perfil de expressão da Cre recombinase foi validado por meio da linhagem *Nse-Cre*$^{+}$*;tdTomato*$^{+}$. O estudo da linhagem *Pten*$^{loxP/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$ demonstrou um interessante potencial para avaliação dos efeitos da PTEN sobre a cognição e a plasticidade sináptica, porém um melhor balizamento dos ensaios faz-se necessário, visando a busca de condições de análise dos efeitos observados. Ainda, a expansão dos estudos com a linhagem por meio da utilização de outros estímulos pode constituir uma interessante forma de revelar os efeitos não observados.

Palavras-chave: PTEN. Dieta intermitente. Exercício físico voluntário. Plasticidade sináptica. Cognição.

ABSTRACT

Cabral-Costa JV. PTEN Modulatory Effects over Cognition and Synaptic Plasticity of Mice under Non-Pharmacological Interventions: Intermittent Fasting and Physical Exercise. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

First characterized as a tumor suppressor, PTEN (*phosphatase and tensin deleted on chromosome 10*) has been a target studied in many projects related to processes involving cell proliferation, survival and migration, showing a potential modulatory role in controlling neurogenesis and synaptic plasticity. Environmental factors, such as intermittent fasting and physical exercise, can also modulate those processes, thus having the potential of being applied as neuroprotective interventions aiming to improve learning and memory deficits. PTEN absence in neurons cause anatomical and functional anomalies, culminating in increased synaptogenesis and LTP and LTD reduction. Considering the potential of intermittent fasting and physical exercise to exert a modulatory role over the PI3K/AKT pathway, the assessment of the influence of these interventions over the effects of PTEN neuronal deletion is of great interest, as it can help better elucidate the mechanisms of synaptic plasticity. This work aimed to functionally and biochemically assess the hippocampus and the cortex of adult mice with a conditioned neuronal deletion of PTEN (*Pten*$^{loxP/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$), evaluating its effects under the influence of non-pharmacological interventions. Animals were submitted to an intermittent fasting or to a voluntary physical exercise protocol for 30 days, then assessed by behavioral (elevated plus maze, open field, novel object or object location recognition tests, Morris water maze, and passive avoidance) and biochemical (Western blotting, nitric oxide synthase activity, BDNF levels) assays. The neuronal PTEN deletion induced macrocephaly through an increase in cortical mass. Also, under the stimuli of non-pharmacological interventions – intermittent fasting or physical exercise – the deletion induced an anxiolytic effect on the elevated plus maze assay. On the other hand, the open field results were paradoxical. Interestingly, social isolation – an intrinsic factor from the physical exercise protocol – induced an increase in the anxiety behavior, independently of genotype or treatment. Results from the Morris water maze assay were not conclusive, however they pointed to a likely spatial memory deficit on animals with the PTEN deletion. Surprisingly, a deleterious effect of physical exercise was also observed – an effect found on BDNF levels as well. At the passive avoidance test, the deficit from the HT group was effectively rescued by either intermittent fasting and physical exercise. The hippocampus did not show any significant biochemical alterations. However, the decreased PTEN expression was confirmed in the cortex, as well as the possible AKT activation, although any effect over the glutamatergic ionotropic receptor was found. The Cre recombinase expression profile was validated through the reporter lineage *Nse-Cre*$^{+}$*;tdTomato*$^{+}$. The study of *Pten*$^{loxP/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$ lineage showed great potential of assessing PTEN effects on cognition and synaptic plasticity. However, a deeper standardization of parameters is recommended in order to better evaluate the observed effects. In addition, by expanding the study of this lineage through the application of other stimuli could constitute an interesting way of revealing these non-observed results.

Keywords: PTEN. Intermittent fasting. Voluntary physical exercise. Synaptic plasticity. Cognition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da ativação da AKT por meio da ativação da PI3K, efeito antagonizado pela ação de fosfatase da PTEN. 19
Figura 2 – Esquema da recombinação do DNA flanqueado pelos sítios loxP (floxeado) mediado pela Cre recombinase. 22
Figura 3 – Representação esquemática dos cruzamentos da linhagem $Pten^{loxp/+}$;$Nse\text{-}Cre^{+}$. 25
Figura 4 – Imagem representativa da genotipagem da linhagem $Pten^{loxp/+}$;$Nse\text{-}Cre^{+}$. 27
Figura 5 – Esquematização do desenho experimental da dieta intermitente. 27
Figura 6 – Fotografias do sistema de roda giratória com registro temporal de contagem de giros utilizado para o protocolo de exercício físico voluntário. 28
Figura 7 – Esquematização do desenho experimental do exercício físico. 29
Figura 8 – Avaliação da variação de massa corpórea durante e após o período de dieta intermitente. 37
Figura 9 – Avaliação do consumo de ração durante o período de dieta intermitente. 38
Figura 10 – Avaliação da massa encefálica após o período de dieta intermitente. 38
Figura 11 – Avaliação da massa de estruturas do encéfalo após o período de dieta intermitente. 39
Figura 12 – Avaliação do tempo nas diferentes áreas do labirinto em cruz elevado após o período de dieta intermitente. 40
Figura 13 – Avaliação do número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado após o período de dieta intermitente. 40
Figura 14 – Parâmetros de mobilidade livre no ensaio do campo aberto após o período de dieta intermitente. 41
Figura 15 – Tempo de permanência nas áreas do ensaio do campo aberto após o período de dieta intermitente. 42
Figura 16 – Preferência pelo objeto alvo no ensaio do reconhecimento do objeto novo após o período de dieta intermitente. 43
Figura 17 – Avaliação do aprendizado e da mobilidade no labirinto aquático de Morris após o período de dieta intermitente. 44
Figura 18 – Avaliação do tempo de permanência no quadrante alvo no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória de referência 4 h após o último treinamento, depois do período de dieta intermitente. 44
Figura 19 – Avaliação do tempo de permanência no quadrante alvo no ensaio do labirinto aquático de Morris nas etapas de avaliação da memória de referência 4 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o último treinamento, depois do período de dieta intermitente. 45
Figura 20 – Latência para escape pela plataforma no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória operacional após o período de dieta intermitente. 46
Figura 21 – Latência para entrada na câmara escura no ensaio da esquiva inibitória nas etapas de treinamento e avaliação após o período de dieta intermitente. 46
Figura 22 – Expressão da PTEN no hipocampo após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*. 47
Figura 23 – Expressão e ativação da AKT no hipocampo após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*. 48
Figura 24 – Expressão da PTEN no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*. 49
Figura 25 – Expressão e ativação da AKT no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*. 49
Figura 26 – Expressão e ativação do NR1 no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*. 50

Figura 27 – Expressão e ativação do receptor AMPA no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.....51
Figura 28 – Avaliação da atividade da NOS após período de dieta intermitente.....52
Figura 29 – Dosagem dos níveis de BDNF no córtex por kit de ELISA após o período de dieta intermitente. 53
Figura 30 – Esquematização dos perfis de atividade na roda de corrida.....53
Figura 31 – Distância diária média percorrida entre a 3ª e a 4ª semana de exercício físico voluntário.....54
Figura 32 – Avaliação da variação de massa corpórea durante e após o período de exercício físico voluntário.....54
Figura 33 – Avaliação do consumo de ração durante o período de exercício físico voluntário. 55
Figura 34 – Avaliação da massa encefálica após o período de exercício físico voluntário. ...55
Figura 35 – Avaliação da massa de estruturas do encéfalo após o período de exercício físico voluntário.....56
Figura 36 – Avaliação do tempo nas diferentes áreas do labirinto em cruz elevado após o período de exercício físico voluntário. 57
Figura 37 – Avaliação do número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado após o período de exercício físico voluntário. 57
Figura 38 – Distância percorrida no ensaio do campo aberto após o período de exercício físico voluntário.....58
Figura 39 – Avaliação do tempo nas diferentes áreas do campo aberto após o período de exercício físico voluntário. 59
Figura 40 – Preferência pelo objeto alvo no ensaio do reconhecimento da localização do objeto após o período de exercício físico voluntário. 60
Figura 41 – Avaliação do aprendizado e da mobilidade no labirinto aquático de Morris após o período de exercício físico voluntário. 60
Figura 42 – Avaliação do tempo de permanência nos quadrantes no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória de referência 4 h após o último treinamento, depois do período de exercício físico voluntário.....61
Figura 43 – Avaliação do tempo de permanência nos quadrantes no ensaio do labirinto aquático de Morris nas etapas de avaliação da memória de referência 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o último treinamento, depois do período de exercício físico voluntário.....61
Figura 44 – Latência para escape pela plataforma no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória operacional após o período de exercício físico voluntário.62
Figura 45 – Latência para entrada na câmara escura no ensaio da esquiva inibitória nas etapas de exposição e avaliação após o período de exercício físico voluntário. 63
Figura 46 – Expressão da PTEN após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*. 63
Figura 47 – Expressão e ativação da AKT após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*. 64
Figura 48 – Expressão e ativação do NR1 após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*. 65
Figura 49 – Expressão e ativação do receptor AMPA após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*. 65
Figura 50 – Avaliação da atividade da NOS após período de exercício físico voluntário. 66
Figura 51 – Dosagem dos níveis de BDNF no córtex por kit de ELISA após o período de exercício físico voluntário. 67
Figura 52 – Perfil macroscópico de expressão da Cre recombinase, avaliada pela coloração típica da proteína fluorescente tdTomato. 68

Figura 53 – Padrão de expressão da Cre recombinase, avaliada pela imunofluorescência da proteína tdTomato em cortes histológicos. 69
Figura 54 – Padrão de expressão da Cre recombinase, avaliada por reação de imunohistoquímica da proteína tdTomato em cortes histológicos. 70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 PTEN 19
1.2 Sistema Cre-loxP 20
1.3 Intervenções Não-Farmacológicas: a dieta intermitente e o exercício físico 22
2 OBJETIVOS 24
2.1 Objetivo Geral 24
2.2 Objetivos Específicos 24
3 MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1 Documentação Requerida 25
3.2 Animais 25
3.3 Genotipagem da Linhagem Transgênica 26
3.4 Dieta Intermitente 27
3.5 Exercício Físico 28
3.6 Ensaios Comportamentais 29
3.6.1 Labirinto em Cruz Elevado 29
3.6.2 Campo Aberto 29
3.6.3 Reconhecimento do Objeto Novo 30
3.6.4 Reconhecimento da Localização do Objeto 30
3.6.5 Labirinto Aquático de Morris 30
3.6.5.1 Treinamento 31
3.6.5.2 Memória de Referência 31
3.6.5.3 Memória Operacional 31
3.6.6 Esquiva Inibitória 31
3.7 Ensaios Bioquímicos e Moleculares 32
3.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 32
3.7.2 Extração de Proteínas Citosólicas e Nucleares 32
3.7.3 Determinação da Concentração de Proteínas 33
3.7.4 Ensaio de Western Blotting 33
3.7.5 Atividade da Óxido Nítrico Sintase (NOS) 34
3.7.6 Dosagem do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) 34
3.8 Avaliação do Perfil de Expressão da Cre Recombinase 35
3.8.1 Linhagem Nse-Cre^{+};tdTomato^{+} 35
3.8.2 Ensaios Histológicos 35
3.9 Análise Estatística 35

4 RESULTADOS 37
4.1 Dieta Intermitente 37
4.1.1 Massa Corpórea e Consumo de Ração 37
4.1.2 Massa Encefálica 38
4.1.3 Ensaios Comportamentais 39
4.1.3.1 Labirinto em Cruz Elevado 39
4.1.3.2 Campo Aberto 41
4.1.3.3 Reconhecimento do Objeto Novo 42
4.1.3.4 Labirinto Aquático de Morris 43
4.1.3.5 Esquiva Inibitória 46
4.1.4 Ensaios Bioquímicos e Moleculares 47
4.1.4.1 Ensaio de *Western Blotting – Hipocampo* 47
4.1.4.2 Ensaio de *Western Blotting – Córtex* 48
4.1.4.3 Atividade da NOS 51
4.1.4.4 Dosagem de BDNF 52
4.2 Exercício Físico 53
4.2.1 Distância Percorrida 53
4.2.2 Massa Corpórea e Consumo de Ração 54
4.2.3 Massa Encefálica 55
4.2.4 Ensaios Comportamentais 56
4.2.4.1 Labirinto em Cruz Elevado 56
4.2.4.2 Campo Aberto 57
4.2.4.3 Reconhecimento da Localização do Objeto 59
4.2.4.4 Labirinto Aquático de Morris 60
4.2.4.5 Esquiva Inibitória 62
4.2.5 Ensaios Bioquímicos e Moleculares 63
4.2.5.1 Ensaio de *Western Blotting* 63
4.2.5.2 Atividade da NOS 66
4.2.5.3 Dosagem de BDNF 66
4.3 Avaliação do Perfil da Expressão da Cre Recombinase 67
5 DISCUSSÃO 71
5.1 Perfil Geral 71
5.2 Perfil Comportamental 72
5.3 Perfil Bioquímico e Molecular 75
6 CONCLUSÃO 78
REFERÊNCIAS 79

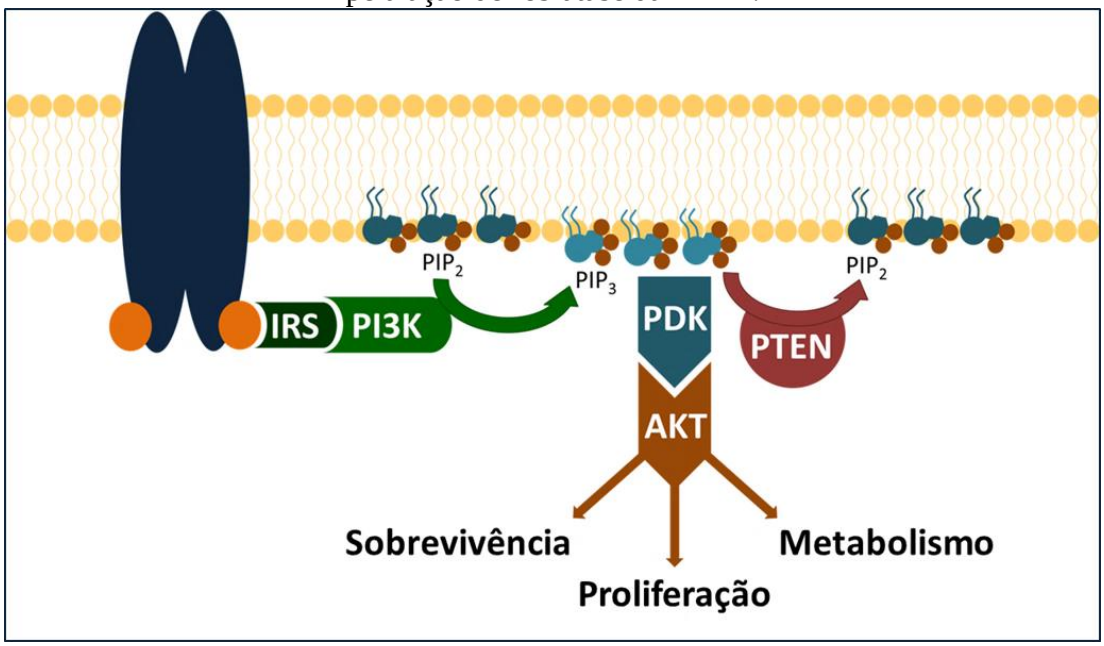
1 INTRODUÇÃO

1.1 PTEN

A PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) foi originalmente caracterizada como uma proteína supressora de tumor, cuja deleção é ligada ao aparecimento de diversos tipos de tumores em humanos, incluindo glioblastoma, carcinoma endometrial e câncer de próstata, constituindo um dos genes supressores tumorais mais frequentemente perdidos ou mutados (2–4).

Sua atividade mais bem caracterizada é a de fosfatase proteica e lipídica, apresentando como ação clássica a conversão de 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP_3) em 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), apesar de já existirem estudos indicando mecanismos fosfatase-independentes (5,6). Assim, a PTEN antagoniza a atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – enzima responsável pela ativação da AKT (Figura 1). Desta forma, a PTEN, atuando como regulador negativo das vias a jusante da AKT, apresenta um importante papel na modulação de diversos processos – como, por exemplo, o crescimento e a proliferação – podendo ser considerada um fator crítico durante o período de desenvolvimento, tendo em vista que, durante a embriogênese, reprime a proliferação e sobrevivência celulares (7).

Figura 1 – Esquema da ativação da AKT por meio da ativação da PI3K, efeito antagonizado pela ação de fosfatase da PTEN.



A ativação de um receptor do tipo tirosina quinase, como o receptor de insulina, por exemplo, leva à sua auto-fosforilação, com posterior ativação do substrato do receptor de insulina (IRS) e da PI3K, que fosforila PIP_2 em PIP_3. A PDK pode, assim, ancorar-se na membrana, ativando-se e fosforilando a AKT, ativando assim sua via de sinalização. A PTEN, por sua vez, antagoniza esta ativação por meio da desfosforilação de PIP_3 em PIP_2. Adaptado de Hemmings e Restuccia, 2012.(8)

Camundongos com expressão parcial da PTEN apresentam crescimento anormal de múltiplos órgãos, e desenvolvem tumores em diversas regiões, como no endométrio, fígado, próstata, glândula adrenal, trato gastrointestinal, tireoide e timo (9–12). Já os animais nocautes para o gene *Pten* não são capazes de sobreviver até o nascimento, morrendo precocemente durante a vida embrionária (9–11,13).

Contudo, as funções da PTEN não se limitam à supressão de tumores. No sistema nervoso central (SNC), a PTEN é expressa em praticamente todos os neurônios, estando presente em dendritos e espinhas dendríticas do córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório (14). Sua deleção no SNC pode afetar o número, tamanho e capacidade de migração das células (15–18). A PTEN ainda apresenta um papel importante durante a extensão dos neuritos, constituindo um fator essencial para a sobrevivência de neurônios diferenciados (19). Gu et al. (20) demonstraram que a PTEN, atuando especificamente no núcleo, modula diretamente a ação do fator de transcrição CREB (*cyclic AMP response element binding*), que também pode ser modulado através da via da PI3K/AKT (21). Através da ativação do CREB, pode haver um consequente aumento da transcrição de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (22), uma neurotrofina com importantes efeitos no desenvolvimento, homeostase e plasticidade do sistema nervoso, que pode ser modulada por diversos fatores ou mesmo por mecanismos fisiopatológicos de variadas doenças neurológicas e metabólicas [revisado em (23)].

Corroborando estes dados, observou-se que a ausência da PTEN pode levar a um aumento do tamanho e número de ramificações dos dendritos, levando a um maior número de sinapses (24–26), contudo culminando em uma redução do LTP (*long-term potentiation*) (27) e LTD (*long-term depression*) (27,28). Este efeito pode ser um dos mecanismos que justificariam a associação de mutações da PTEN a déficits cognitivos e à desordem do espectro autista (29). De fato, estudos em camundongos observaram distúrbios comportamentais associados à deleção neuronal da PTEN, como dificuldade de interação social e ansiedade (24,30).

1.2 Sistema Cre-loxP

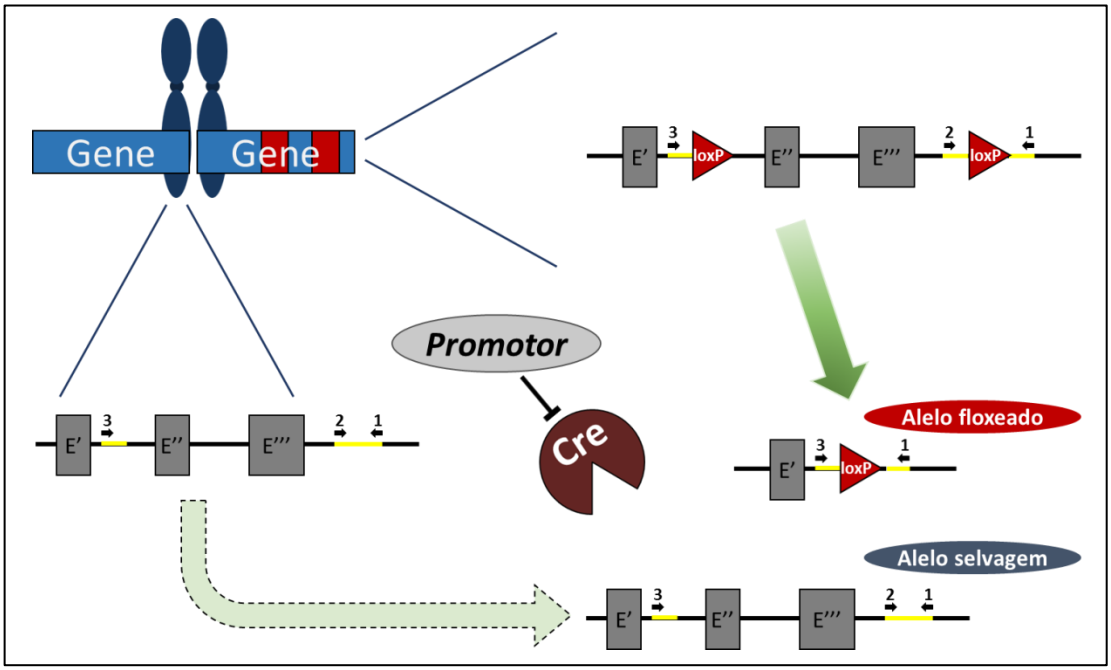
Como a deleção total da PTEN é crítica para o desenvolvimento em camundongos, fazendo com que os embriões morram precocemente durante a embriogênese (9–11), a grande maioria dos estudos atuais sobre a sinalização da PTEN vem sendo realizados com a utilização de animais nocautes condicionados.

O desenvolvimento de animais nocautes tecido- e tempo-específicos tem se mostrado uma ferramenta crucial para o estudo dos efeitos da PTEN em diversos tecidos, bem como em diferentes tempos do desenvolvimento do animal. Isto se faz possível com o uso da tecnologia do sistema Cre-loxP. Este sistema foi descoberto no bacteriófago P1 como parte do ciclo de vida normal do vírus, que usa a recombinação Cre-loxP para circularizar e facilitar a replicação do seu DNA genômico (31,32). Uma vez caracterizada, a estratégia de recombinação do bacteriófago tem sido explorada para a manipulação do genoma em diferentes modelos, sendo aplicado, por exemplo, em culturas de células de mamíferos, leveduras, plantas e em camundongos (33).

Este sistema requer dois componentes: 1) a Cre recombinase, enzima que catalisa a recombinação entre dois sítios loxP; e 2) sítios LoxP, sequências de 34 pares de base reconhecidos pela Cre, cuja orientação determina se a recombinação induz uma deleção, inversão ou translocação entre cromossomos (34). A maioria das recombinações Cre-loxP gera uma deleção, ou seja, dois sítios loxP são posicionados de forma a conter, no espaço entre eles, uma sequência que codifica o gene alvo (denominado *floxed* ou loxP-flanqueado). Assim, quando a enzima Cre – que pode ter sua expressão modulada por um promotor tecido-específico – é expressa, a região do gene entre os sítios loxP é deletada, dando origem ao fenótipo nocaute condicionado (34). Este processo encontra-se esquematizado na Figura 2.

Utilizando-se o promotor do gene da enolase específica de neurônio de rato (*Nse*) – cuja expressão é mais significativa após o 5^{o} dia pós-natal (35) –, pode-se obter uma linhagem na qual a PTEN é deletada especificamente em neurônios. Neste estudo, optou-se por utilizar um modelo de deleção parcial condicionada ($Pten^{loxp/+};Nse\text{-}Cre^{+}$), na qual apenas um alelo da PTEN é deletado. Esta escolha é justificada pela maior aproximação da realidade, constituindo um melhor modelo experimental de desordens do espectro autista com macrocefalia concomitante (36), diferentemente de Kwon et al. (24), que utilizaram animais com deleção total ($Pten^{loxp/loxp};Nse\text{-}Cre^{+}$), genótipo que se demonstrou letal em nosso laboratório (dados não publicados).

Figura 2 – Esquema da recombinação do DNA flanqueado pelos sítios loxP (floxeado) mediado pela Cre recombinase.



No sistema de recombinação Cre-loxP, um determinado gene de interesse tem alguma região flanqueada por dois sítios loxP – no caso, os éxons E'' e E''' – que são reconhecidos pela Cre recombinase, gerando o DNA sem a região floxeada. No caso de um alelo selvagem, não há sítios loxP presentes, portanto a Cre não reconhece a região, não havendo recombinação. A expressão da Cre recombinase pode ser condicionada ao promotor de algum gene sítio e/ou tempo específico. Os números 1, 2 e 3 representam regiões que podem ser utilizadas para o desenho de *primers* para a genotipagem, permitindo a observação da presença ou não do sítio loxP na região.

1.3 Intervenções Não-Farmacológicas: a dieta intermitente e o exercício físico

Conhecido como um dos principais fatores descritos como moduladores da neurogênese, o exercício físico tem sido relatado na literatura por seu potencial em aumentar a proliferação e a neurogênese no hipocampo de camundongos, correlacionando-se com melhor desempenho dos animais em testes comportamentais envolvendo aprendizado espacial e modelo de separação espacial, além de aumento no LTP (37,38), um dos principais marcadores de plasticidade sináptica.

Desde sua caracterização, a capacidade de geração de novos neurônios pelo cérebro de mamíferos adultos tem sido demonstrada e profundamente analisada, ocorrendo em algumas regiões como a zona subventricular, adjacente aos ventrículos laterais, e a zona subgranular do giro dentado do hipocampo (39–42). A neurogênese em adultos pode ser regulada por muitos fatores – genéticos, fisiológicos, patológicos e comportamentais – que podem modular a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos neurônios. Por exemplo, estresse (43), glicocorticóide (44), e inflamação (42) podem reprimir a neurogênese na fase adulta. Por outro lado, o estrógeno (45,46), antidepressivos (47,48), o BDNF (49), o fator de crescimento

semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (50), o aprendizado (51), o enriquecimento ambiental (52), e o exercício físico (53,54) podem estimular a neurogênese.

Evidências atuais apontam como mecanismo de ação o envolvimento de hormônios e de fatores de crescimento, como o IGF-1, o BDNF (55,56) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nestes efeitos sobre a plasticidade sináptica mediados pelo exercício físico (57–59). A maturação dos neurônios recém-nascidos no hipocampo é também estimulada pelo exercício físico (60,61), além da expressão da subunidade tipo 1 do receptor de NMDA (NR1) (62). A própria plasticidade da composição do receptor NMDA – modulação da proporção dos diferentes subtipos de subunidades do receptor – influencia sua permeabilidade e sinalização, podendo constituir-se como uma forma de modulação da plasticidade sináptica (63).

Contudo, demonstrou-se que a inibição farmacológica da AKT pode prejudicar os efeitos benéficos do exercício físico em relação à neurogênese e plasticidade sináptica em ratos (64), ressaltando o potencial papel da PTEN na regulação destes efeitos. No entanto, ainda não são claros os mecanismos de interação destas vias na modulação da plasticidade sináptica pelo exercício físico.

De forma semelhante ao exercício físico, diversos estudos apontam a dieta intermitente (DI) como uma interessante intervenção neuroprotetora (65). A DI consiste em um protocolo de alternância entre dias de jejum – apenas com a manutenção do fornecimento de água – e acesso livre e ilimitado (*ad libitum*) à alimentação (66). Desta forma, visa-se limitar a frequência de consumo alimentar, sem necessariamente alterar a quantidade total de alimento ingerido.

No SNC, a DI já foi demonstrada como uma intervenção capaz de melhorar os processos de aprendizado e memória, aprimorando o desempenho em testes comportamentais (67). Em camundongos, a DI induziu melhora da função cognitiva e da plasticidade sináptica, modulando a expressão da subunidade 2B do receptor NMDA (NR2B) (68). Mais uma vez, há uma indicação de que os efeitos da DI possam ser mediados pelo BDNF, potencialmente modulando a neurogênese, plasticidade sináptica e melhora cognitiva em diversos modelos (67).

Desta forma, o estudo das vias de sinalização da PTEN em neurônios é de grande relevância para a elucidação dos mecanismos envolvidos na regulação de fatores associados à plasticidade sináptica. A avaliação da influência de intervenções não-farmacológicas – como a dieta intermitente e o exercício físico voluntário – sobre a via PTEN/AKT/CREB, bem como sobre a modulação da expressão de BNDF, pode auxiliar no melhor entendimento destes efeitos, além de contribuir para a busca de ferramentas de intervenções mais eficazes para o tratamento de distúrbios do SNC, como doenças neurodegenerativas e as desordens do espectro autista.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo realizar uma caracterização bioquímica e funcional de camundongos adultos, avaliando os efeitos ocasionados pela deleção parcial condicionada da PTEN e a potencial modulação por efeitos de intervenções não-farmacológicas – a dieta intermitente e o exercício físico voluntário.

2.2 Objetivos Específicos

a) caracterizar o estado cognitivo – ansiedade, aprendizado e memória – de camundongos heterozigotos para a deleção condicionada da PTEN e a potencial modulação da dieta intermitente e do exercício físico sobre estes efeitos;

b) caracterizar os efeitos bioquímicos hipocampais e corticais ocasionados pela deleção heterozigota condicionada da PTEN e sua interação com os efeitos mediados pela dieta intermitente e pelo exercício físico, por meio do estudo da via de sinalização PI3K/AKT e da modulação da atividade glutamatérgica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

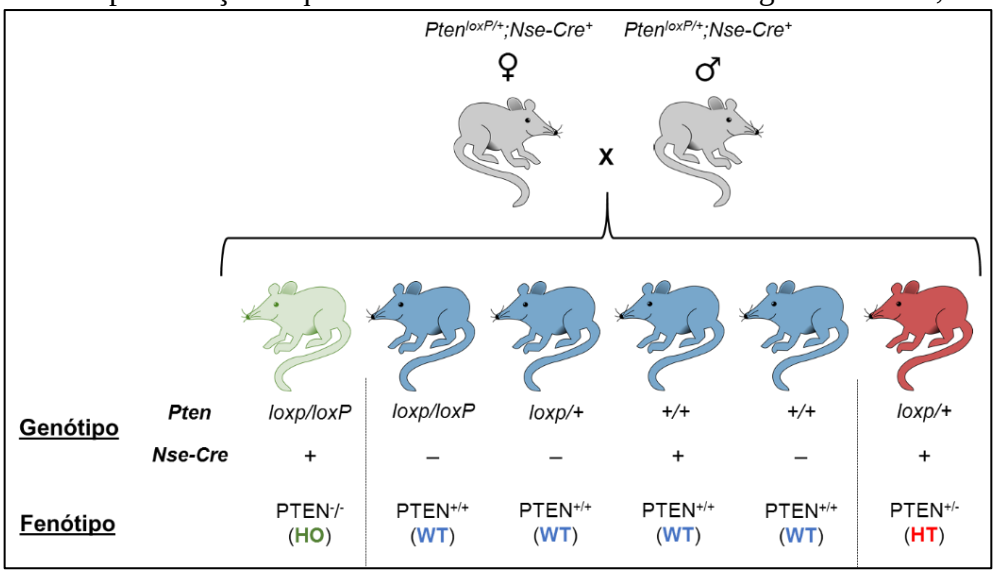
3.1 Documentação Requerida

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) – inscrito sob o número 167, na folha 113 do livro 2 – e o protocolo experimental seguiu todas as exigências descritas pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos nocautes condicionados da PTEN (PTEN$^{+/-}$) machos adultos, cujas matrizes foram advindas do cruzamento de animais *Pten*$^{loxp/loxp}$ (originado com fundo genético da linhagem C57/BL6) com animais transgênicos *Nse-Cre*$^{+}$ (com fundo genético nas linhagens C57/BL6 e SJL), obtidos originalmente na *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA), sob o código B6.Cg-Tg(Eno2-cre)39Jme/J. Este cruzamento originou a linhagem denominada *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$, conforme esquematizado na Figura 3. Neste estudo, foram utilizados os animais com o fenótipo de deleção heterozigota da PTEN, PTEN$^{+/-}$ (HT), para a avaliação dos efeitos da deleção da proteína. Os animais com o fenótipo PTEN$^{+/+}$ (WT) foram utilizados como controle. O estudo com os animais homozigotos, PTEN$^{-/-}$ (HO), não foi possível, tendo em vista a sobrevida limitada destes animais, que vão a óbito entre os primeiros dias e as primeiras semanas de vida.

Figura 3 – Representação esquemática dos cruzamentos da linhagem Pten$^{loxp/+}$;Nse-Cre^{+}.



WT (*wild-type*, selvagem), HT (heterozigoto), HO (homozigoto).

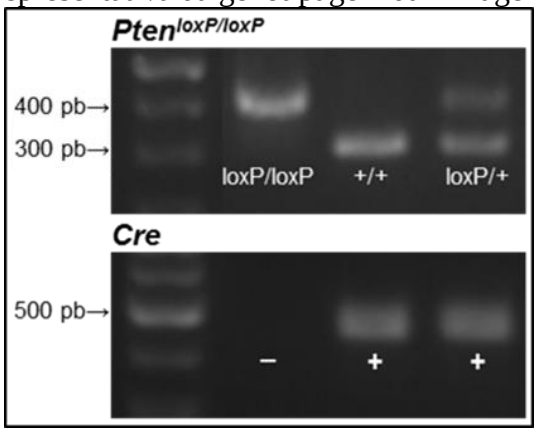
A linhagem Pten$^{loxp/+}$;Nse-Cre^{+} foi gentilmente cedida pelo Dr. Mark Mattson e pela Dra. Simonetta Camandola do *Laboratory of Neurosciences* (*National Institute on Aging, National Institutes of Health*, Baltimore, MD, EUA) e foi mantida nas dependências do Biotério de Camundongos dos laboratórios de Neurofarmacologia Molecular e Neurobiologia Molecular e Funcional do Departamento de Farmacologia do ICB/USP. Os animais ficaram acondicionados em gaiolas plásticas instaladas em microisoladores ventilados, em grupos de até 5 camundongos (para a dieta intermitente) ou isoladamente (para o exercício físico). A temperatura foi mantida constante (22 ± 2 ºC) e os animais foram mantidos sob ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 7 e 19 h).

3.3 Genotipagem da Linhagem Transgênica

A genotipagem foi realizada a partir de um fragmento de aproximadamente 2 mm da cauda dos camundongos, coletado após o desmame, e os animais foram marcados utilizando um furador de orelhas apropriado. O protocolo foi baseado nas recomendações do fornecedor dos animais *Nse-Cre*$^{+}$ (*The Jackson Laboratory*) e no protocolo aplicado no laboratório do Dr. Mark Mattson.

Para extração do DNA, a cauda foi digerida com tampão de extração (NaOH 25mM, EDTA 0,2 mM) por 1 h a 98 ºC, sob agitação. A amostra foi colocada em gelo e foi adicionada uma solução de Tris HCl 40 mM pH 5,5. Em seguida, foi centrifugada a 1.500 x g por 3 min e o sobrenadante foi recolhido. Uma alíquota foi retirada para a dosagem da concentração de DNA – realizada em Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) – sendo o restante armazenado a -80 ºC até a realização do ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a análise do genótipo. A avaliação do genótipo dos alelos floxeados do gene Pten pode gerar três resultados: homozigoto para o gene floxeado (*Pten*$^{loxp/loxp}$), heterozigoto (*Pten*$^{loxp/+}$), ou homozigoto para o gene selvagem (*Pten*$^{+/+}$). Já a genotipagem do gene Cre possui apenas dois possíveis resultados – positivo (*Cre*$^{+}$) ou negativo (*Cre*$^{-}$) para o gene – uma vez que o primer utilizado não possibilita a distinção entre homozigoto positivo e heterozigoto para este gene (Figura 4).

Figura 4 – Imagem representativa da genotipagem da linhagem Pten$^{loxp/+}$;Nse-Cre^{+}.

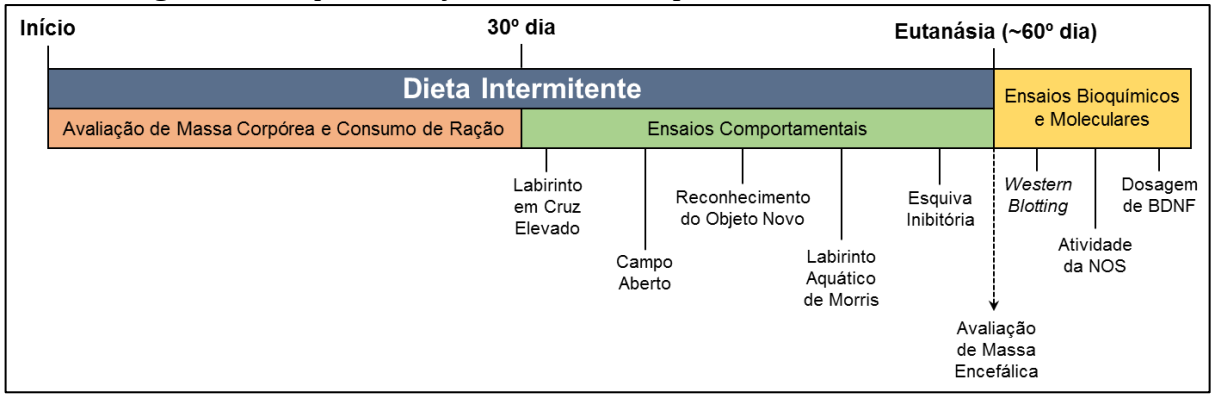


Gel de agarose marcado com brometo de etídeo, exibindo as bandas da região próximas ao éxon 5 da Pten, um dos sítios nos quais o loxP é inserido, tem aproximadamente 300 pares de base (pb).

3.4 Dieta Intermitente

Para o protocolo da dieta intermitente, os animais foram divididos em dois grupos – selvagem (*wild-type*, WT) e heterozigoto para deleção neuronal da PTEN (HT) –, com dois subgrupos cada – controle (*ad libitum*, AL) e dieta intermitente. O protocolo de dieta intermitente (69) consiste em alternar o fornecimento de alimento ao animal a cada dia, variando entre ração AL e o não fornecimento de ração, por 30 dias, mantendo o fornecimento de água continuamente. A massa corpórea foi avaliada semanalmente e, a partir do 30^{o} dia, iniciou-se a realização dos experimentos, conforme esquematizado na Figura 5, mantendo-se os animais em dieta intermitente. Cada animal teve sua massa corpórea e consumo de ração avaliados semanalmente, durante o período experimental. Após a eutanásia, o encéfalo foi dissecado e foram avaliadas a massa encefálica total e as massas do cerebelo, hipotálamo, hipocampo e córtex.

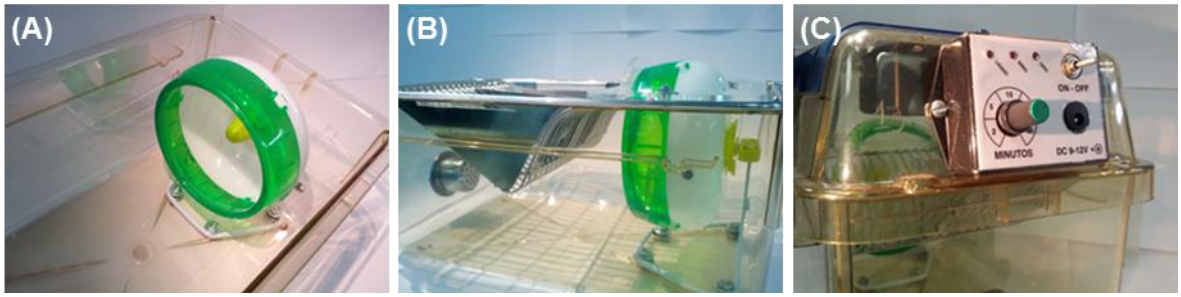
Figura 5 – Esquematização do desenho experimental da dieta intermitente.



3.5 Exercício Físico

Semelhantemente ao protocolo da dieta intermitente, os animais foram divididos em dois grupos – WT e HT –, com dois subgrupos cada – controle e exercício físico (ExFis). O protocolo de exercício físico, modificado de van Praag et al. (53), consiste no isolamento do animal em uma gaiola com a disponibilização de uma roda giratória em tempo integral (Figura 6), possibilitando a realização de atividade física voluntária. Os animais controle foram isolados em gaiolas semelhantes, porém na ausência da roda giratória. Antes do início da contagem do tempo experimental, os animais foram avaliados por 3 a 5 dias, a fim de se verificar se todos eram motivados a utilizar o aparato. Em caso negativo, trocava-se o animal por outro de genótipo semelhante e avaliava-se sua motivação. Para isto, fez-se uso de um odômetro digital, instalado nas gaiolas, que registra em cartão de memória o número de giros da roda por unidade de tempo. A conversão do número de giros em distância percorrida é realizada pela multiplicação do número de voltas registradas pelo perímetro interno da roda giratória.

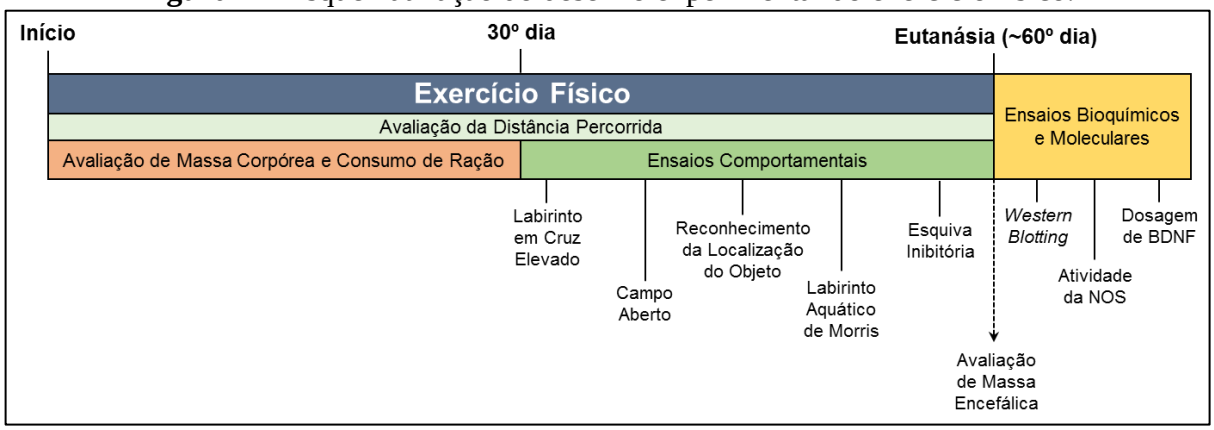
Figura 6 – Fotografias do sistema de roda giratória com registro temporal de contagem de giros utilizado para o protocolo de exercício físico voluntário.



Em destaque, a roda giratória acoplada à caixa (A), a adaptação da grade da caixa ventilada para encaixe da roda (B) e o sistema de contagem temporal de giros (C).

A partir do 30^{o} dia de exercício, os ensaios comportamentais foram iniciados, conforme representado na Figura 7, mantendo-se os animais nas gaiolas com ou sem a roda, de acordo com os subgrupos. Cada animal teve sua massa corpórea e consumo de ração avaliados semanalmente, durante o período experimental. Após a eutanásia, o encéfalo foi dissecado e foram avaliadas a massa encefálica total e as massas do cerebelo, hipocampo e córtex.

Figura 7 – Esquematização do desenho experimental do exercício físico.



3.6 Ensaios Comportamentais

3.6.1 Labirinto em Cruz Elevado

O ensaio do labirinto em cruz elevado é utilizado para avaliação de comportamento associado ao medo e ansiedade e foi realizado com base no protocolo descrito por Texel et al. (70), com algumas modificações. O aparato consiste em um labirinto de madeira no formato de cruz, elevado em cerca de 60 cm do apoio, com os quatro braços medindo 25 cm x 5 cm. Dois braços opostos são fechados dos lados e no fundo por uma parede de aproximadamente 20 cm de altura, ao passo que os outros dois braços são abertos – possuindo apenas um pequeno degrau de contenção de aproximadamente 1 cm. O animal é colocado no centro do aparato, voltado para o braço fechado na direção oposta ao experimentador, e sua mobilidade no labirinto é avaliada por 5 min. O perfil de exploração do animal em relação às regiões do labirinto – braços abertos, fechados e centro – é avaliado, considerando-se um comportamento menos ansioso aquele demonstrado por um animal com maior mobilidade e com maior proporção de exploração do braço aberto e do centro em relação ao braço fechado.

3.6.2 Campo Aberto

O ensaio do campo aberto é utilizado para avaliar a mobilidade e o comportamento associado ao medo e à ansiedade. O protocolo utilizado foi baseado no descrito por Kawamoto et al. (71). Resumidamente, o teste consiste em avaliar o perfil de atividade do animal em um aparato de plástico, de aproximadamente 40 cm x 40 cm x 15 cm, por 10 min. Para fins de análise, o aparato é dividido imaginariamente em uma região central e uma região periférica. Avalia-se a mobilidade do animal – distância percorrida e velocidade média –, bem como a proporção do tempo no qual o animal permaneceu na região central. A região central consiste em uma área na qual o animal encontra-se mais exposto, portanto o tempo total no

qual o animal fica na região, comparativamente à região periférica, é inversamente associado ao comportamento ansioso.

3.6.3 Reconhecimento do Objeto Novo

Este teste comportamental, baseado no descrito por Bevins e Besheer (72), é baseado na tendência de roedores, como os camundongos, em interagir mais com objetos novos do que com objetos familiares, possibilitando a exploração deste comportamento para a avaliação cognitiva de aprendizado e memória. Os animais foram colocados individualmente em uma caixa experimental por 10 min por cinco dias consecutivos, constituindo o período de habituação ao ambiente de avaliação. No dia do teste, o sexto dia, os camundongos foram colocados na caixa experimental com dois objetos iguais fixados, tendo 10 min para a familiarização. Duas horas após a familiarização, os animais foram novamente colocados na caixa, porém com um dos objetos substituído por um objeto novo. Os animais foram monitorados, com o auxílio de uma câmera de vídeo, por 5 min, e o tempo em que os mesmos permaneceram explorando o objeto novo em relação ao objeto familiar foi avaliado.

3.6.4 Reconhecimento da Localização do Objeto

O ensaio do reconhecimento da localização do objeto, semelhantemente ao teste do reconhecimento do objeto novo, avalia um tipo de memória hipocampo-dependente e foi adaptado de Ferguson e Sapolski (73). Em suma, os animais foram colocados individualmente em uma caixa experimental vazia por 1 min para ambientação. Após 30 s, os animais foram recolocados na caixa experimental, porém desta vez contendo dois objetos iguais, por 5 min, para familiarização. Após 15 min, os animais foram novamente colocados na caixa, porém com um dos objetos movidos para uma posição diferente no ambiente. Os animais foram monitorados, com o auxílio de uma câmera de vídeo, por 5 min, e o tempo em que os mesmos permaneceram explorando o objeto na posição nova em relação ao objeto não movido foi avaliado.

3.6.5 Labirinto Aquático de Morris

Este protocolo é baseado nos trabalhos de Shaw et al. (74) e de Okun et al. (75). O labirinto aquático é uma piscina circular com água a 27 ± 2 ºC corada com tinta branca não tóxica. Os animais apenas conseguem escapar da água subindo em uma plataforma de 9 cm de diâmetro posicionada em um dos quadrantes da piscina. Na sala experimental, foram posicionadas pistas ambientais para a facilitação da localização espacial pelo animal. A

observação comportamental foi acompanhada por um sistema de captação digital computadorizado.

3.6.5.1 Treinamento

Os animais foram treinados para buscar e memorizar a localização da plataforma por 5 dias. A cada dia, os animais eram submetidos a 4 seções de até 60 s, nas quais deveriam encontrar a localização da plataforma submersa 1 cm abaixo da superfície do líquido – e, portanto, não visível –, do contrário eram conduzidos até a mesma e mantidos por 10 s. A latência média para encontrar a plataforma no decorrer dos dias foi utilizada para avaliar o aprendizado.

3.6.5.2 Memória de Referência

Para avaliação da memória espacial de referência, os animais foram colocados na piscina 4 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o último treino, por um tempo de 60 s. Para a realização destes testes, a plataforma foi retirada e avaliou-se o tempo no qual o animal passava no quadrante ou no entorno da plataforma. A natação persistente no quadrante da plataforma é um indicativo da formação de memória espacial de curto prazo, e o tempo foi quantificado para a comparação entre os grupos. A avaliação no tempo de 4 h foi utilizada como indicador de memória de referência, ao passo que as outras avaliações foram utilizadas para avaliar a capacidade de extinção desta memória formada.

3.6.5.3 Memória Operacional

Para avaliação da memória operacional, o procedimento é semelhante ao da etapa de treinamento, porém os testes são realizados por 4 dias e, a cada dia, a plataforma é realocada para uma posição diferente. A cada tentativa em um mesmo dia espera-se que a latência para buscar a plataforma seja reduzida, uma vez que o animal reaprende a localização da plataforma. A média dos valores encontrados entre as mesmas tentativas dos 4 dias de teste é utilizada para avaliar a capacidade do animal em armazenar a memória operacional da localização da plataforma entre o intervalo das tentativas.

3.6.6 Esquiva Inibitória

O protocolo da esquiva inibitória, baseado no descrito por Vasconcelos et al. (76), é outra reconhecida ferramenta de análise de aprendizado e memória. Seu aparato consiste em dois compartimentos de acrílico de mesmo tamanho – um iluminado e o outro escuro – separados

por uma porta cujo controle de abertura é realizado remotamente. A base de ambas as câmaras é feita de uma tela de aço inoxidável, porém a região da câmara escura pode ser eletrificada. Na sessão de exposição, os animais foram colocados individualmente no compartimento iluminado e a porta foi aberta. Ao entrar na câmara escura, a porta era fechada e o animal recebia uma descarga elétrica de 0,5 mA por 3 s. Após o choque, o animal foi retirado do compartimento escuro e colocado de volta em sua gaiola. Passadas 24 h após a exposição ao choque, os camundongos foram submetidos à sessão de avaliação. Nesta etapa, os animais foram colocados novamente no compartimento iluminado e avaliou-se a latência de reentrada na câmara escura, com um tempo limite de 5 min. Considera-se esta latência como um indicativo proporcional à capacidade de memória de longo prazo.

3.7 Ensaios Bioquímicos e Moleculares

3.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Cada tubo de reação continha 1 μL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores (10 μM) senso e antisenso, 3 μL do DNA (na concentração aproximada de 300 ng/μL) e 21 μL do *mix* (DNTP 200 μM; Tampão para Taq adicionado de $(NH_4)_2SO_4$ 1x; $MgCl_2$ 2 mM; Taq polimerase 1 U; H_2O DEPC). As condições das reações foram: (I) Cre: 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, e por fim 72 °C por 10 min; (II) 1,2 loxP: 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, e por fim 72 °C por 10 min. As reações foram realizadas em um termociclador (Techne, Staffordshire, Reino Unido). Os oligonucleotídeos foram: (I) Cre: *forward*: 5’ - AGG TGT AGA GAA GGC ACT TAG C - 3’, *reverse*: 5’ - CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG G - 3’; (II) 1,2 loxP: *forward*: 5’ - TGT TTT TGA CCA ATT AAA GTA GGC TGT G - 3’, *reverse*: 5’ - AAA AGT TCC CCT GCT GAT GAT TTG T - 3’. O produto da reação foi diluído em tampão de amostra (azul de bromofenol 420 μg/mL, glicerol 0,5%), e separado em gel de agarose (agarose 1,8% contendo brometo de etídeo 10 μg/mL) por eletroforese a 100 V por 40 min em tampão de corrida TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 0,11%, EDTA 1 mM). A visualização e captação da imagem do gel foi realizada no aparelho G-Box (Syngene/Synoptics, Cambridge, Inglaterra).

3.7.2 Extração de Proteínas Citosólicas e Nucleares

O método utilizado foi descrito em trabalhos anteriores de nosso grupo (76), com algumas modificações. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (HEPES 20 mM; $MgCl_2$ 1,0 mM; EDTA 0,5 mM; NP-40 1%; EGTA 1,0 mM) gelado

adicionado de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM, Leupeptina 2 g/mL, Antipaína 2 g/mL) e fosfatases (Na_3VO_4 3 mM, Pirofosfato de Sódio 20 mM). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 17.000 x g por 5 min a 4 ºC, coletando-se o sobrenadante (extrato citosólico) para o ensaio de *Western Blotting*. O *pellet* foi ressuspendido em tampão de homogeneização novamente, para evitar possível contaminação com a fração citosólica. A suspensão foi centrifugada a 17.000 x g por 5 min a 4 ºC e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi ressuspendido em tampão de extração (HEPES 20 mM; $MgCl_2$ 1,0 mM; EDTA 0,5 mM; NP-40 1%; EGTA 300 mM; PMSF 0,5 mM, Leupeptina 2 g/mL, Antipaína 2 g/mL, Na_3VO_4 3 mM, Pirofosfato de Sódio 20 mM) e incubado 30 min em gelo, centrifugando-se posteriormente o extrato à 20.000 x g por 20 min a 4 ºC. O sobrenadante (extrato nuclear) foi recolhido e a concentração de proteínas determinada segundo o método descrito abaixo. As amostras foram armazenadas a -80 ºC até o momento do uso. O extrato citoplasmático foi utilizado para o ensaio de *Western Blotting*.

3.7.3 Determinação da Concentração de Proteínas

A dosagem da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford (77), utilizando o reagente da BioRad (BioRad, Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina do soro bovino forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.7.4 Ensaio de Western Blotting

O ensaio de *Western Blotting* foi utilizado para a avaliação da expressão da PTEN, p- AKT total e suas formas fosforiladas nos resíduos S473 (p-AKT^{S473}) e T308 (p-AKT^{T308}), receptor NMDA tipo 1 total (NR1) e fosforilado (p-NR1), receptor AMPA total (AMPA) e fosforilado (p-AMPA), nas concentrações de 1:1000 (formas totais) ou 1:500 (formas fosforiladas), em TBS-T (Tris-base 100 mM, NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%). O protocolo utilizado é baseado no descrito por Laemmli (78). As proteínas foram ajustadas para a concentração de 1,5 µg/µL com o tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 20% v/v, DTT 200 mM, azul de bromofenol 0,02%, pH 6,8) e incubadas por 10 min a 70 ^{0}C. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1); 1% de SDS], para que houvesse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM,

SDS 0,1%). O gel foi corrido por volta de 3 h a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, Hercules, CA, EUA) por aproximadamente 120 min a 400 mA, utilizando um tampão de transferência (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Etanol 20%).

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução vermelho de Ponceau (Ponceau-S 0,5%, Ácido tricloroacético 5%), lavadas com água bidestilada até a retirada do excesso da solução corante e deixadas *overnight* a 4 ^{0}C em solução de albumina sérica bovina (BSA) 5% em TBS-T (Tris-base 100 mM, NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%), para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (1:1000) diluído em TBS-T com BSA a 1% *overnight* a 4 ^{0}C. As membranas foram então lavadas 5 vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (1:2000) diluído em TBS-T com BSA a 1% por 2 h. A revelação foi feita através de kit de quimioluminescência (Millipore, Billerica, MA, EUA) e analisadas no aparelho G-Box.

3.7.5 Atividade da Óxido Nítrico Sintase (NOS)

A avaliação da atividade da NOS foi realizada conforme descrito por Kawamoto et al. (79), por meio da análise da conversão de ^{3}H-arginina em ^{3}H-citrulina. O homogenato proteico foi tratado em uma resina de troca iônica (Dowex 50WX8-400) para remoção da arginina endógena. O homogenato foi incubado em tampão de ensaio (HEPES 30 mM, EDTA 1 mM, $CaCl_2$ 1,25 mM, NADPH 1 mM, calmodulin 10 g/ml, FAD 4 μM, FMN 4 μM, tetrahidrobiopterina 25 μM, L-arginina 120 nM e ^{3}H-arginina 0,5 Ci, pH 7,4) por 60 min a 37 ºC. A reação foi interrompida por HEPES 20 mM, pH 5,5. A ^{3}H-citrulina foi separada da ^{3}H-arginina por eluição em uma coluna de troca iônica. O eluato foi coletado em um tubo contendo fluido de cintilação (UltimaGold, Packard, EUA) e a radioatividade das amostras foi avaliada em um contador de cintilação Beckman 6000.

3.7.6 Dosagem do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF)

A expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) foi determinada por um ensaio de ELISA, por meio do Kit BDNF Emax® ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, EUA). O processamento das amostras, bem como a realização do kit e análise dos resultados foram realizados conforme o protocolo do fabricante.

3.8 Avaliação do Perfil de Expressão da Cre Recombinase

3.8.1 Linhagem Nse-Cre^{+};tdTomato^{+}

A fim de validar o modelo estudado – avaliando e confirmando o padrão de deleção da PTEN –, foram utilizados camundongos transgênicos da linhagem *tdTomato*$^{+}$, em uma colaboração com o Prof. Dr. José Donato Júnior (Departamento de Fisiologia do ICB/USP). Estes animais possuem o gene repórter *tdTomato*, cuja expressão é inibida por um repressor floxeado. A expressão da Cre recombinase permite a recombinação dos sítios loxP, que flanqueiam o repressor da expressão do tdTomato, fazendo com que nas células onde há – ou houve em algum momento – a expressão da recombinase, haja a expressão da proteína fluorescente tdTomato. Para isso, animais da linhagem *Nse-Cre*$^{+}$ foram cruzados com animais *tdTomato*$^{+}$, gerando filhotes *Nse-Cre*$^{+}$*;tdTomato*$^{+}$.

3.8.2 Ensaios Histológicos

Os ensaios histológicos foram realizados com base nos protocolos descritos por Masson et al. (80) e por Furigo et al. (81) com algumas modificações. Os encéfalos foram perfundidos e fixados com PFA 4% e seccionados em micrótomo, no plano coronal e coletados em placas de cultura em tampão fosfato (PB) 0,1 M. Os animais da linhagem *tdTomato*, quando há co-expressão da Cre recombinase, expressam a proteína fluorescente tdTomato, não exigindo reações prévias para imunofluorescência. A análise dos cortes foi realizada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão), que possui o sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C. Para a revelação por imunohistoquímica, os cortes foram incubados com um anticorpo anti-tdTomato e tratados para revelação por imunoperoxidase conforme descrito por Furigo et al. (81)

3.9 Análise Estatística

Os dados obtidos dos ensaios de *Western Blotting* foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica do programa ImageJ (*National Institutes of Health*, EUA). Da mesma forma que os dados de massa corpórea e encefálica, consumo de ração, atividade da NOS e dosagem de BDNF, estes resultados receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Holm-Šidák, no qual as diferenças foram consideradas significativas para o valor $P \leq 0,05$. A distância percorrida na roda giratória foi avaliada pelo teste t de Student. Os ensaios comportamentais, por sua vez, foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Holm-Šidák, ou pela análise não-paramétrica

de Kruskal-Wallis, seguida do pós-teste de Dunn, quando pertinente. A análise utilizada foi explicitada na legenda das figuras. Para representar os dados significativos para o fator "genótipo" da análise de ANOVA de duas utilizou-se duas chaves (entre as barras WT e HT) unidas por uma chave. Para os dados significativos para o fator "tratamento", utilizou-se duas linhas paralelas (sobre as barras relativas aos grupos controle e dieta intermitente ou exercício físico) unidas por uma chave. Todos os gráficos foram representados como a média dos valores ± o erro padrão da média. Para a realização dos testes estatísticos e plotagem dos gráficos, o *software* Graphpad Prism versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos) foi utilizado. Para facilitar indicação do número de animais avaliado em cada gráfico, foi utilizado o seguinte código: controle WT (CW), controle HT (CH), dieta WT (DW), dieta HT (DH), ExFis WT (EW) e ExFis HT (EH).

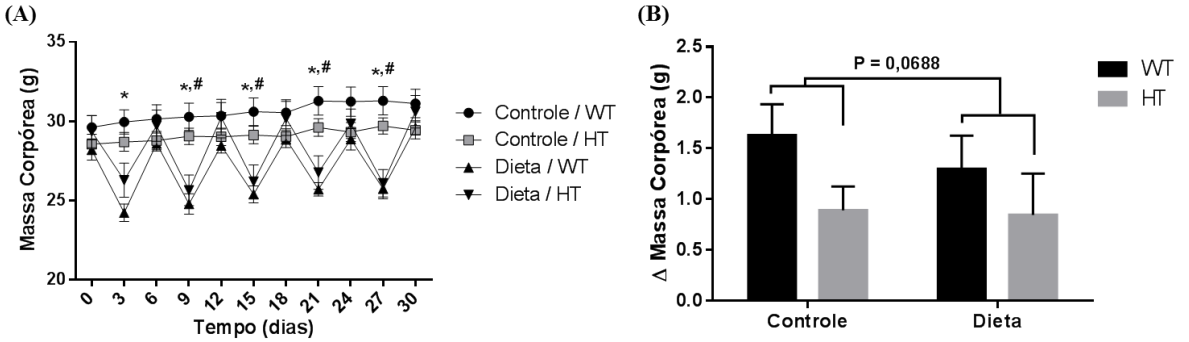
4 RESULTADOS

4.1 Dieta Intermitente

4.1.1 Massa Corpórea e Consumo de Ração

Durante o período de dieta intermitente, os animais tiveram sua massa corpórea e consumo de ração avaliados. Observou-se uma oscilação da massa corpórea, com queda dos valores nos animais em dieta nas avaliações realizadas após os períodos de jejum, que retornava a um valor semelhante aos do grupo controle após o dia com oferecimento de ração *ad libitum* (Figura 8, A). Ainda, foi observada uma tendência de os animais *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$ apresentarem um ganho de massa corpórea reduzido com o tempo – valor avaliado entre o início e o 30º dia de tratamento, antes do início dos ensaios comportamentais (Figura 8, B).

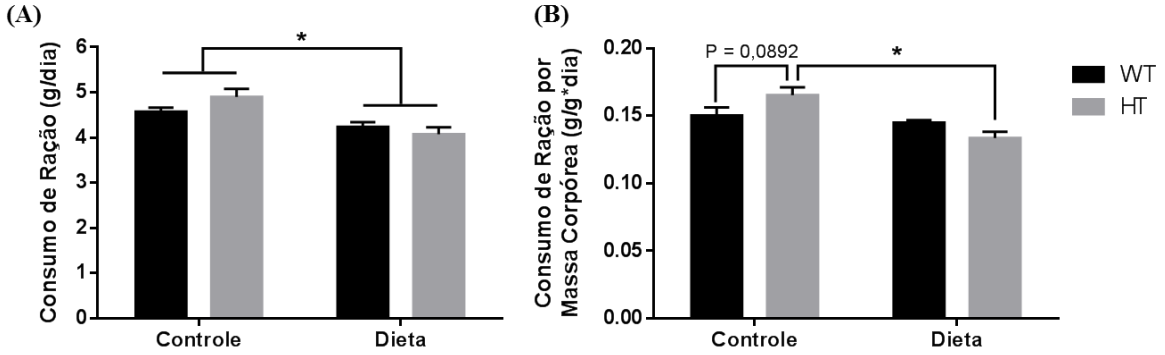
Figura 8 – Avaliação da variação de massa corpórea durante e após o período de dieta intermitente.



(A) curva de massa corpórea pelo tempo; e (B) variação de massa corpórea após o período de dieta intermitente. Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas em (A) e não pareado em (B). P = 0,0688 para o fator genótipo, n = 14 (DH), 15 (CW) ou 16 (CH, DW) em (A) e n = 17 (DW), 18 (CW), 19 (DH) ou 20 (CH) em (B).

Em relação ao consumo de ração, observou-se uma redução – estatisticamente significativa, embora pequena do ponto de vista biológico – do consumo diário médio absoluto de ração nos animais submetidos à dieta intermitente (Figura 9, A). Quando os valores foram ponderados pela massa corpórea dos animais – de forma a controlar possíveis flutuações do consumo de alimento por diferença de tamanho dos animais –, observou-se uma tendência de aumento do consumo de ração nos animais controle HT (Figura 9, B). Interessantemente, este aumento não foi observado nos animais HT submetidos à dieta intermitente – que apresentaram um consumo significativamente menor em relação aos animais controle HT –, indicando uma potencial reversão pelo tratamento do efeito do genótipo.

Figura 9 – Avaliação do consumo de ração durante o período de dieta intermitente.

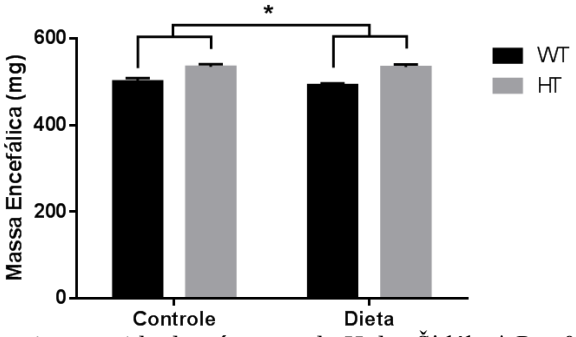


(A) consumo de ração médio diário absoluto ou (B) ponderado pela massa corpórea. Análise por ANOVA de duas vias. * P < 0,05 para o fator tratamento (A) ou para a comparação CH x DH. Não houve diferença estatística significativa, n = 14 (CW, DW, DH) ou 15 (CH).

4.1.2 Massa Encefálica

Após a eutanásia, os encéfalos foram dissecados, tendo sido avaliadas a sua massa total (Figura 10) e as massas do cerebelo, hipocampo e córtex (Figura 11). Observou-se um aumento significativo da massa encefálica dos animais HT em relação aos animais WT (Figura 10), um indicativo de macrocefalia. Nota-se, por outro lado, que a dieta intermitente não exerceu nenhum efeito significativo sobre este parâmetro.

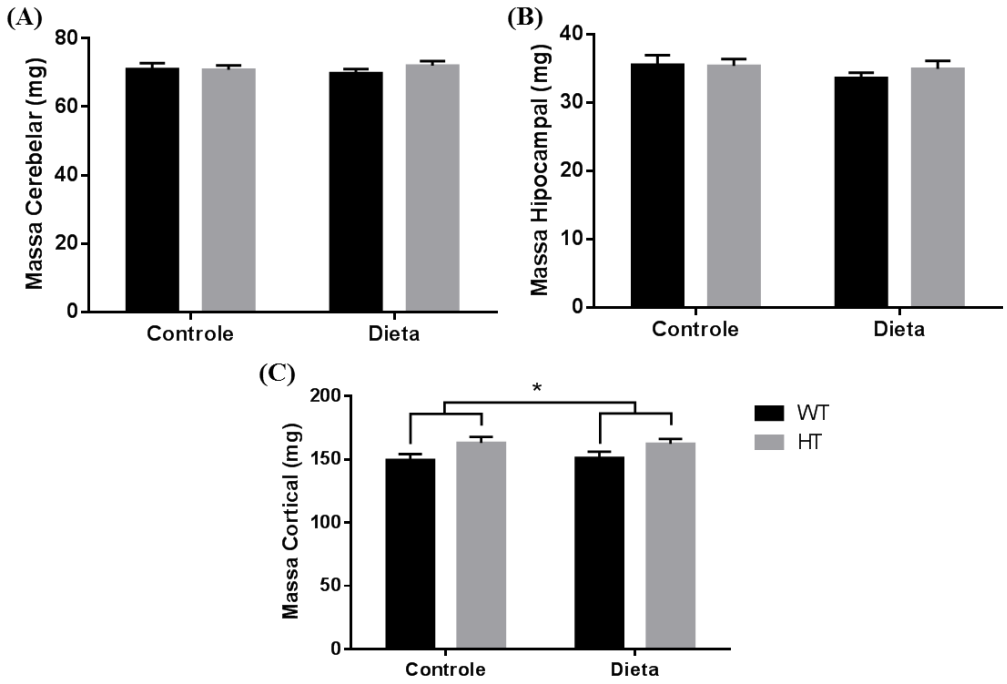
Figura 10 – Avaliação da massa encefálica após o período de dieta intermitente.



Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. * P < 0,05, n = 17 (CW), 19 (DW), 20 (DH) ou 21 (CH).

Não foi observada nenhuma alteração nas massas do cerebelo e do hipocampo nos animais HT (Figura 11, A e B). Por outro lado, foi observado um aumento significativo da massa cortical dos animais com a deleção da PTEN (Figura 11, C), apontando o aumento da massa cortical como um dos contribuintes para a macrocefalia nesta linhagem.

Figura 11 – Avaliação da massa de estruturas do encéfalo após o período de dieta intermitente.



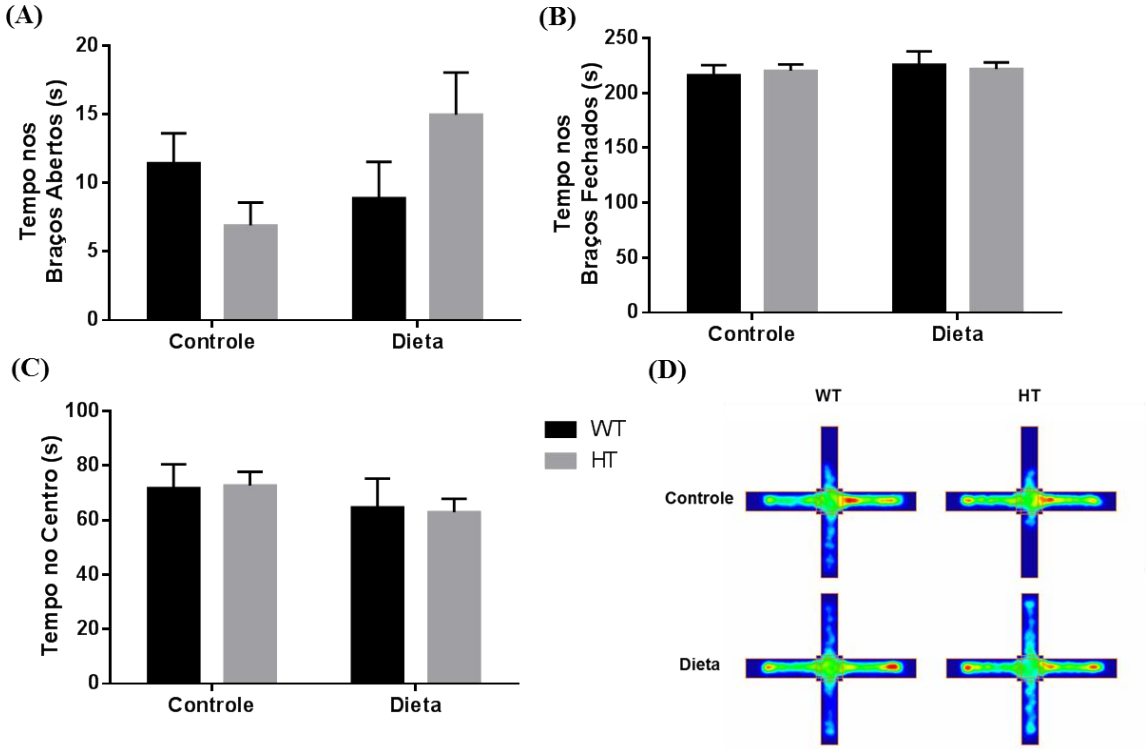
A massa do (A) cerebelo, (B) hipocampo e (C) córtex foram avaliados e os valores foram ponderados pela massa corpórea. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. * P < 0,01 para o fator "genótipo", n = 17 (CW), 19 (DW), 20 (DH) ou 21 (CH).

4.1.3 Ensaios Comportamentais

4.1.3.1 Labirinto em Cruz Elevado

O ensaio do labirinto em cruz elevado pode ser utilizado para a avaliação de parâmetros relacionados ao medo e ansiedade. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos na avaliação do tempo de permanência nas diferentes áreas do labirinto (Figura 12), embora a representação gráfica da Figura 12 (painel A) demonstre uma possível tendência de que os animais HT em dieta intermitente estejam passando um tempo maior nesta área. Esta observação é reforçada pelo mapa de ocupação representativo deste grupo (Figura 12, D), no qual os braços abertos (eixo vertical) apresentam uma marcação de ocupação mais intensa (representada, de forma crescente, da cor azul à cor vermelha).

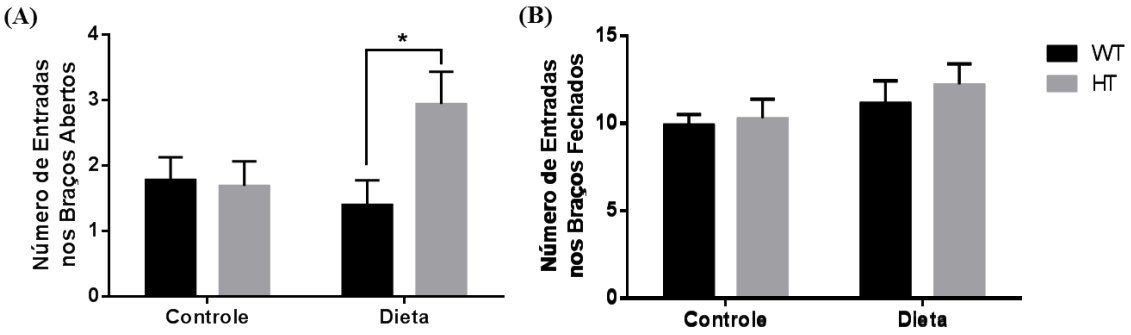
Figura 12 – Avaliação do tempo nas diferentes áreas do labirinto em cruz elevado após o período de dieta intermitente.



Tempo no (A) braço aberto, no (B) braço fechado e na (C) região central; (D) corresponde ao mapa representativo da ocupação média dos animais no labirinto, com os braços abertos e fechados tendo sido representados nos eixos vertical e horizontal, respectivamente. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença significativa, n = 16 (CH, DH), 18 (CW) ou 20 (DW).

Interessantemente, observou-se que os animais HT submetidos à dieta intermitente apresentaram um maior número de entradas no braço aberto (Figura 13, A), corroborando a hipótese da ocorrência de um fenótipo de comportamentos de medo e ansiedade reduzidos neste grupo.

Figura 13 – Avaliação do número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado após o período de dieta intermitente.

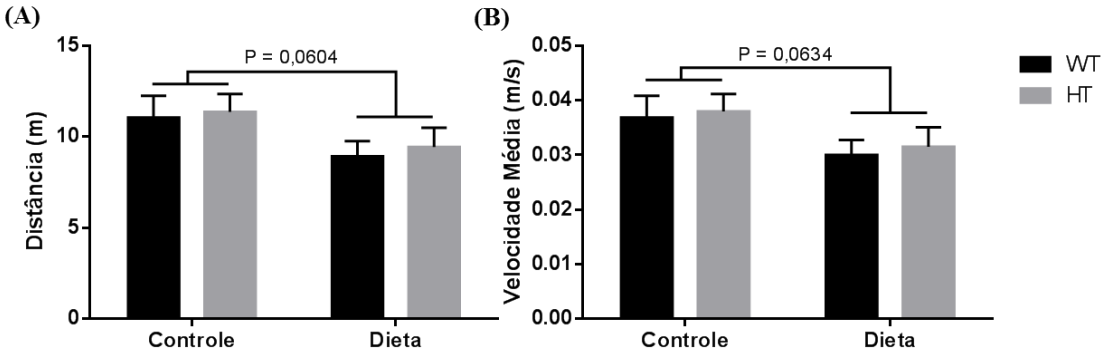


Número de entradas no (A) braço aberto e no (B) braço fechado. Análise pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. *P < 0,05, n = 16 (CH, DH), 18 (CW) ou 20 (DW).

4.1.3.2 Campo Aberto

Adicionalmente ao labirinto em cruz elevado, utilizou-se o teste do campo aberto para a avaliação complementar de parâmetros relacionados à ansiedade, além do mesmo possibilitar avaliação da mobilidade livre do animal. Foi observada uma tendência de diminuição da mobilidade espontânea – tanto na distância total percorrida (Figura 14, A) quanto na velocidade média (Figura 14, B), avaliadas nos primeiros 5 min do ensaio, quando a atividade do animal é mais intensa – induzida pela dieta intermitente, independentemente do genótipo.

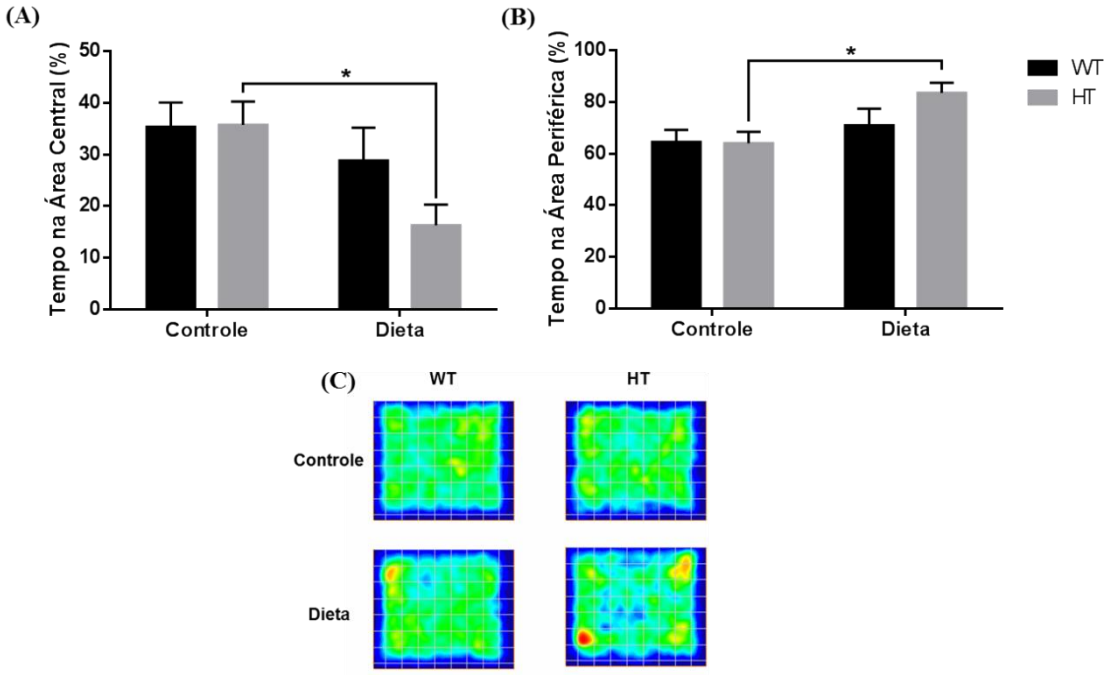
Figura 14 – Parâmetros de mobilidade livre no ensaio do campo aberto após o período de dieta intermitente.



(A) distância total percorrida e (B) velocidade média nos primeiros 5 min do ensaio. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. P = 0,0604 ou 0,0634 para o fator "tratamento", n = 8 (CH, DH), 11 (CW) ou 12 (DW).

Interessantemente, observou-se que os animais HT submetidos à dieta intermitente passaram significativamente mais tempo na região periférica (Figura 15, A), e menos tempo na área central (Figura 15, B), paradoxalmente ao efeito observado neste mesmo grupo no ensaio do labirinto em cruz elevado. Este comportamento foi bem representado no mapa de ocupação, apresentado na Figura 15 (painel C), no qual observa-se uma preferência dos animais HT sob dieta pela área periférica do aparato (representada por regiões marcadas com cores mais próximas ao vermelho).

Figura 15 – Tempo de permanência nas áreas do ensaio do campo aberto após o período de dieta intermitente.

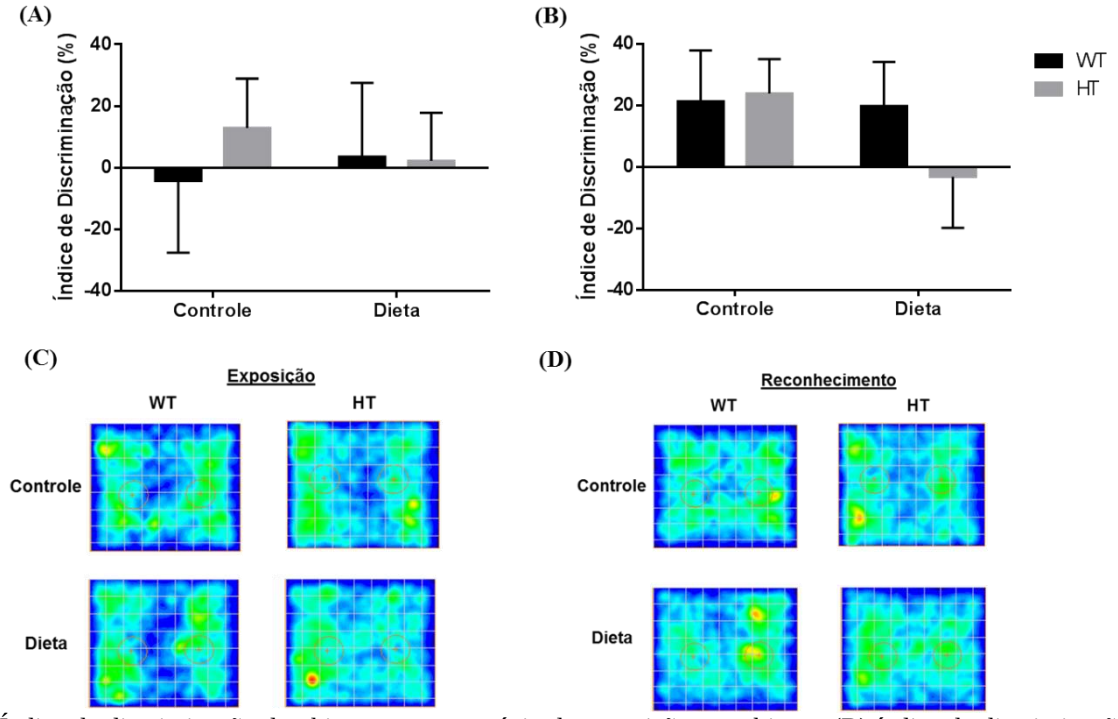


Tempo de permanência na (A) área central e na (B) área periférica; (C) corresponde ao mapa representativo da ocupação média dos animais no aparato. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05, n = 14 (DH), 15 (CW, CH) ou 16 (DW).

4.1.3.3 Reconhecimento do Objeto Novo

Como forma de iniciar a avaliação do estado de memória e aprendizado dos animais da linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$, foi realizado o ensaio do reconhecimento do objeto novo, que avalia um tipo de memória hipocampo- e córtex-dependente (82). Não houve preferência dos animais por nenhum objeto na etapa de exposição (Figura 16, A). Apesar da aparente preferência dos animais – excetuando-se o grupo HT submetido à dieta intermitente – pelo objeto novo na etapa de avaliação (Figura 16, B), não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa. Contudo, vale ressaltar a marcante variância entre os dados observados, que dificultam a confirmação da preferência real dos animais – incluindo o grupo controle WT – pelo objeto novo.

Figura 16 – Preferência pelo objeto alvo no ensaio do reconhecimento do objeto novo após o período de dieta intermitente.

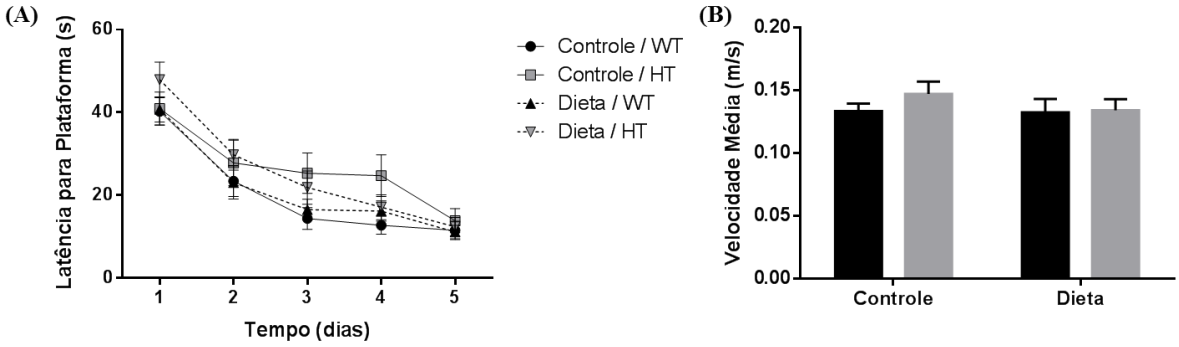


(A) Índice de discriminação do objeto novo no estágio de exposição aos objetos; (B) índice de discriminação na etapa de avaliação do reconhecimento; (C) e (D) representam os mapas de ocupação dos animais no aparato do ensaio nas etapas de exposição e de reconhecimento, respectivamente. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença significativa, n = 7 (CW) ou 8 (CH, DW, DH).

4.1.3.4 Labirinto Aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris é uma poderosa ferramenta de estudo do aprendizado e memória, em especial da memória espacial de referência e operacional, constituindo uma análise interessante de tipos de memória que também podem ser consideradas hipocampo- e córtex-dependentes (83). Inicialmente, através da avaliação do desempenho do animal em localizar a plataforma escondida sob a água, pode-se avaliar possíveis déficits no aprendizado. Neste experimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, indicando que não há uma modulação do genótipo e/ou tratamento sobre o aprendizado destes animais (Figura 17).

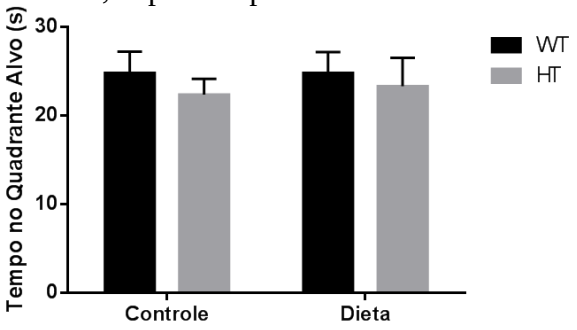
Figura 17 – Avaliação do aprendizado e da mobilidade no labirinto aquático de Morris após o período de dieta intermitente.



(A) Latência para escape pela plataforma na etapa de treinamento e (B) velocidade média na etapa de avaliação. Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas (A) ou de medida simples (B) seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 15 (CW), 12 (CH, DH) ou 16 (DW).

Transcorridas 4 h após o último treino, a plataforma foi retirada e avaliou-se a capacidade dos animais em recordar a posição da plataforma – avaliada pela insistência em nadar na região próxima à localização da plataforma durante os treinos. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 18), indicando a ausência de déficit de memória espacial de referência nos animais da linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$ estudados.

Figura 18 – Avaliação do tempo de permanência no quadrante alvo no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória de referência 4 h após o último treinamento, depois do período de dieta intermitente.

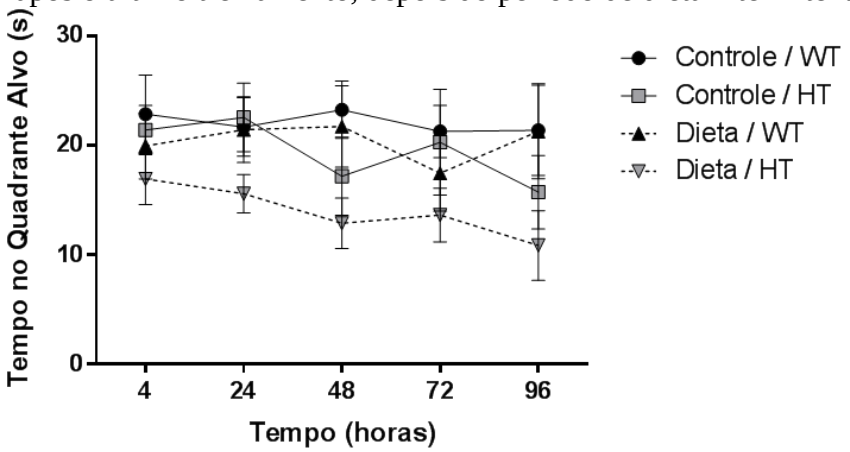


Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 15 (CW), 12 (CH, DH) ou 16 (DW).

Ao submeter os animais novamente a este teste, pode-se avaliar a capacidade de extinção da memória referencial. Com a falha na busca pela plataforma na região onde antes a estrutura encontrava-se, os animais tendem a alterar o perfil de procura, distribuindo novamente a busca nos outros quadrantes. Desta forma, observa-se a constituição de uma nova forma de aprendizado – o da não localização da plataforma – e a diminuição da preferência pelo quadrante alvo pode ser avaliado como uma forma de análise da capacidade

de extinção da memória. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 19), embora tenha sido observada uma marcante variância entre os resultados.

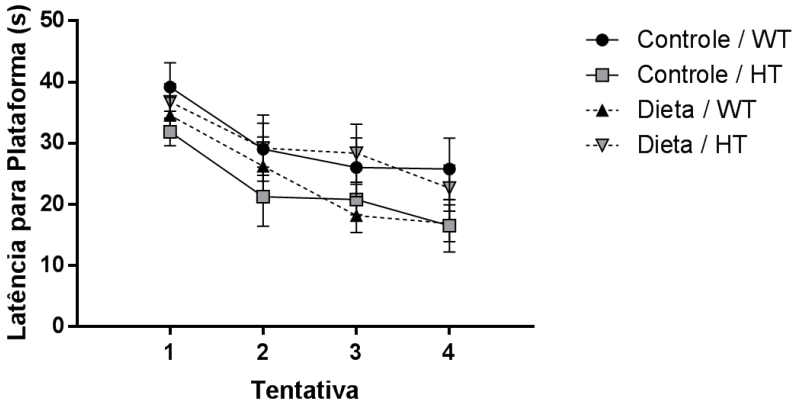
Figura 19 – Avaliação do tempo de permanência no quadrante alvo no ensaio do labirinto aquático de Morris nas etapas de avaliação da memória de referência 4 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o último treinamento, depois do período de dieta intermitente.



Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Não houve diferença estatística significativa, n = 8 (CH, DH) ou 9 (CW, DW).

A memória operacional, por sua vez, é um tipo de memória de curtíssima duração, que se constitui majoritariamente em um processo cortical e pode ser avaliada por um protocolo semelhante à etapa de treinamento. Porém, neste teste a localização da plataforma é modificada a cada dia. Sendo assim, em cada dia o animal deve buscar e aprender a nova localização da plataforma e a comparação da memorização da nova localização entre as quatro tentativas diárias são utilizadas para avaliar este tipo de memória. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 20).

Figura 20 – Latência para escape pela plataforma no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória operacional após o período de dieta intermitente.



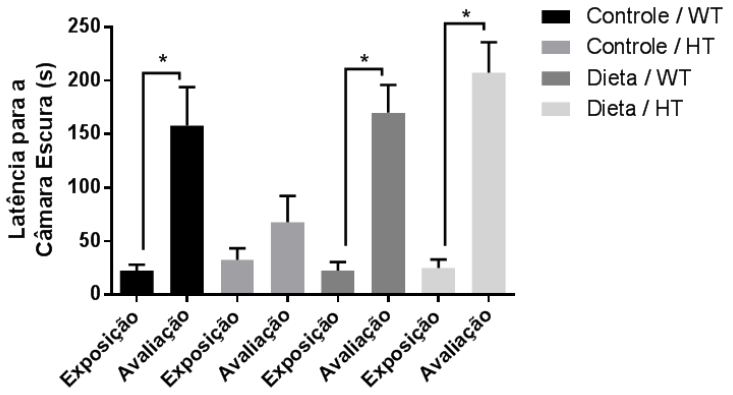
Os pontos representam as médias dos quatro dias de avaliação para cada tentativa em encontrar a posição da plataforma. Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Não houve diferença estatística significativa, n = 7 (DH), 8 (CH), 9 (CW) ou 11 (DW).

4.1.3.5 Esquiva Inibitória

O ensaio da esquiva inibitória foi utilizado para avaliação da memória de medo contextual, um tipo de memória majoritariamente associado ao processamento pelo hipocampo e pela amígdala, embora regiões corticais – como o córtex entorrinal – também tenham um papel importante (84).

Observou-se que os animais WT – independentemente do tratamento – apresentaram um aumento significativo da latência de passagem para a câmara escura, indicando a consolidação e efetiva evocação da memória do choque ministrado no dia anterior (Figura 21).

Figura 21 – Latência para entrada na câmara escura no ensaio da esquiva inibitória nas etapas de treinamento e avaliação após o período de dieta intermitente.



Análise pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. * P < 0,0001, n = 10 (CW, DH), 13 (CH) ou 15 (DW).

Porém, não foi observado um aumento da latência para os animais do grupo controle HT, apontando para um possível déficit de memória associada ao medo. Interessantemente, os animais

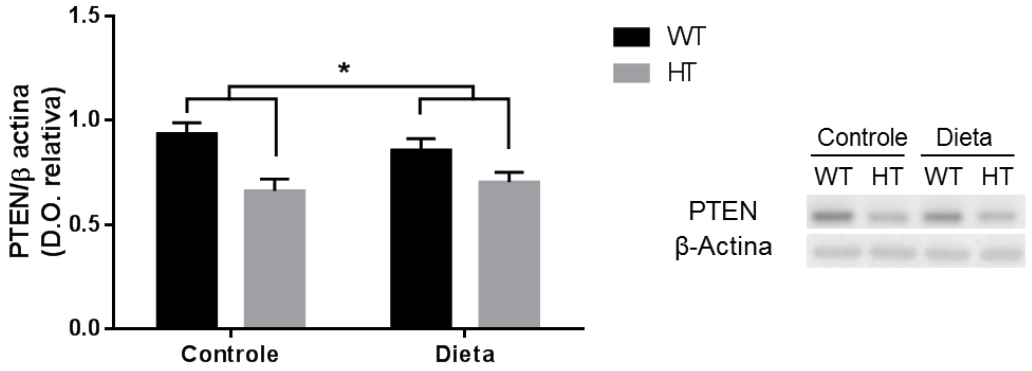
do grupo dieta HT apresentaram um aumento significativo da latência – semelhantemente aos animais WT –, um resultado que aponta para o potencial da dieta intermitente como intervenção modulatória no fenótipo cognitivo deste modelo de deleção neuronal da PTEN.

4.1.4 Ensaios Bioquímicos e Moleculares

4.1.4.1 Ensaio de *Western Blotting* – Hipocampo

A análise da expressão da PTEN foi realizada inicialmente a fim de se verificar a efetividade da deleção condicionada em reduzir a expressão total da proteína, bem como avaliar uma possível modulação pela dieta intermitente já neste ponto inicial da via de sinalização PI3K/AKT. Primeiramente, avaliou-se a região do hipocampo, que já havia sido apontada previamente como uma área de relevância neste modelo.(36) Foi observada uma redução da expressão da PTEN nos animais HT (Figura 22), embora não tenha sido encontrado nenhum efeito significativo do tratamento.

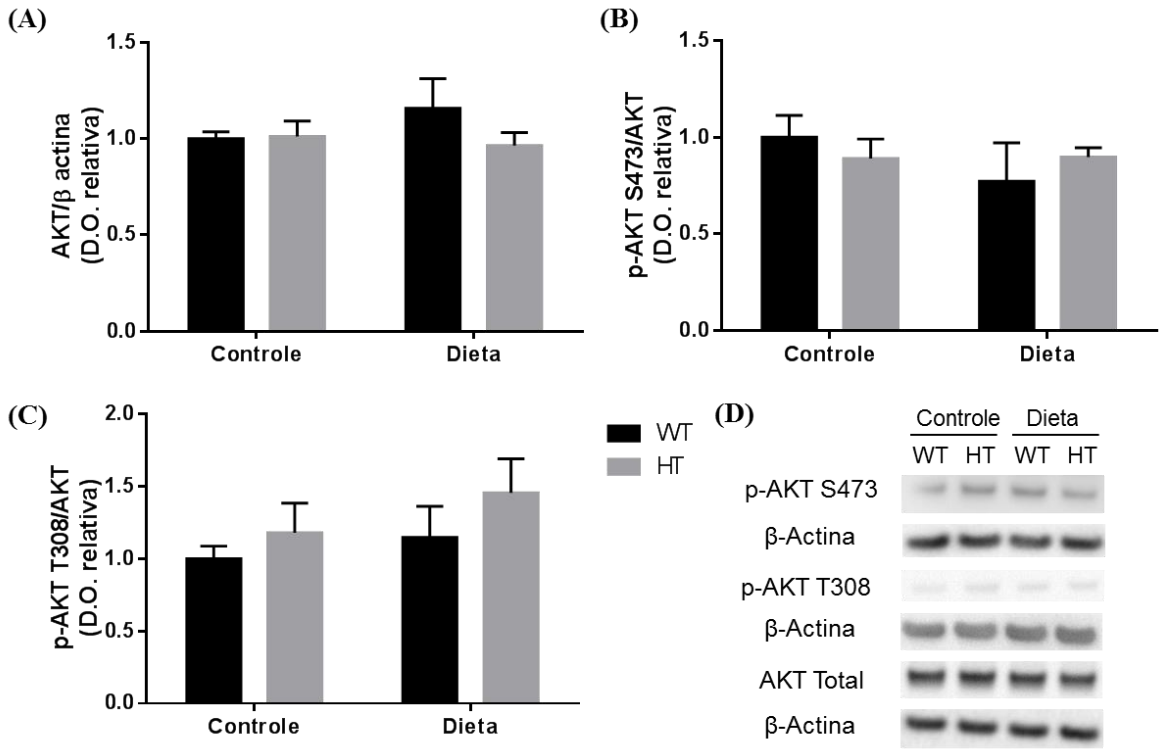
Figura 22 – Expressão da PTEN no hipocampo após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.



Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. * P < 0,001 para o fator "genótipo", n = 8 (CW, CH) ou 9 (DW, DH).

Posteriormente, avaliou-se a expressão e a ativação da AKT, uma quinase reguladora cuja atividade pode ser regulada direta e indiretamente pela PTEN. Nenhum efeito foi observado, tanto em relação à expressão total da AKT (Figura 23, A), quanto à sua ativação, avaliada por meio da fosforilação nos sítios S473 (Figura 23, B) e T308 (Figura 23, C).

Figura 23 – Expressão e ativação da AKT no hipocampo após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.

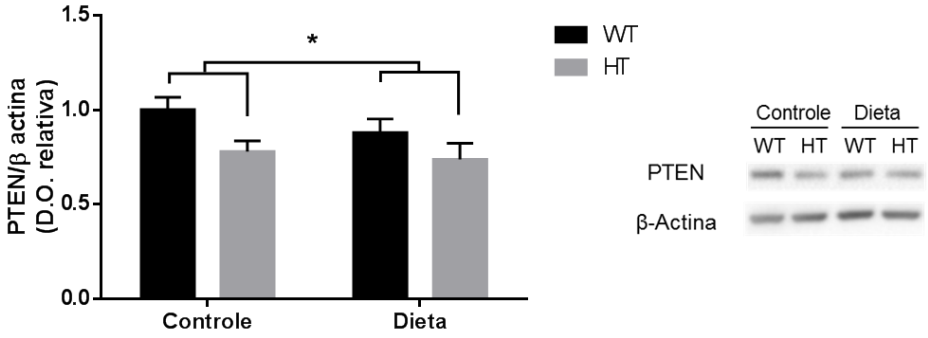


(A) AKT total, (B) p-AKT^{S473} por AKT total e (C) p-AKT^{T308} por AKT total; (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatisticamente significativa, n = 6 para todos os grupos.

4.1.4.2 Ensaio de *Western Blotting* – Córtex

Dada a não observância de alterações na ativação da via da AKT na região do hipocampo – associada também à não observância do aumento da massa hipocampal (Figura 11, B) – nos animais estudados, optou-se pela avaliação da região do córtex. Esta área é de grande relevância para os aspectos cognitivos avaliados e o aumento de massa cortical (Figura 11, C) indica uma maior influência da deleção condicionada da PTEN na região. Também foi observada uma redução da expressão da PTEN no córtex dos animais HT (Figura 24), embora mais uma vez não tenha sido encontrado nenhum efeito significativo do tratamento.

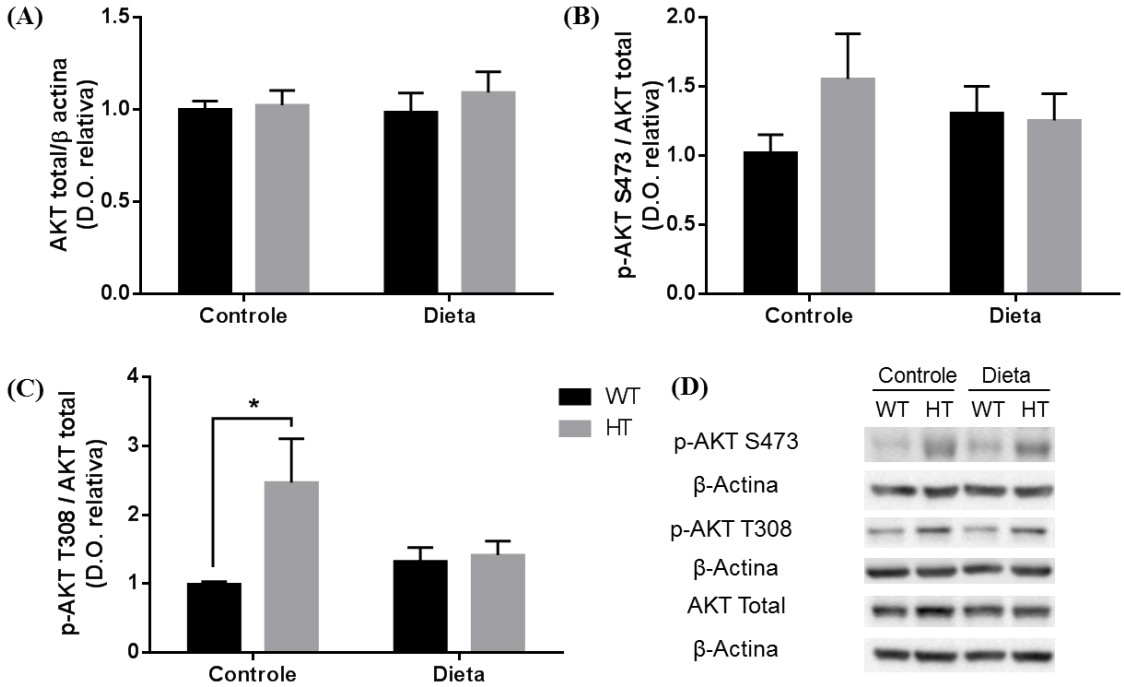
Figura 24 – Expressão da PTEN no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.



Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 9 para todos os grupos.

Quanto à expressão cortical da AKT, não foi observada nenhuma diferença significativa (Figura 25, A). Também não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na ativação da AKT no sítio de fosforilação S473 – fosforilado pela mTOR (Figura 25, B). Contudo, foi observado um aumento da fosforilação no resíduo T308 – regulado diretamente pela PTEN – nos animais controle HT (Figura 25, C).

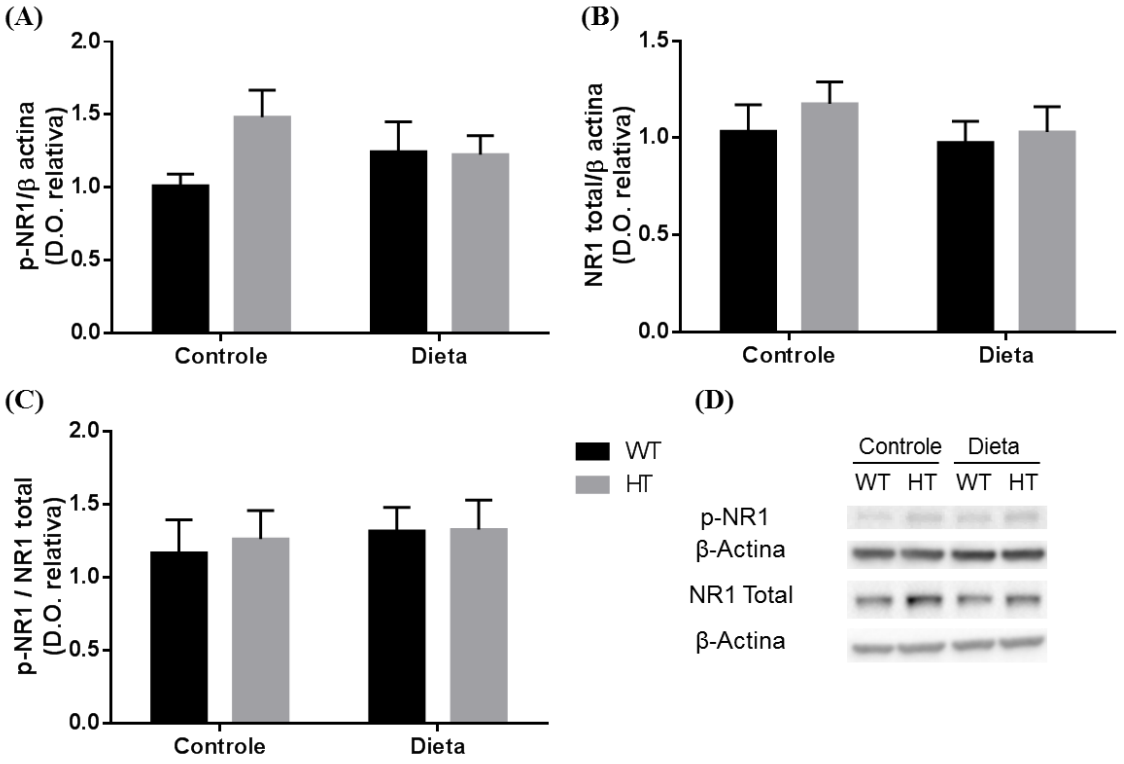
Figura 25 – Expressão e ativação da AKT no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.



(A) AKT total, (B) p-AKT^{S473} por AKT total e (C) p-AKT^{T308} por AKT total; (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. * P < 0,05, n = 9 para todos os grupos.

De forma a possibilitar uma análise inicial de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica, foram avaliadas a expressão e ativação de receptores sinápticos glutamatérgicos, no caso, a subunidade 1 do receptor NMDA (NR1) e o receptor AMPA. Nenhuma diferença foi encontrada para a expressão total de NR1, bem como para a ativação do receptor avaliada por meio de seu estado fosforilado (p-NR1) (Figura 26).

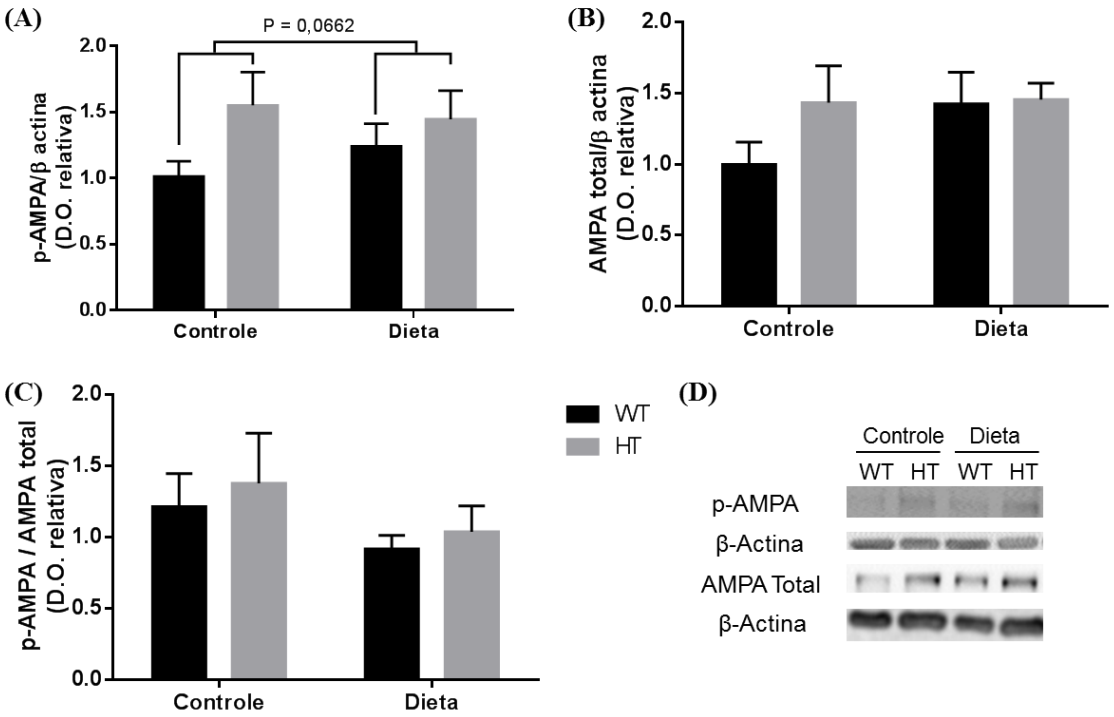
Figura 26 – Expressão e ativação do NR1 no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.



(A) p-NR1, (B) NR1 total, (C) p-NR1 por NR1 total, e (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença significativa, n = 8 (CH, DH) ou 9 (CW, DW).

Estritamente relacionado à atividade do receptor NMDA, o receptor AMPA também é de grande importância para processos relacionados à plasticidade, constituindo-se como um interessante marcador sináptico glutamatérgico. Semelhantemente ao observado com o NR1, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa para a expressão total e para a ativação do receptor entre os grupos (Figura 27), embora haja uma tendência de aumento da expressão de AMPA total nos animais HT.

Figura 27 – Expressão e ativação do receptor AMPA no córtex após o período de dieta intermitente por *Western Blotting*.



(A) p-AMPA, (B) AMPA total, (C) p-AMPA por AMPA total, (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 9 para todos os grupos.

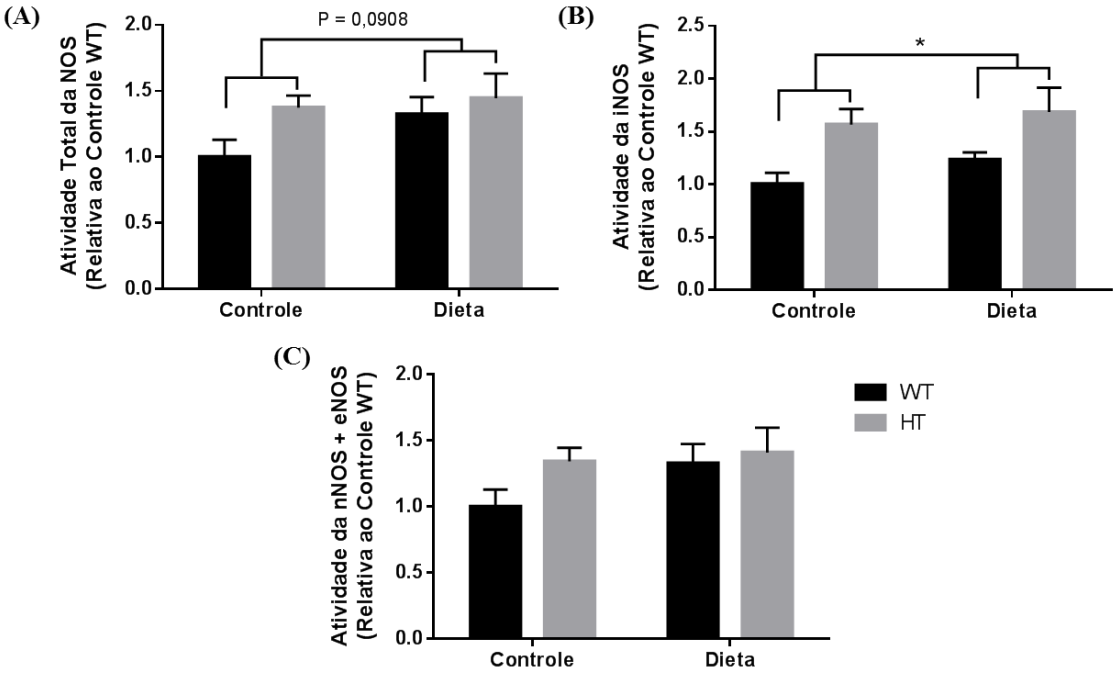
4.1.4.3 Atividade da NOS

Na busca por um método alternativo para avaliar atividade do sistema glutamatérgico, considerando-se a plausibilidade de aplicação em tempo hábil e dentro das limitações de quantidade de amostras disponível, foi realizada a dosagem da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS catalisa a síntese do óxido nítrico (NO), sendo ativada por diversos mediadores e responsável por integrar diversas vias de sinalização, participando tanto de processos importantes – como memória e plasticidade sináptica – mas também mediando processos fisiopatológicos – como nas doenças neurodegenerativas (79). Dada sua importância para os mais diversos tecidos, a NOS encontra-se intimamente ligada a diversos processos, sendo um deles a própria atividade sináptica. A isoforma neuronal da enzima (nNOS) está associada a complexos pós-sinápticos, sendo ativada na ativação de receptores glutamatérgicos (85).

Não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade das isoformas sensíveis a cálcio – que incluem a nNOS e a NOS endotelial, eNOS (Figura 28, C). Supreendentemente, a atividade da iNOS encontrou-se aumentada nos animais HT, independentemente do tratamento (Figura 28, B), o que pode ter contribuído para o perfil

observado na atividade total da NOS (Figura 28, A), embora sem diferença significativa. Este aumento da atividade da iNOS nos animais HT pode ser interpretado como um indicativo do possível desenvolvimento inicial de um estado inflamatório ou lesivo, fruto da deleção da PTEN, que poderia estar envolvido nos efeitos cognitivos observados nesta linhagem.

Figura 28 – Avaliação da atividade da NOS após período de dieta intermitente.

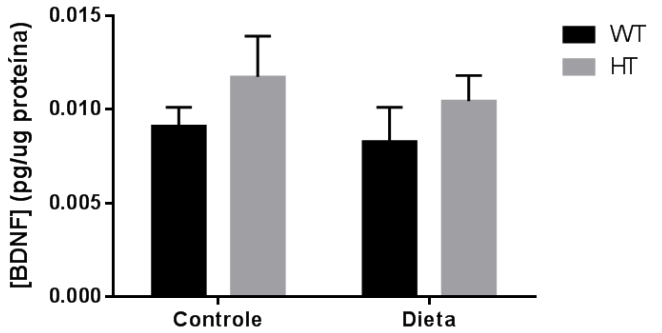


(A) atividade total da NOS e das isoformas (B) iNOS (insensível a cálcio) e (C) nNOS e eNOS (sensíveis a cálcio). Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05 para o fator "genótipo", n = 8 (CH, DW) ou 9 (CW, DH).

4.1.4.4 Dosagem de BDNF

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é uma neurotrofina com importantes efeitos no desenvolvimento, homeostase e plasticidade do sistema nervoso, que pode ser modulada por diversos fatores ou mesmo por mecanismos fisiopatológicos de variadas doenças neurológicas e metabólicas (23). Uma das vias capazes de modular a ativação do BDNF é justamente a via da PI3K/AKT, tornando a avaliação da expressão desta neurotrofina um interessante ponto de estudo. Contudo, não foi observada diferença entre os grupos na avaliação inicial realizada (Figura 29).

Figura 29 – Dosagem dos níveis de BDNF no córtex por kit de ELISA após o período de dieta intermitente.



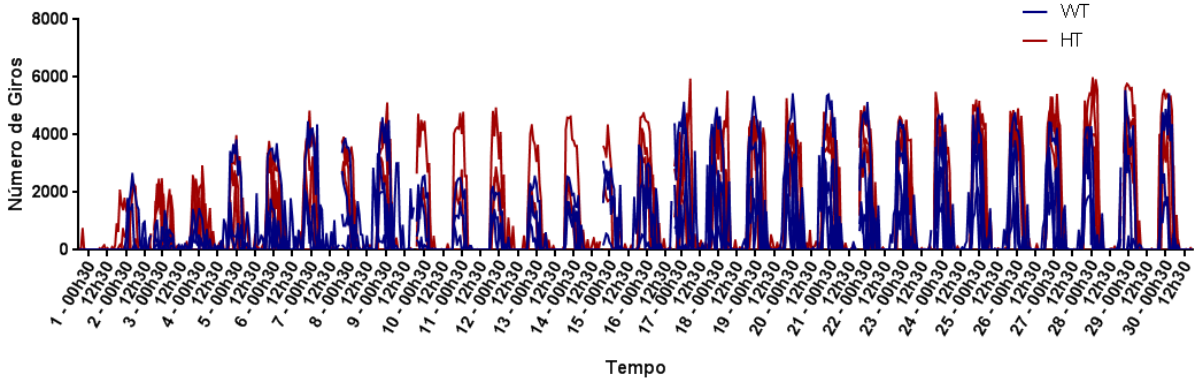
Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatisticamente significativa, n = 5 (DW), 6 (CW, DH) ou 8 (CH).

4.2 Exercício Físico

4.2.1 Distância Percorrida

Quando acondicionados nas gaiolas com a roda giratória, os animais pré-selecionados tendem a iniciar brevemente um perfil de atividade marcante. Observa-se que há uma tendência de aumento na atividade nos primeiros dias, que se estabiliza posteriormente (Figura 30). Pode-se observar um pico na distância percorrida no meio da noite, momento no qual os animais se encontram no período de maior atividade.

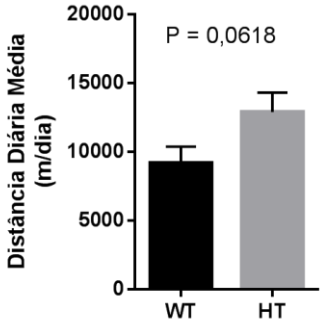
Figura 30 – Esquematização dos perfis de atividade na roda de corrida.



Número de giros da roda giratória pelo tempo transcorrido. Não foi realizada análise estatística, n = 4 (EW) ou 5 (EH).

A avaliação da distância diária média percorrida pode ser utilizada como um marcador de atividade espontânea nos animais, além de servir como controle da adesão e motivação dos animais ao protocolo de exercício físico. Não foi possível esclarecer se há uma real diferença estatística na comparação entre os dois grupos de animais exercitados, contudo há uma tendência de que os animais HT corram mais (Figura 31).

Figura 31 – Distância diária média percorrida entre a 3ª e a 4ª semana de exercício físico voluntário.

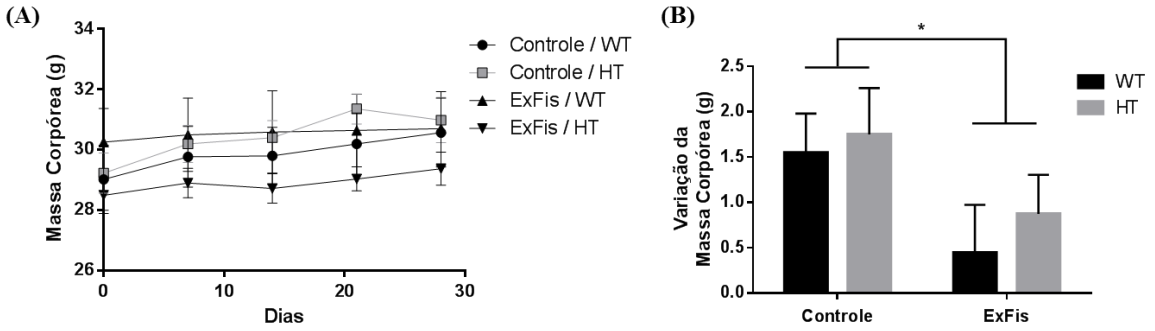


Análise por teste t de Student. Não houve diferença estatisticamente significativa, n = 7 (EH) ou 9 (EW).

4.2.2 Massa Corpórea e Consumo de Ração

Durante o período de exercício físico voluntário, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na curva de massa corpórea dos animais (Figura 32, A), embora tenha-se observado uma redução do ganho de massa corpórea com o tempo, nos animais submetidos ao exercício físico (Figura 32, B).

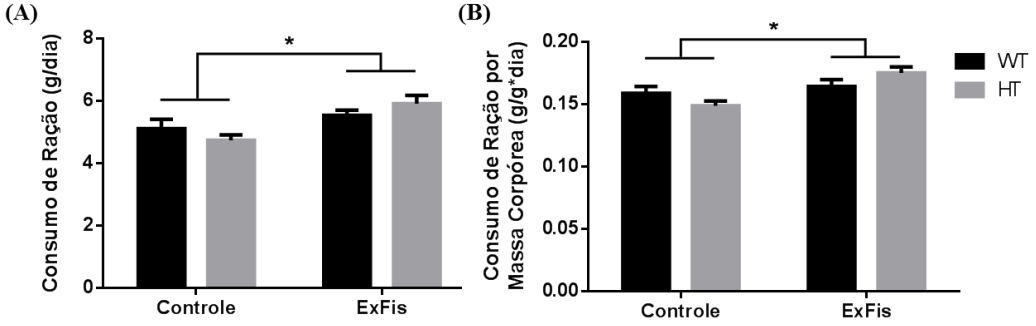
Figura 32 – Avaliação da variação de massa corpórea durante e após o período de exercício físico voluntário.



(A) curva de massa corpórea pelo tempo e (B) variação de massa corpórea após o período de exercício físico voluntário. Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas em (A) e não pareado em (B). * P < 0,05 para o fator tratamento, n = 8 (EW), 9 (CH, EH) ou 10 (CW).

Interessantemente, observou-se um aumento significativo do consumo de ração – absoluto (Figura 33, A) ou ponderado pela massa corpórea (Figura 33, B) – nos animais exercitados, independentemente do genótipo.

Figura 33 – Avaliação do consumo de ração durante o período de exercício físico voluntário.

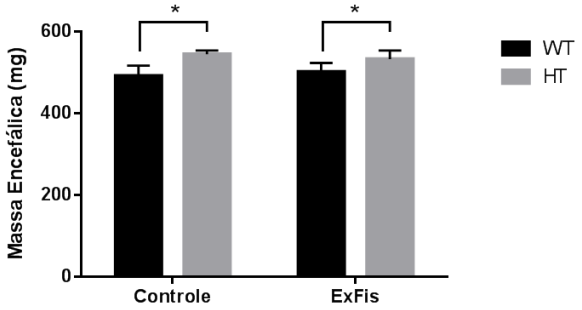


(A) consumo de ração diário médio e (B) consumo de ração ponderado pela massa corpórea. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05 para o fator "tratamento", n = 7 (CH), 8 (EW), 9 (EH) ou 10 (CW).

4.2.3 Massa Encefálica

Corroborando os resultados encontrados nos experimentos da dieta intermitente, foi observado um aumento significativo da massa encefálica dos animais HT, independentemente do tratamento (Figura 34).

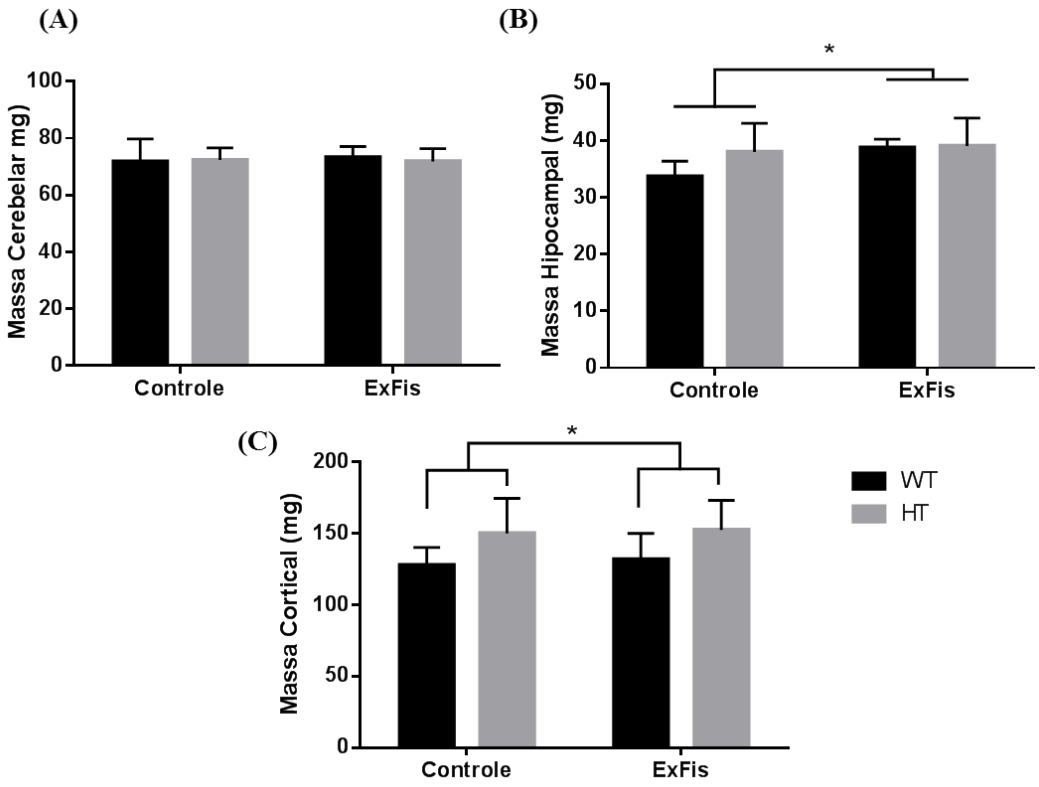
Figura 34 – Avaliação da massa encefálica após o período de exercício físico voluntário.



Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05, n = 8 (EW), 9 (CH, EH) ou 10 (CW).

Semelhantemente ao encontrado nos experimentos da dieta intermitente, observou-se um aumento significativo da massa cortical nos animais HT (Figura 35, C). Por outro lado, neste caso também foi observado um efeito significativo mediado pelo exercício físico voluntário no hipocampo (Figura 35, B). Nenhum efeito foi observado na massa cerebelar (Figura 35, A).

Figura 35 – Avaliação da massa de estruturas do encéfalo após o período de exercício físico voluntário.



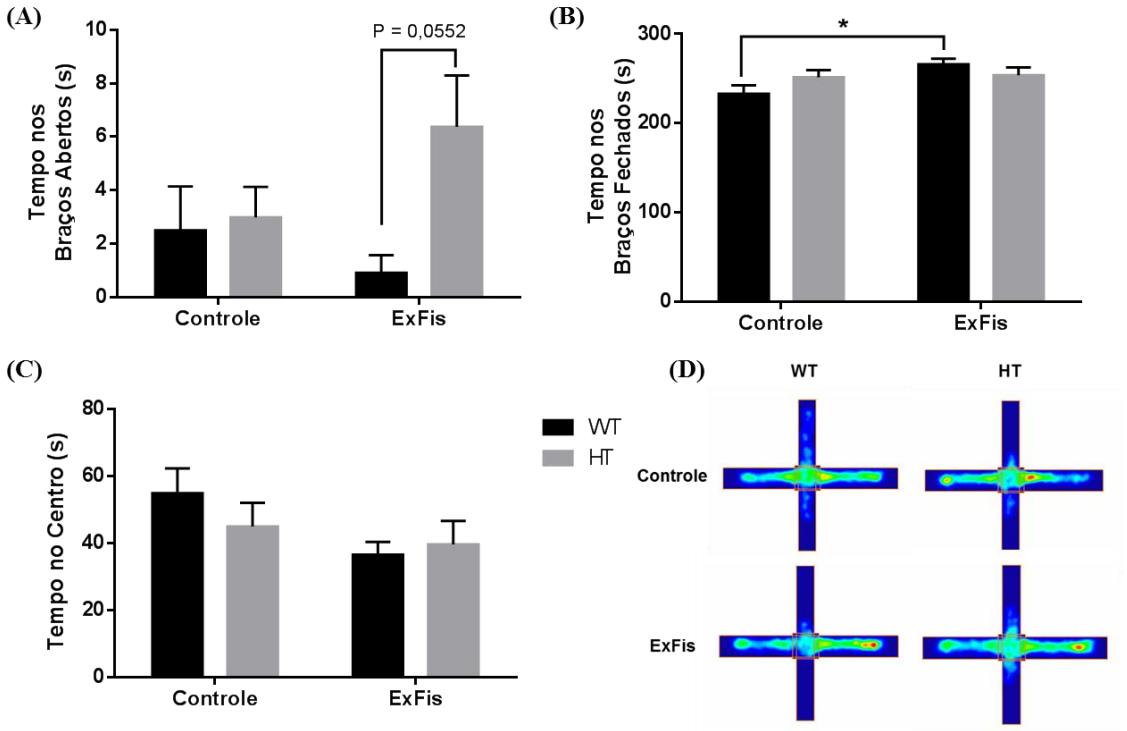
A massa do (A) cerebelo, (B) hipocampo e (C) córtex foram avaliadas. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák, * P < 0,05 para o fator "tratamento" (em B) ou para o fator "genótipo" (em C), n = 8 (EW), 9 (CH, EH) ou 10 (CW).

4.2.4 Ensaios Comportamentais

4.2.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

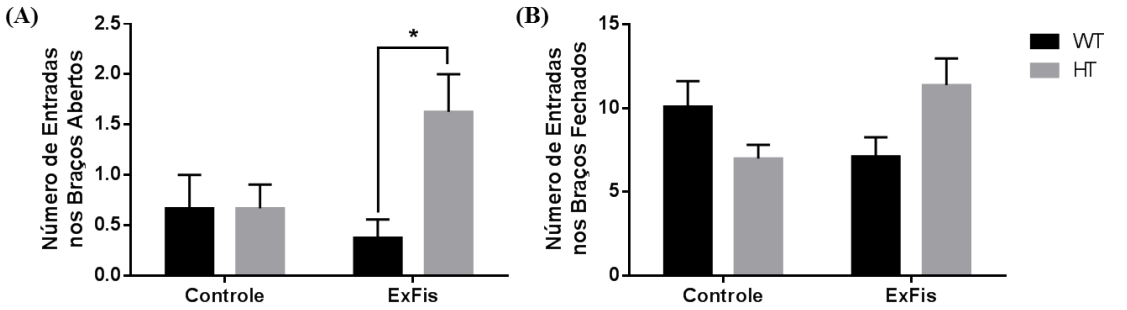
Nos experimentos do exercício físico, também foi observada uma tendência de aumento no tempo de permanência nos braços abertos (Figura 36, A), além de um aumento significativo no número de entradas nesta área (Figura 37, A), ambos nos animais HT pertencentes ao grupo em exercício físico. Paralelamente, observou-se um efeito ansiogênico – seletivo aos animais WT – do exercício físico, fazendo com que os animais permanecessem mais tempo na região dos braços fechados (Figura 36, B).

Figura 36 – Avaliação do tempo nas diferentes áreas do labirinto em cruz elevado após o período de exercício físico voluntário.



Tempo no (A) braço aberto, no (B) braço fechado e na (C) região central; (D) corresponde ao mapa representativo de ocupação média dos animais no labirinto. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05, n = 8 (EW, EH), 9 (CH) ou 10 (CW).

Figura 37 – Avaliação do número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado após o período de exercício físico voluntário.



Número de entradas no (A) braço aberto e no (B) braço fechado. Análise pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. *P < 0,05, n = 8 (EW, EH), 9 (CH) ou 10 (CW).

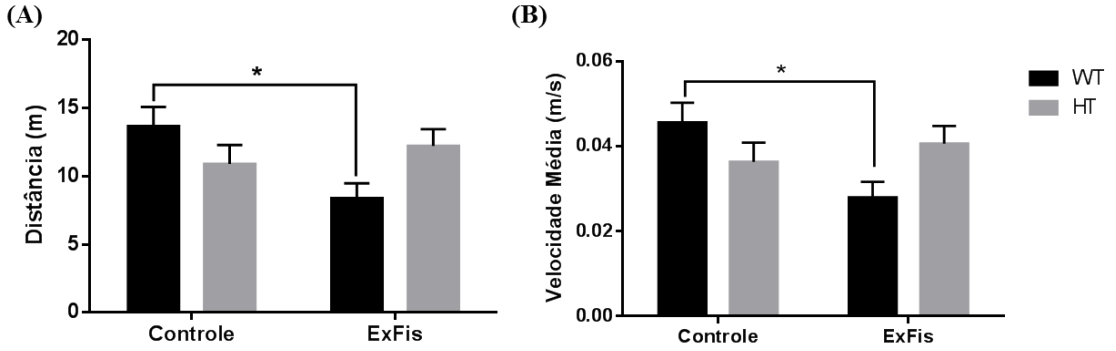
4.2.4.2 Campo Aberto

Indo ao encontro dos resultados observados no ensaio do labirinto em cruz elevado, os animais exercitados também apresentaram uma mobilidade diminuída no campo aberto, indicado por uma diminuição significativa da distância percorrida (Figura 38, A) e da velocidade média (Figura 38, B). Este mesmo resultado foi observado para o tempo de permanência nas diferentes áreas do aparato (Figura 39). Estes dados corroboram a possibilidade, observada no labirinto em cruz elevado, de que o exercício voluntário crônico

possa exercer um efeito ansiogênico em camundongos da linhagem estudada. Por outro lado, não foi observado nenhum efeito significativo mediado pelo genótipo HT ou pela interação entre o genótipo e o tratamento.

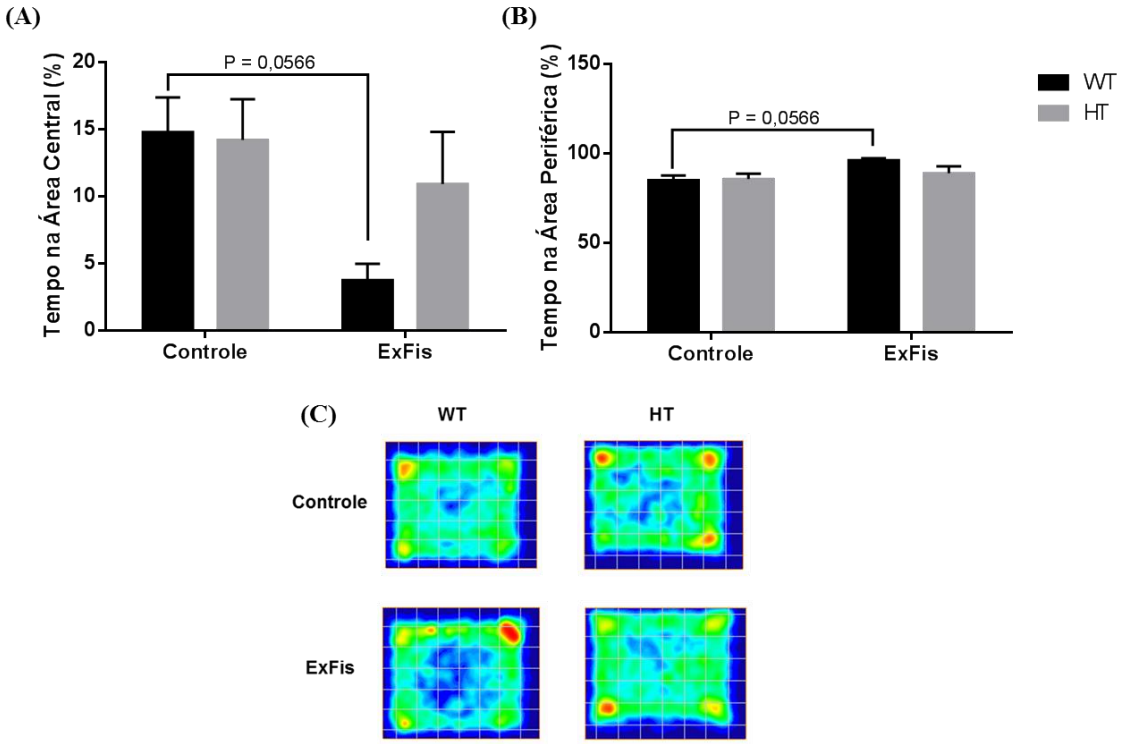
Corroborando os dados encontrados no ensaio do labirinto em cruz elevado, os animais WT exercitados também apresentaram um perfil associado a um comportamento de medo e ansiedade, incluindo uma redução da mobilidade, indicada pela menor distância percorrida (Figura 38, A) e velocidade média (Figura 38, B) na primeira metade do ensaio, e por uma tendência de diminuição do tempo na área central (Figura 39, A), com consequente aumento do tempo na área periférica (Figura 39, B) do aparato.

Figura 38 – Distância percorrida no ensaio do campo aberto após o período de exercício físico voluntário.



(A) distância percorrida e (B) velocidade média nos primeiros 5 min do ensaio. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05, n = 8 (CH, EH), 9 (EW) oou10 (CW).

Figura 39 – Avaliação do tempo nas diferentes áreas do campo aberto após o período de exercício físico voluntário.

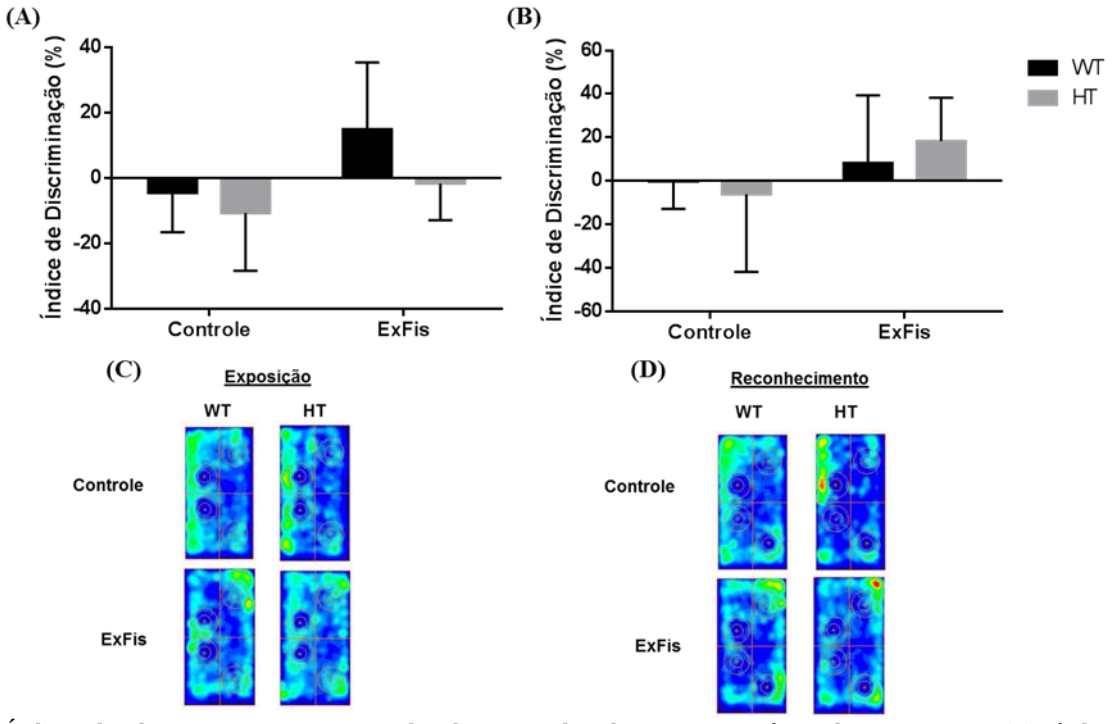


Tempo na (A) área central e na (B) área periférica; (C) corresponde ao mapa representativo de ocupação média dos animais no aparato. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença significativa, n = 8 (CH, EH), 9 (EW) ou 10 (CW).

4.2.4.3 Reconhecimento da Localização do Objeto

Devido ao problema observado no ensaio do reconhecimento do objeto novo nos experimentos da dieta intermitente – no qual nem mesmo os animais controle WT aparentavam discriminar o novo objeto – optou-se pela realização de um teste de reconhecimento alternativo. O ensaio do reconhecimento da localização do objeto envolve não apenas um tipo de memória de reconhecimento, mas também de memória espacial. Inicialmente, observou-se que os animais não apresentavam preferência por nenhum dos objetos, na etapa de exposição (Figura 40, A), garantindo que as características intrínsecas – formato, textura e cor – dos objetos não atrapalhariam na interpretação dos resultados. Semelhantemente ao encontrado no ensaio do reconhecimento do objeto novo na dieta intermitente, houve uma possível refratariedade do teste, inclusive pelos animais controle WT, que não aparentaram discriminar o objeto movido para a nova localização, na etapa de reconhecimento (Figura 40, B).

Figura 40 – Preferência pelo objeto alvo no ensaio do reconhecimento da localização do objeto após o período de exercício físico voluntário.

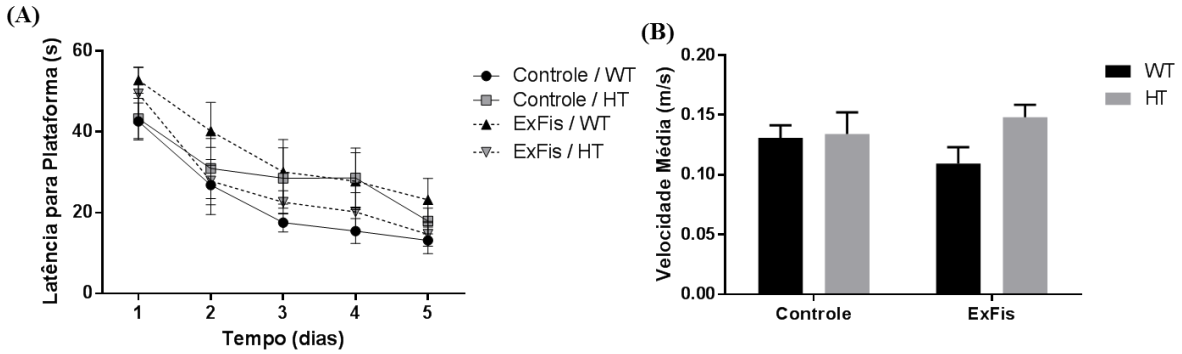


(A) Índice de discriminação entre as localizações de objetos no estágio de exposição; (B) índice de discriminação na etapa de avaliação do reconhecimento da localização; (C) e (D) representam os mapas de ocupação dos animais no aparado do ensaio nas etapas de exposição e de reconhecimento, respectivamente. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença significativa, n = 6 (CH, EH), 8 (EW) ou 10 (CW).

4.2.4.4 Labirinto Aquático de Morris

Semelhantemente ao observado no estudo da dieta intermitente, não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos em relação ao aprendizado (Figura 41, A) ou a mobilidade (Figura 41, B) no labirinto aquático de Morris.

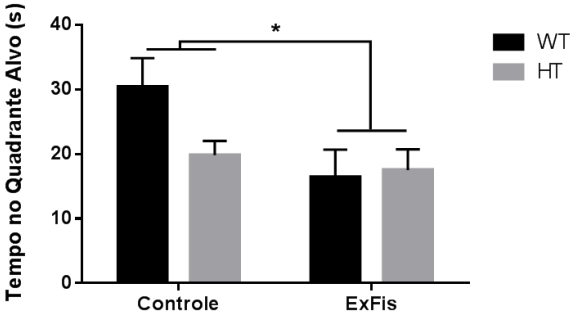
Figura 41 – Avaliação do aprendizado e da mobilidade no labirinto aquático de Morris após o período de exercício físico voluntário.



(A) latência para escape pela plataforma na etapa de treinamento e (B) velocidade média na etapa de avaliação. Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas (A) ou de medida simples (B) seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 5 (EH) ou 7 (CW, CH, EW).

Por outro lado, observou-se um efeito deletério do exercício físico na avaliação da memória espacial 4 h após o último treino (Figura 42). Observou-se uma redução do tempo de permanência no quadrante alvo nos animais exercitados. Embora não haja significância estatística, é possível que, com o aumento do espaço amostral, revele-se um efeito deletério – independente do tratamento – nos animais HT.

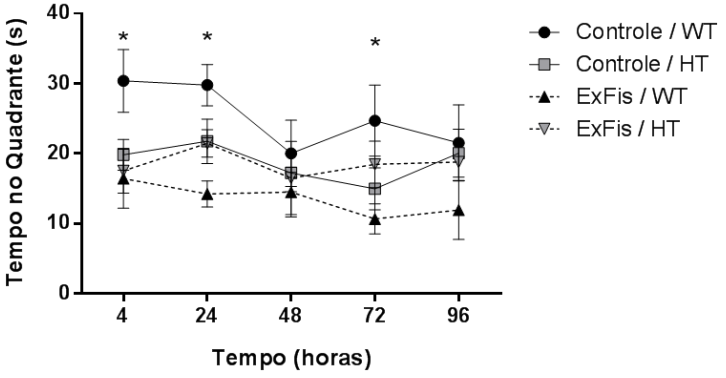
Figura 42 – Avaliação do tempo de permanência nos quadrantes no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória de referência 4 h após o último treinamento, depois do período de exercício físico voluntário.



Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatisticamente significativa, n = 5 (EH) ou 7 (CW, CH, EW).

Em relação ao ensaio de avaliação de extinção desta memória espacial, observou-se a manutenção desta diferença entre os grupos controle e exercitados dos animais WT (Figura 43) em três pontos avaliados (avaliação 4 h, 24 h e 72 h após o último treino), embora a marcante variância dificulte a interpretação dos resultados. De qualquer forma, este resultado reforça a possibilidade de que o exercício físico esteja afetando negativamente o desempenho dos animais neste ensaio, em especial nos animais WT.

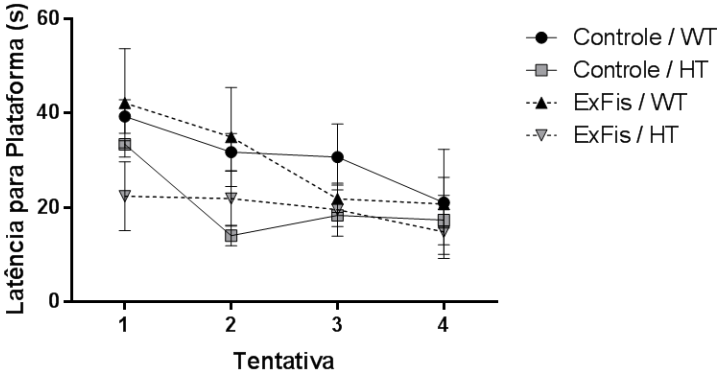
Figura 43 – Avaliação do tempo de permanência nos quadrantes no ensaio do labirinto aquático de Morris nas etapas de avaliação da memória de referência 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o último treinamento, depois do período de exercício físico voluntário.



Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas. * P < 0,05 para a comparação entre CW e EW, n = 5 (EH) ou 7 (CW, CH, EW).

A avaliação do ensaio de memória operacional, por sua vez, ficou dificultada devido ao limitado amostral disponível. Com o andamento dos experimentos, muitos animais passaram a apresentar um comportamento passivo no ensaio, boiando durante todas – ou a maioria das – tentativas. Este era um efeito esperado nos ensaios do labirinto aquático de Morris, porém, levando-se em consideração o número de animais avaliados – que já era limitado –, os resultados deste ensaio não puderam ser conclusivos (Figura 44).

Figura 44 – Latência para escape pela plataforma no ensaio do labirinto aquático de Morris na etapa de avaliação da memória operacional após o período de exercício físico voluntário.

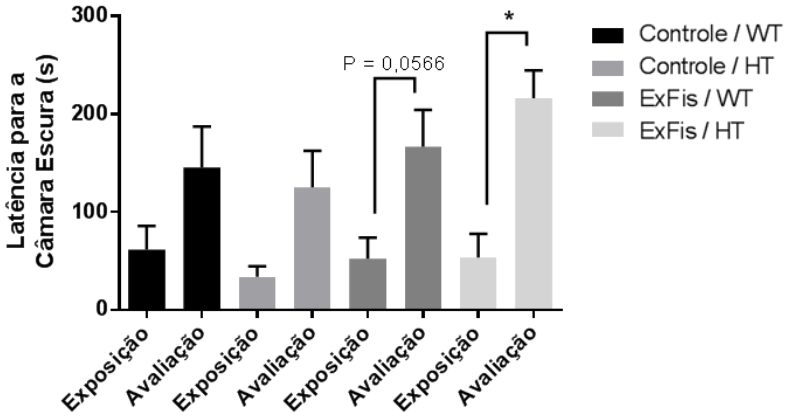


Os pontos representam as médias dos quatro dias de avaliação para cada tentativa em encontrar a posição da plataforma. Análise por ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Não houve diferença estatística significativa, n = 3 (EW), 4 (CH), 5 (EH) ou 6 (CW).

4.2.4.5 Esquiva Inibitória

Ao contrário do observado nos experimentos da dieta intermitente, os grupos controle – tanto os animais WT quanto os HT – não apresentaram um aumento significativo de latência na avaliação 24 h após a exposição ao choque (Figura 45). Interessantemente, os valores de latência basal – avaliada no período de exposição – dos experimentos da dieta intermitente foram menores do que os observados nos experimentos do exercício físico (média de 26 s e de 51 s, respectivamente), mostrando uma possível diferença na resposta basal, ou seja, antes mesmo da exposição ao choque, entre os dois tipos de experimentos – independentemente do genótipo ou da vigência da intervenção não-farmacológica.

Figura 45 – Latência para entrada na câmara escura no ensaio da esquiva inibitória nas etapas de exposição e avaliação após o período de exercício físico voluntário.



Análise pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. *P < 0,05, n = 8 (CH, EW, EH) ou 10 (CW).

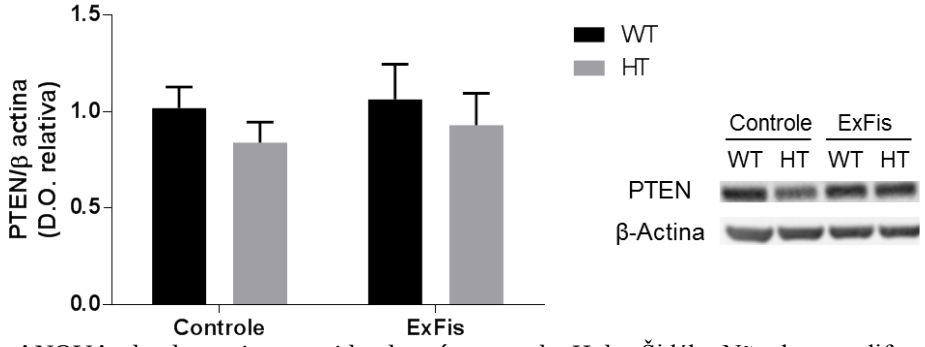
Por outro lado, observou-se que os animais sob exercício físico apresentaram um aumento maior na latência de passagem para a câmara escura na etapa de avaliação. Embora nos animais WT em exercício físico o resultado tenha sido uma tendência estatística, o efeito foi significativo nos animais HT.

4.2.5 Ensaios Bioquímicos e Moleculares

4.2.5.1 Ensaio de *Western Blotting*

Em relação à expressão e ativação das proteínas da via da PI3K/PTEN/AKT, os resultados observados não foram conclusivos, possivelmente devido a uma quantidade menor de amostras, fator que limitou o espaço amostral analisado. Não foi possível observar o efeito da deleção condicionada na diminuição da expressão da PTEN, não tendo sido observada nenhuma diferença estatística (Figura 46).

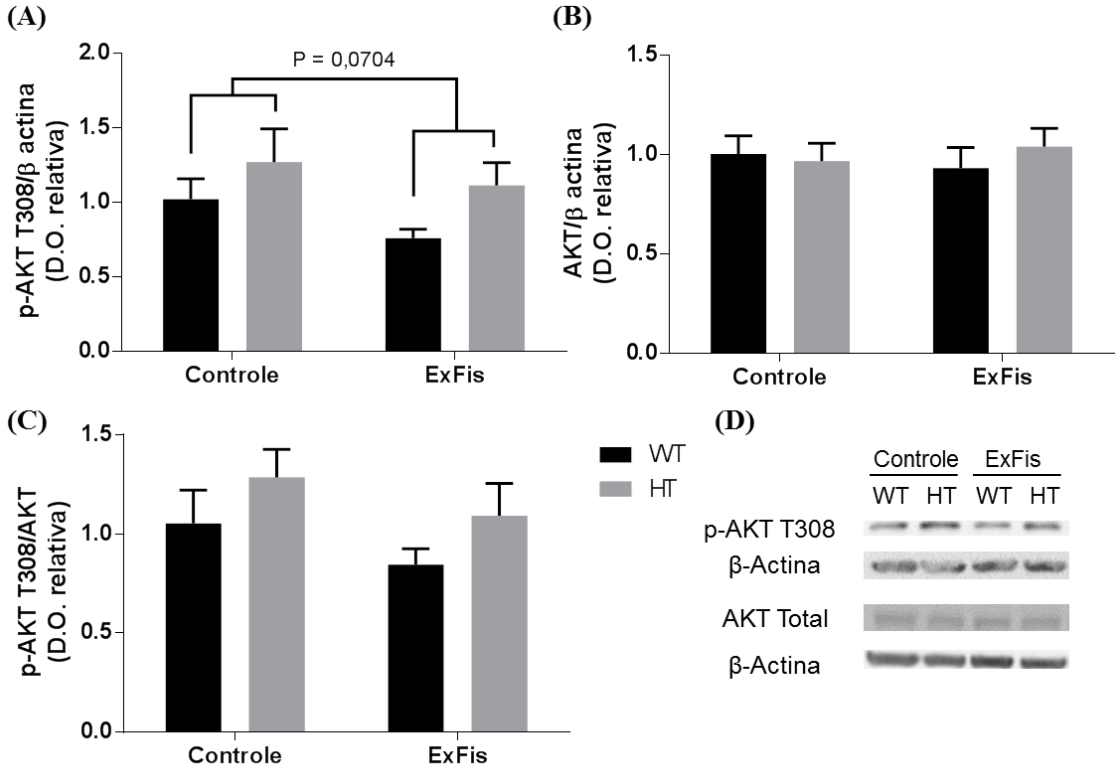
Figura 46 – Expressão da PTEN após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*.



Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 5 para todos os grupos.

Semelhantemente, não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão total da AKT (Figura 47, B), nem na relação entre os níveis de sua forma fosforilada p-AKT^{T308} e a AKT total (Figura 47, C). Contudo, a ativação da AKT nos animais HT pode ter sido mascarada pela variabilidade encontrada no teste – que conta com um espaço amostral limitado –, uma vez que, ao se analisar o nível de expressão da p-AKT^{T308} sem ponderá-lo pela AKT total, há uma tendência de aumento nos animais HT. Não foi possível finalizar a avaliação dos níveis de fosforilação no resíduo S473 por problemas com a marcação e revelação do anticorpo.

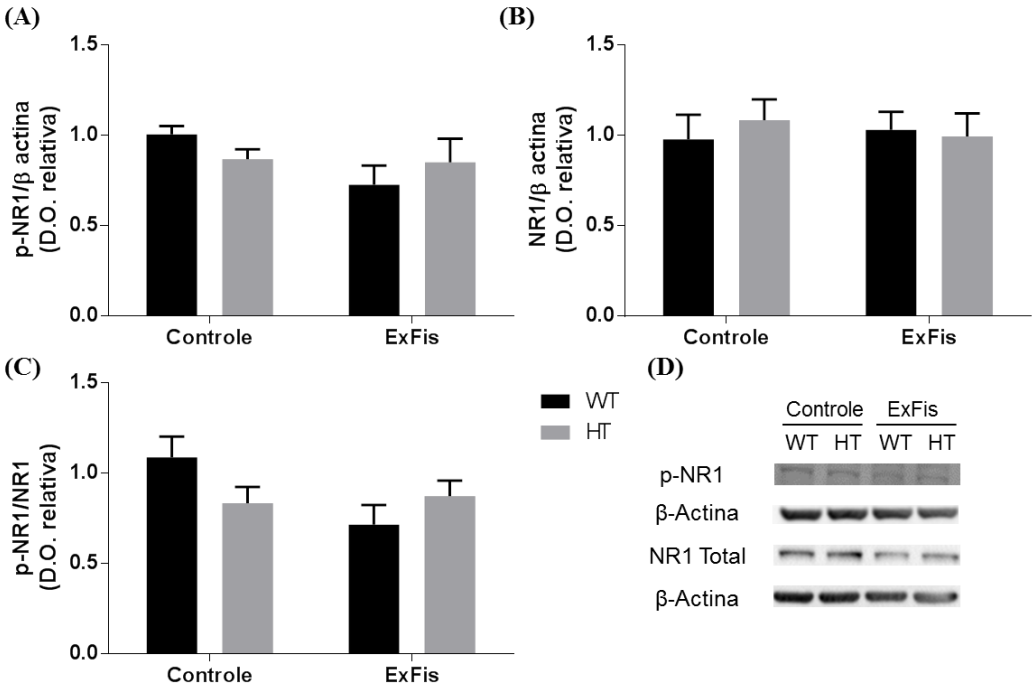
Figura 47 – Expressão e ativação da AKT após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*.



(A) AKT total, (B) p-AKT S473 por AKT total e (C) p-AKT T308 por AKT total; (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. * $P < 0,05$, $n = 5$ para todos os grupos.

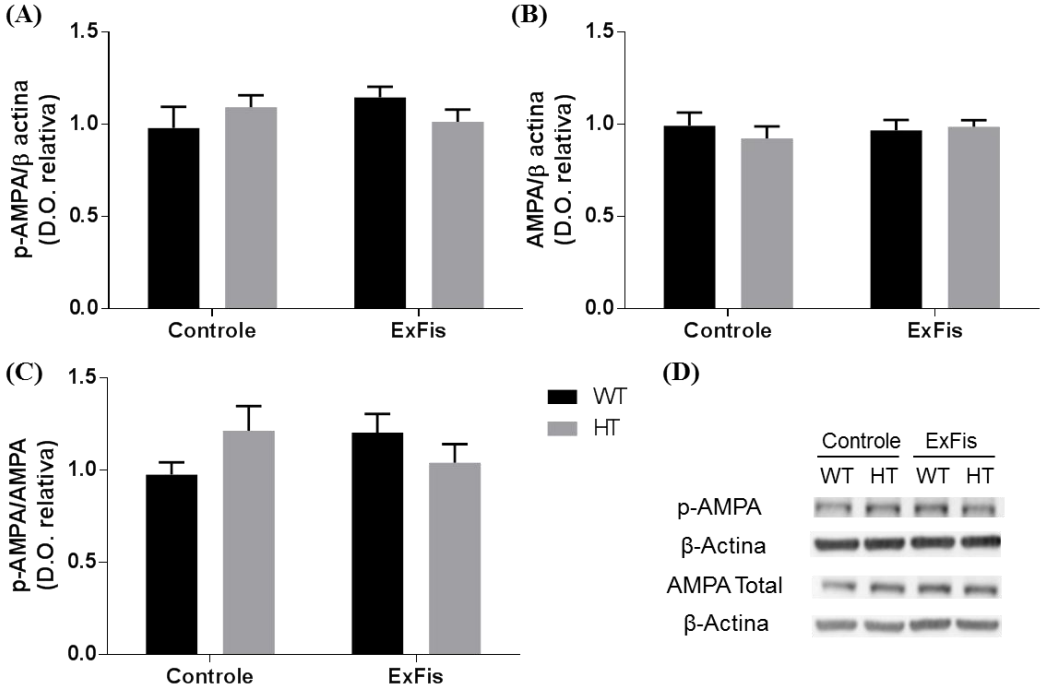
Os dados dos marcadores de atividade sináptica também não foram conclusivos. Mais uma vez, o limitado espaço amostral disponível no momento da realização dos experimentos pode ter contribuído para a não observância dos resultados esperados. Não foi observada nenhuma diferença estatística para a ativação e expressão total tanto do NR1 (Figura 48) quanto do AMPA (Figura 49).

Figura 48 – Expressão e ativação do NR1 após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*.



(A) p-NR1, (B) NR1 total, (C) p-NR1 por NR1 total, e (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença significativa, n = 5 para todos os grupos.

Figura 49 – Expressão e ativação do receptor AMPA após período de exercício físico voluntário por *Western Blotting*.

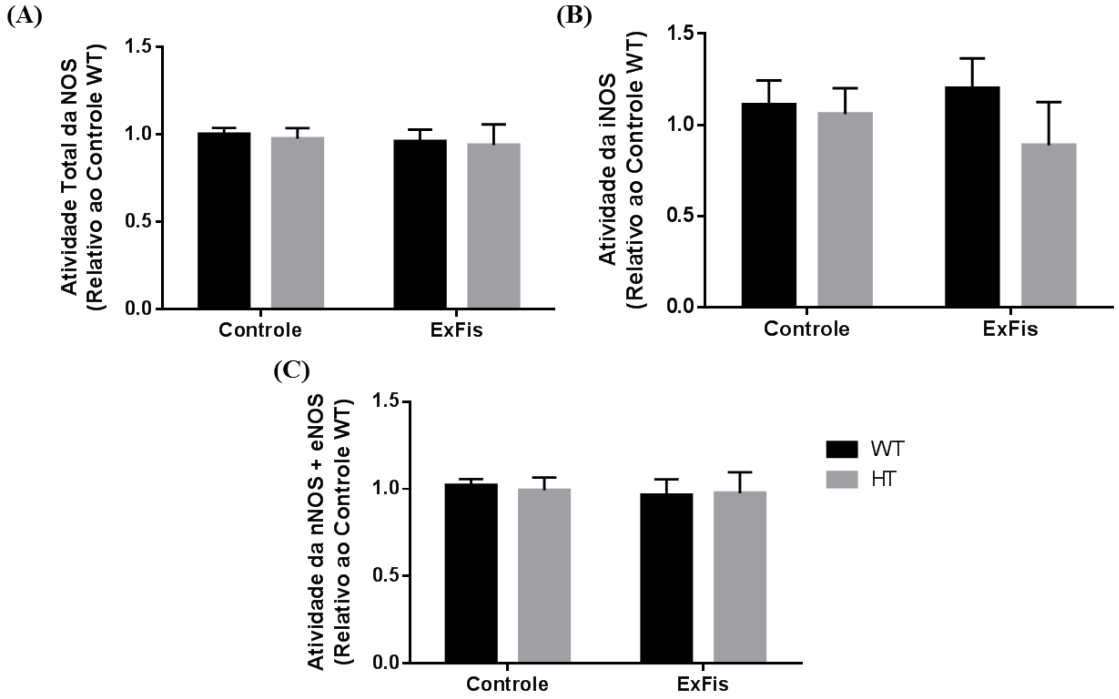


(A) p-AMPA, (B) AMPA total, (C) p-AMPA por AMPA total, (D) figuras representativas das bandas. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatística significativa, n = 5 para todos os grupos.

4.2.5.2 Atividade da NOS

Contrapondo-se ao encontrado no experimento da dieta intermitente, não foi observada nenhuma diferença quanto à atividade total da NOS (Figura 50, A) ou de suas isoformas iNOS (Figura 50, B) e nNOS ou eNOS (Figura 50, C), embora deva-se ressaltar que o número de amostras disponível para a realização deste ensaio era limitado.

Figura 50 – Avaliação da atividade da NOS após período de exercício físico voluntário.

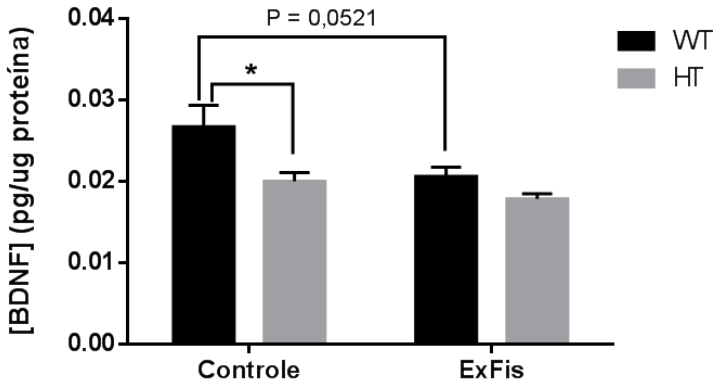


(A) atividade total da NOS e das isoformas (B) iNOS (insensível a cálcio) e (C) nNOS e eNOS (sensíveis a cálcio). Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. Não houve diferença estatisticamente significativa, n = 5 para todos os grupos.

4.2.5.3 Dosagem de BDNF

Por outro lado, a dosagem de BDNF no córtex dos animais dos experimentos do exercício físico voluntário demonstrou uma diminuição significativa dos níveis de BDNF nos animais controle HT em relação aos animais controle WT (Figura 51). Adicionalmente, foi observada uma diminuição dos níveis de BDNF nos animais WT exercitados em relação aos animais WT controle.

Figura 51 – Dosagem dos níveis de BDNF no córtex por kit de ELISA após o período de exercício físico voluntário.



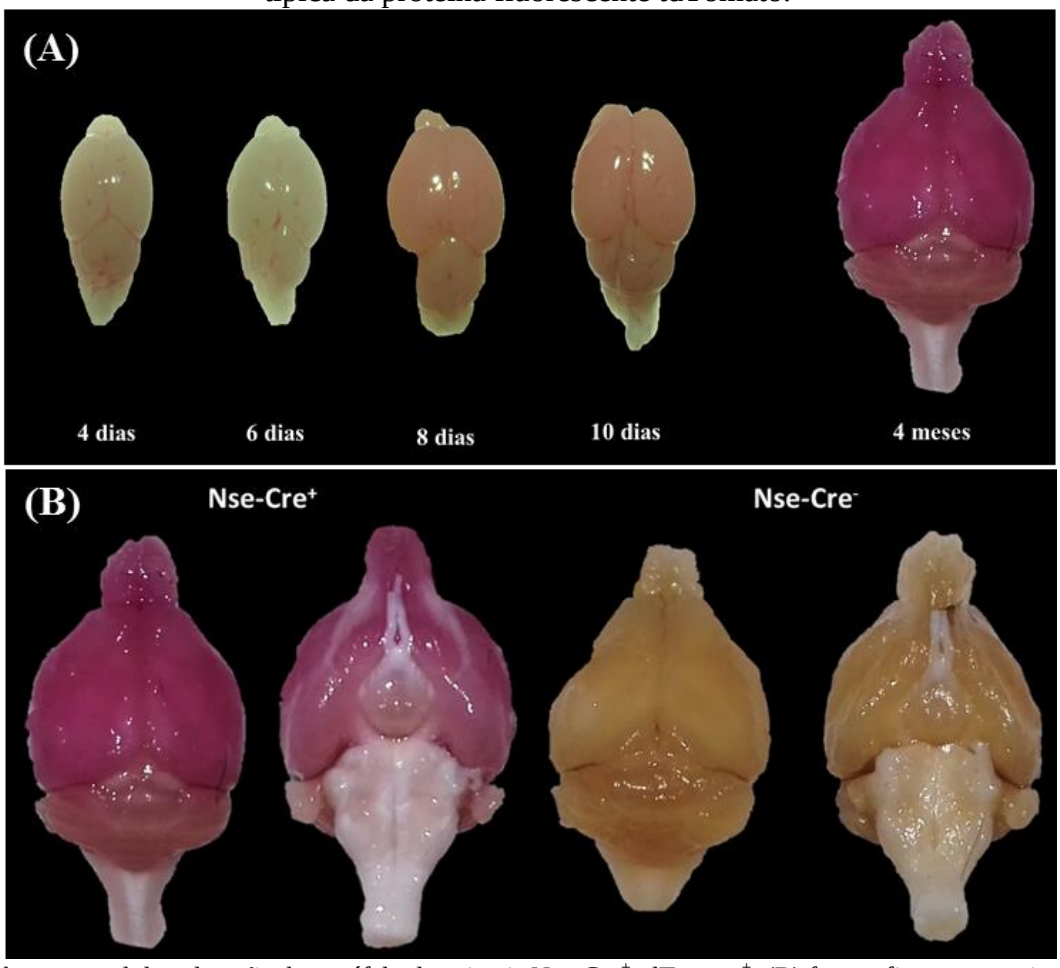
Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Holm-Šidák. *P < 0,05 para o fator "genótipo", n = 7 (EW) ou 8 (CW, CH, EH).

4.3 Avaliação do Perfil da Expressão da Cre Recombinase

Devido à não observação de diversos resultados esperados na linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$ já descritos na literatura, realizou-se uma checagem geral do perfil de expressão da Cre recombinase, permitindo uma verificação da efetiva expressão da enzima – um forte indicador da deleção esperada da PTEN e, portanto, contribuindo para a validação do modelo. Para isto, fez-se uso da linhagem transgênica *tdTomato*, que apresenta um repórter fluorescente expresso na presença na recombinase.

Inicialmente, foram dissecados os encéfalos de animais advindos do cruzamento das linhagens estudadas – consequentemente apresentando o genótipo *Nse-Cre*$^{+}$*;tdTomato*$^{+}$ – com diferentes idades, para avaliação macroscópica da expressão da proteína tdTomato. Observou-se que há uma intensificação da coloração avermelhada induzida pela constante expressão da proteína repórter, presente de forma macroscopicamente ubíqua no sistema nervoso central (Figura 52, A). Percebe-se que há uma notável coloração do encéfalo nos animais com 4 meses – idade próxima à dos animais utilizados para os ensaios deste trabalho –, efeito não observado no animal sem o gene da Cre recombinase (Figura 52, B).

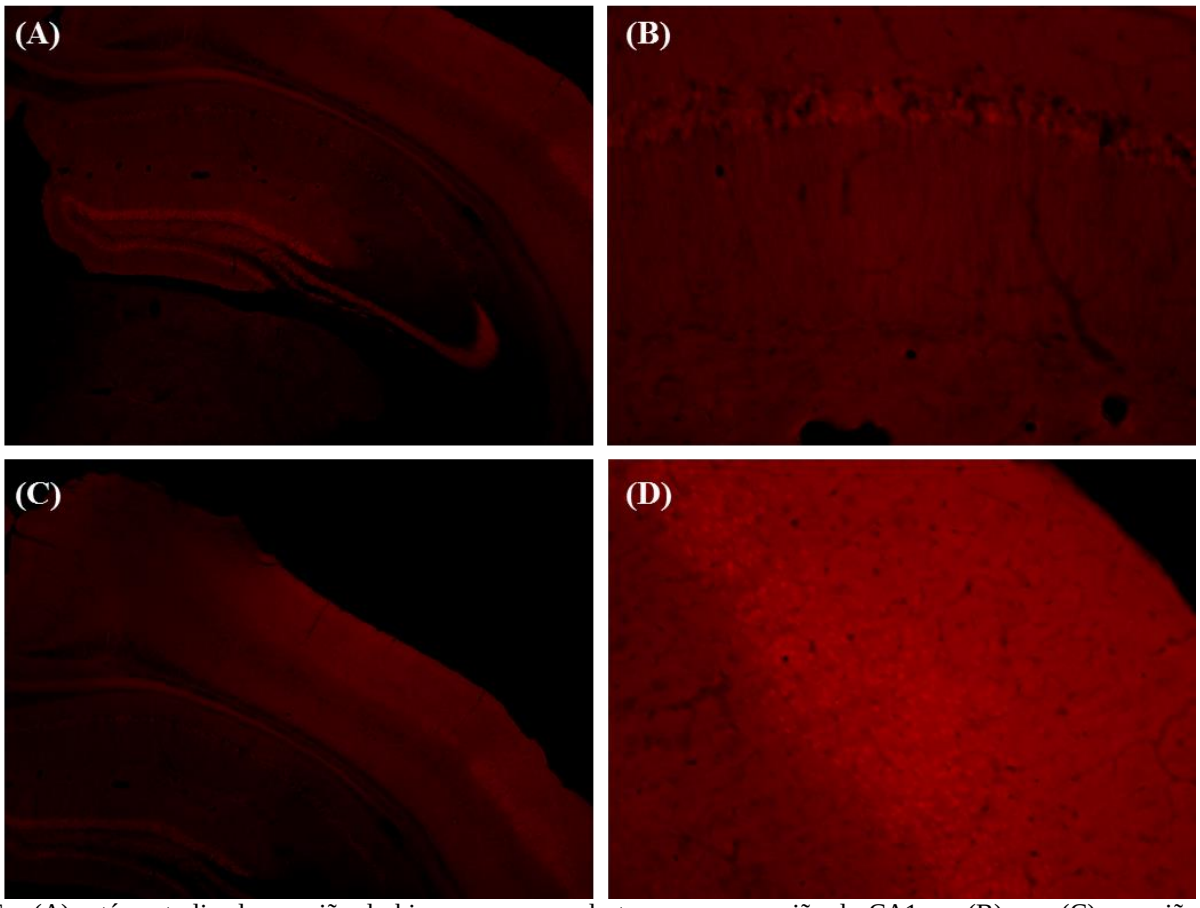
Figura 52 – Perfil macroscópico de expressão da Cre recombinase, avaliada pela coloração típica da proteína fluorescente tdTomato.



(A) Linha temporal da coloração do encéfalo de animais Nse-Cre^{+};tdTomato^{+}; (B) fotografias comparativas entre um encéfalo de um animal com a ativação da expressão de tdTomato (à esquerda) e um controle negativo Nse-Cre^{-} (à direita).

Posteriormente, foi realizada uma avaliação histológica destes animais. Devido à fluorescência intrínseca da proteína tdTomato, não é necessária nenhuma reação de marcação. Observou-se uma marcação de grande intensidade por todo o encéfalo. Interessantemente, pode-se observar uma forte marcação na região do hipocampo – especialmente no giro dentado (Figura 53, A) e nos neurônios da região do CA1 (Figura 53, B) – e no córtex (Figura 53, C e D).

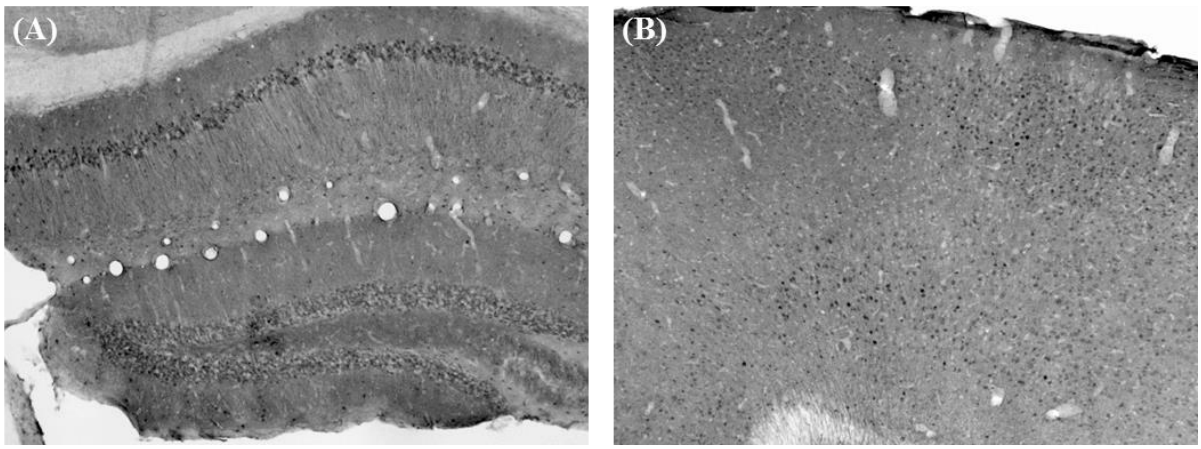
Figura 53 – Padrão de expressão da Cre recombinase, avaliada pela imunofluorescência da proteína tdTomato em cortes histológicos.



Em (A) está centralizada a região do hipocampo, com destaque para a região do CA1 em (B); em (C), a região do córtex, com destaque em (D).

Contudo, devido à intensa expressão da tdTomato, a marcação – que se estende a todo o corpo celular das células com expressão da Cre – ofusca a visualização da morfologia das células em questão, dificultando a análise da localização das células marcadas. Portanto, a fim de se obter uma avaliação mais clara da expressão da Cre, optou-se pela realização de uma técnica de imunohistoquímica, permitindo um melhor ajuste fino na revelação da imagem. De fato, observa-se que há uma marcante expressão da recombinase na região do giro dentado e nos neurônios do CA1 (Figura 54, A) do hipocampo, bem como espalhados por diversas camadas do córtex (Figura 54, B).

Figura 54 – Padrão de expressão da Cre recombinase, avaliada por reação de imunohistoquímica da proteína tdTomato em cortes histológicos.



Em destaque, um corte com a região do (A) hipocampo e outro com uma região representativa do (B) córtex.

Portanto, observa-se, de fato, que há uma efetiva expressão da Cre recombinase, que se espalha por diversas áreas do encéfalo, inclusive em regiões nas quais os principais tipos celulares presentes são neurônios. Contudo, nota-se que esta expressão é, em diversas regiões, esparsa e discreta, indicando, possivelmente, uma limitada penetrância da deleção da PTEN.

5 DISCUSSÃO

5.1 Perfil Geral

Interessantemente, a tendência de haver uma limitação no crescimento dos animais HT, observada no estudo da dieta intermitente (Figura 8), não foi corroborada no estudo do exercício físico (Figura 32), o que lança a dúvida se há, de fato, um efeito significativo sobre o ganho de massa corpórea com o tempo nos animais controle da linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$. A dieta intermitente, ao contrário do exercício físico, não influenciou no ganho de massa total dos animais. Mesmo apresentando um consumo de ração inferior ao do grupo controle, os animais em dieta intermitente consumiam – nos períodos de oferecimento AL de ração – uma quantidade próxima ao consumo de dois dias dos animais controle (Figura 9), o que pode justificar o contrabalanceamento da perda de massa ocorrida após cada período de jejum. De fato, Anson et al. (86) também observaram que o consumo médio de ração em camundongos sob dieta intermitente era semelhante aos animais com oferecimento AL de alimento, correspondendo a uma manutenção da massa corpórea. Por outro lado, conforme revisado por Varady e Hellerstein (87), outros estudos demonstraram a inabilidade dos animais em compensar o consumo de ração no dia seguinte ao jejum, culminando em uma perda de massa corpórea. Os autores apontam diversos fatores – como origem genética da linhagem, condições de acondicionamento, palatabilidade da ração e energia da dieta – como possíveis justificativas para esta variabilidade observada entre diversos estudos. Os animais submetidos ao exercício físico, por sua vez, apresentaram – independentemente do genótipo – um menor ganho de massa corpórea com o tempo (Figura 32), paralelo a um aumento do consumo de ração (Figura 33), um efeito justificado pela necessidade de um maior aporte calórico, devido ao intenso aumento do gasto energético pelo exercício voluntário realizado diariamente.

Sabe-se que a deleção neuronal da PTEN pode ocasionar macrocefalia, tendo este efeito já sido caracterizado no modelo de deleção neuronal condicionada da PTEN guiada pelo promotor da enolase específica para neurônio (*Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$) (24,36). Indo de encontro ao relatado por Napoli *et al.* (36), não foi observado aumento da massa do cerebelo e do hipocampo nos animais HT (Figuras 10 e 34), possivelmente por se tratarem de animais mais novos do que os utilizados por este estudo. No trabalho daquele grupo, os animais avaliados eram cerca de 2 meses mais velhos que os animais deste projeto. Esta diferença de idade pode justificar a observação de uma diferença estatisticamente significativa da hipertrofia neuronal ocasionada pela deleção da PTEN em outras regiões, uma vez que a progressão da macrocefalia induzida pela deleção da PTEN já foi reportada previamente (24). Por outro lado, corroborando os dados da literatura (24,36), foi observado um aumento

significativo da massa total do encéfalo e da massa do córtex (Figuras 10 e 34), nos animais com a deleção da PTEN, corroborando os dados da literatura (24,36) e ressaltando os efeitos corticais como uma região importante para o fenótipo de macrocefalia.

5.2 Perfil Comportamental

No primeiro trabalho com informações comportamentais da linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$, Kwon et al. (24) observaram que os animais HO – que, curiosamente, não vinham a óbito precocemente nos trabalhos deste grupo – apresentavam um aumento no tempo de exploração do braço aberto do labirinto em cruz elevado em relação aos animais WT. Os animais HO do trabalho de Lugo et al. (30) – também advindos de uma linhagem seletiva para células neurais, associada ao promotor do gene *Gfap* – apresentaram um perfil semelhante. Interessantemente, neste trabalho não foi observado este efeito ansiolítico da deleção da PTEN. Contudo, quando submetido ao estímulo de uma intervenção não-farmacológica – dieta intermitente (Figuras 12 e 13) ou exercício físico voluntário (Figuras 36 e 37) – observou-se um perfil dos animais HT semelhante ao descrito na literatura para animais com deleção HO condicionada da PTEN. Contudo, Smith et al. (88), utilizando animais HT desta mesma linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Gfap-Cre*$^{+}$, não observaram nenhum efeito no labirinto em cruz elevado, seja em condições controle ou sob estímulo – no caso, um modelo de um indução de *status epilepticus* –, indicando que diferentes estímulos podem ter diferentes efeitos na revelação de fenótipos nesta linhagem.

Por outro lado, os resultados observados no ensaio do campo aberto demonstraram-se paradoxais. No estudo da dieta intermitente, os animais em dieta, que, no labirinto em cruz elevado, apresentaram um perfil de comportamento de medo e ansiedade reduzido, no campo aberto (Figura 15) passaram significativamente menos tempo na área central – o que indicaria um perfil oposto. Os animais HT em exercício físico não apresentaram tal perfil (Figura 39), não tendo este parâmetro alterado significativamente. Smith et al. (88) observaram um aumento da distância total percorrida pelos animais HT submetidos ao protocolo de *status epilepticus* – resultado aparentemente oposto à tendência observada neste trabalho. Contudo, embora não tenham publicado os dados relativos ao tempo gasto em cada região do aparato, os pesquisadores demonstraram que aquele aumento de mobilidade se dava apenas na área periférica, sem haver alteração na distância percorrida na área central relativamente aos outros grupos. Semelhantemente, Kwon et al. (24) demonstraram que, apesar de apresentarem um aumento de mobilidade total, animais HO também passam um menor tempo na área central do aparato. Este resultado foi posteriormente corroborado em outro trabalho do grupo (89), no

qual os pesquisadores elegantemente resgataram o fenótipo por meio da inibição da ativação da via da mTOR, utilizando um tratamento crônico de rapamicina. Em outro trabalho do grupo, Ogawa et al. (89), analisando animais HO, também observaram uma maior mobilidade dos animais com a deleção neuronal condicionada da PTEN, o que os pesquisadores associaram a um perfil de ansiedade aumentada. Interessantemente, estes animais HO, quando expostos a uma roda giratória, percorriam uma distância menor (e em um perfil alterado) em relação aos animais WT, resultado que vai de encontro ao observado neste estudo – no qual observou-se uma tendência de aumento da atividade espontânea na roda giratória por animais HT (Figura 31). A observação de resultados aparentemente controversos entre os ensaios do labirinto em cruz elevado e do campo aberto não é um evento incomum. A inconsistência de resultados entre diferentes tipos de testes na avaliação de parâmetros associados ao medo e a ansiedade já foi observada em outros estudos (90,91) e pode estar associada não apenas à possível variação do estado comportamental do animal no momento da avaliação – que pode sofrer oscilações de acordo com o ritmo circadiano, além de apresentar variações entre dias distintos – mas também devido à natureza multidimensional dos comportamentos, ou melhor, à existência de diferentes fatores e manifestações do comportamento ansioso que podem ser observados por cada tipo de ensaio comportamental (92). Sendo assim, a observação de resultados paradoxais não invalida o resultado observado, ao contrário, ressalta a importância da avaliação mais aprofundada de tais parâmetros.

Infelizmente, não foi possível avaliar a ocorrência de algum efeito mediado pela deleção da PTEN – na presença ou não da dieta intermitente ou do exercício físico – nos ensaios do reconhecimento do objeto novo (Figura 16) e do reconhecimento da localização do objeto (Figura 40). Faz-se necessária uma padronização mais apurada para alcançar as condições mais adequadas de realização dos respectivos protocolos. Outros estudos já indicaram a ocorrência de déficit na memória de reconhecimento em animais HO e HT (24,30,36), porém, para isto, utilizaram protocolos de reconhecimento social. Possivelmente, o marcante impacto da deleção neuronal da PTEN sobre a interação social, conforme discutido nestes estudos, tenha sido um fator impactante nos resultados deste ensaio, apontando os ensaios de reconhecimento e de preferência social como alternativas mais interessantes para avaliação de parâmetros associados não apenas aos déficits de interação social, mas também em relação à memória de reconhecimento.

Em relação ao ensaio do labirinto aquático de Morris, esperava-se observar um déficit de aprendizado e evocação da memória espacial, uma vez que Kwon et al. (24) demonstraram este comportamento alterado nos animais HO. Contudo, neste trabalho não foi observado

nenhum efeito do genótipo ou dos tratamentos sobre o aprendizado dos animais. De fato, Smith et al. (88) não observaram nenhum efeito no aprendizado e na memória nos ensaios realizados no labirinto aquático de Morris nos animais HT da linhagem avaliada pelo grupo. No estudo do exercício físico, observou-se uma possibilidade de que o genótipo tenha afetado negativamente a memória espacial nos animais HT, embora nenhum efeito significativo tenha sido observado quanto a isso. Por outro lado, foi encontrado um efeito deletério do exercício físico, reduzindo o desempenho dos animais WT em mais de um dos pontos avaliados – um resultado que pode estar associado ao estado de ansiedade aumentado induzido pelo tratamento. Devido à marcante variância observada em alguns ensaios – além do limitado espaço amostral disponível – não foi possível obter resultados conclusivos em relação à modulação do genótipo e do exercício físico sobre o perfil da memória espacial. Porém, a análise da memória espacial pelo labirinto aquático de Morris ainda constitui um interessante parâmetro de análise neste modelo. Apesar de não ter sido observado um efeito significativo, observou-se que, em ambos estudos, a curva de aprendizado dos animais controle HT está acima da dos animais controle WT, constituindo um indicativo da ocorrência de déficit de aprendizado nos animais com a deleção da PTEN. Desta forma, ressalta-se a importância da continuidade da exploração destes estudos.

Nos estudos prévios utilizando esta linhagem com deleção condicionada da PTEN, seletiva a neurônios, não aparece um consenso em relação à memória associada ao medo. Kwon et al. (24) não observaram nenhum déficit no ensaio de condicionamento de medo nos animais HO. Semelhantemente, Smith et al. (88) também não observaram nenhum efeito nos animais HT da linhagem estudada, embora tenham indicado um possível aumento do aprendizado nos animais HT submetidos ao protocolo de indução de *status epilepticus*. Contudo, nenhum destes estudos avaliou parâmetros de aprendizado e memória por meio do ensaio da esquiva inibitória. A memória associada ao medo contextual avaliada pela esquiva inibitória é, também, majoritariamente associada ao processamento pelo hipocampo e pela amígdala, porém regiões corticais – como o córtex entorrinal – também apresentam um papel importante (84). Interessantemente, no estudo da dieta intermitente, os animais HT apresentaram um déficit de memória associada ao medo, fenótipo revertido pela dieta intermitente (Figura 21). A comparação com o estudo do exercício físico (Figura 45) foi dificultada pelo aumento da latência basal dos animais, um efeito possivelmente induzido por um estado de medo e ansiedade aumentado nos animais utilizados – corroborado pelos menores valores de tempo de exploração do braço aberto do labirinto em cruz elevado e de porcentagem de permanência na área central do campo aberto, em relação aos dos animais do

estudo da dieta intermitente. Este fenótipo ansioso pode estar relacionado ao isolamento social. No estudo do exercício físico, os animais são separados individualmente nas gaiolas a fim de garantir o acesso dos animais à roda giratória – os animais dos grupos controle também são individualizados, a fim de padronizar as condições em todos os grupos. De fato, o isolamento social tem sido utilizado como um modelo de indução de distúrbios cognitivos, inclusive podendo gerar déficit de memória associada ao medo (93). Contudo, este efeito parece ser resgatado por meio da intervenção do exercício físico, ressaltando o potencial terapêutico das intervenções não-farmacológicas utilizadas neste estudo. Deve-se ressaltar, porém, que a realização de mais de um ensaio comportamental em cada batelada experimental pode influenciar no resultado dos outros ensaios. Portanto, é importante levar em consideração a possibilidade de que a realização de diversos ensaios comportamentais pode ter contribuído para um possível mascaramento de alguns dos efeitos comportamentais esperados, porém não observados.

5.3 Perfil Bioquímico e Molecular

A avaliação molecular inicial do hipocampo demonstrou a limitação em avaliar esta região, possivelmente devido à sensibilidade dos ensaios utilizados frente à intensidade de deleção da PTEN – que, além de HT, é seletiva a neurônios –, cujo efeito pode ter sido mascarado pela presença de proteínas advindas de células vizinhas, em maioria, não afetadas pela deleção. A não observância dos resultados encontrados por Napoli et al. (36) em hipocampo também pode ter ocorrido, como discutido anteriormente, devido à utilização de animais mais novos. Interessantemente, Smith et al. (88) também não observaram nenhuma diferença significativa por *Western Blotting* no hipocampo dos camundongos HT da linhagem $Pten^{loxp/+}$;$Gfap\text{-}Cre^{+}$. Este grupo também avaliou animais mais jovens, iniciando os ensaios com camundongos de 2 meses de idade.

O córtex, por sua vez, demonstrou um maior potencial de observação do perfil bioquímico e molecular neste modelo, fato reforçado pelo aumento de massa da região (Figuras 10 e 34). Apesar da não observância da redução dos níveis de PTEN no estudo do exercício físico (Figura 46), pode-se observar uma tendência de ativação da AKT nos animais HT (Figuras 25 e 47). Pelos resultados encontrados, o modelo parece corroborar a hipótese de hiperativação da via da PI3K/AKT, embora não tenha ficado claro o possível papel modulatório das intervenções não farmacológicas sobre a via neste contexto. Uma possível justificava para o mascaramento dos resultados observados pode ter sido o estado alimentar dos animais. Em ambos estudos, os animais foram eutanasiados no período da manhã, com o

oferecimento de ração AL por ao menos 12 h. Desta forma, todos encontravam-se alimentados e, portanto, com um alto aporte de nutrientes, um forte ativador da via da PI3K/AKT.

Zhou et al. (89) demonstraram que a inibição farmacológica do mTORC1 – uma via de sinalização a jusante da PTEN que é potencialmente modulável pela dieta e pelo exercício físico (94) – é capaz de suprimir anormalidades anatômicas e funcionais em neurônios com deleção da PTEN. Levando-se isto em consideração, e que a PTEN possui um papel crucial para sinalização glutamatérgica e plasticidade sináptica (27,95), reforça-se a hipótese de ocorrência de um desbalanço da relação excitação/inibição em modelos de deleção neuronal da PTEN, bem como nas desordens do espectro autista (96). Infelizmente, não foi possível observar nenhum efeito do genótipo ou dos tratamentos sobre a expressão e a ativação dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos estudados – NMDA (Figuras 26 e 48) e AMPA (Figuras 27 e 49). Semelhantemente, nenhuma variação da avaliação da atividade da nNOS – um possível indicador da atividade glutamatérgica – foi encontrada (Figuras 28 e 50). Curiosamente, foi observado um aumento independente do tratamento da atividade da iNOS nos animais HT do estudo da dieta intermitente (Figura 28), embora o resultado não tenha sido corroborado pelo estudo do exercício físico (Figura 50) – possivelmente devido ao menor espaço amostral disponível neste ensaio. Se confirmado, este aumento da atividade de iNOS nesta linhagem seria um indicativo da ocorrência de um efeito mediado pela deleção condicionada da PTEN, possivelmente associado a um processo inflamatório ou de desbalanço redox (97), envolvendo outros mecanismos pelos quais o comportamento da linhagem pode estar sendo modulado, justificando a necessidade da expansão dos estudos na área.

Embora os resultados de BDNF também não tenham sido consistentes entre os estudos da dieta intermitente (Figura 29) e do exercício físico (Figura 51), a possibilidade de redução dos níveis de BDNF induzida pela deleção da PTEN constitui um interessante objetivo para estudos futuros, uma vez que poderia apontar para um possível mecanismo dos efeitos da deleção da PTEN sobre a cognição. Por outro lado, a tendência de redução de BDNF induzida pelo exercício físico nos animais WT foi um resultado inesperado, uma vez que vai de encontro ao que vem sido estabelecido pela literatura (23). Contudo, é importante ressaltar que este resultado se correlaciona com o perfil observado na avaliação da memória espacial pelo labirinto aquático de Morris (Figuras 42 e 43), apontando o BDNF como um potencial modulador do fenótipo da linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$. A realização de novos estudos com esta linhagem, aumentando o espaço amostral dos experimentos com exercício físico e

expandindo a avaliação da interligação entre a via da PI3K/AKT e a expressão BDNF, bem como as vias moduláveis pela neurotrofina, pode auxiliar na melhor elucidação destes resultados.

Por fim, levando-se em consideração a não observação de alguns fenótipos esperados na linhagem *Pten*$^{loxp/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$, foi realizada a avaliação da expressão da Cre recombinase, por meio da avaliação da linhagem *Nse-Cre*$^{+}$*;tdTomato*$^{+}$ (Figuras 52 a 54), a fim de validar o modelo utilizado por este trabalho. Estes testes contribuíram não apenas para esta validação – confirmando a expressão da recombinase no sistema nervoso central –, mas também por corroborarem a justificativa de que a expressão esparsa da enzima – e, consequentemente, da deleção da PTEN – possa ter contribuído para o mascaramento de alguns efeitos esperados e que não foram observados nas análises realizadas.

6 CONCLUSÃO

Aparentemente, os animais com a deleção neuronal condicionada da PTEN apresentam um fenótipo de diminuição do comportamento de medo e ansiedade, embora talvez seja necessário um estímulo para que este efeito seja revelado. Não foi encontrado nenhum efeito sobre a memória de localização espacial, mas sim um déficit de memória associada ao medo. As intervenções não-farmacológicas estudadas – a dieta intermitente e o exercício físico – apresentaram um interessante potencial de reversão deste fenótipo.

Não foi observado nenhum efeito sobre a região do hipocampo, possivelmente devido a um mascaramento dos resultados pelas células (ou tipos celulares) não afetados pela deleção, uma vez que a mesma é seletiva a neurônios e possui uma penetrância limitada. A região do córtex apresentou um fenótipo mais marcantemente afetado pela deleção da PTEN, embora os resultados não tenham sido conclusivos para a elucidação dos efeitos bioquímicos da deleção condicionada da PTEN. Estudos de imunofluorescência, por sua vez, podem ajudar a caracterizar melhor os tipos celulares e proteínas que são modulados pelo fenótipo da linhagem $Pten^{loxp/+};Nse\text{-}Cre^{+}$, contornando as limitações observadas e contribuindo para a elucidação dos efeitos estudados.

Este modelo demonstrou um interessante potencial na avaliação dos efeitos da PTEN sobre a cognição e a plasticidade sináptica. Os resultados observados com a dieta intermitente e o exercício físico apontaram para um interessante potencial de reversão de fenótipos deficitários da linhagem estudada, o que embasa a importância de mais estudos na área, para explorar de forma mais completa estes efeitos. Contudo, faz-se necessário o balizamento dos parâmetros comportamentais e bioquímicos – visando a otimização das condições de avaliação dos déficits apresentados – e, no caso do exercício físico, a expansão do espaço amostral para garantir a finalização das análises iniciadas. De qualquer forma, deve-se ressaltar que este trabalho também ressaltou a possibilidade – e necessidade – da reavaliação deste modelo na vigência de outros estímulos com potencial de melhor eficácia para a revelação dos efeitos esperados – que podem estar sendo mascarados por adaptação do organismo à deleção da PTEN –, uma interessante perspectiva de estudo na área.

REFERÊNCIAS*

1. Sacks O. Gratitude. 1st ed. [Toronto]: Knopf Doubleday Publishing Group; 2015. 64 p.

2. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. J Natl Cancer Inst. 1999;91(22):1922–32.

3. Gray IC, Stewart LM, Phillips SM, Hamilton J a, Gray NE, Watson GJ, et al. Mutation and expression analysis of the putative prostate tumour-suppressor gene PTEN. Br J Cancer. 1998;78(10):1296–300.

4. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. Cancer Res. 1997;57(22):4997–5000.

5. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN Tumor Suppression. Vol. 133, Cell. 2008. p. 403–14.

6. Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, et al. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. Cell. 2011;144(2):187–99.

7. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem. 1998;273(22):13375–8.

8. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Sep 1;4(9):a011189–a011189.

9. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. Nat Genet. 1998;19(4):348–55.

10. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(4):1563–8.

11. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, et al. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. Curr Biol. 1998;8(21):1169–78.

12. Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. Science. 2004;303(5661):1179–81.

13. Stambolic V, Suzuki A, De la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell. 1998;95(1):29–39.

14. Perandones C, Costanzo RV, Kowaljow V, Pivetta OH, Carminatti H, Radrizzani M.

* De acordo com o Estilo Vancouver (98).

Correlation between synaptogenesis and the PTEN phosphatase expression in dendrites during postnatal brain development. Mol Brain Res. 2004;128(1):8–19.

15. Backman SA, Stambolic V, Suzuki A, Haight J, Elia A, Pretorius J, et al. Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. Nat Genet. 2001;29(4):396–403.

16. Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, et al. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. Science (80-). 2001;294(5549):2186–9.

17. Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Knoop LL, Tharp R, Smeyne RJ, et al. Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. Nat Genet. 2001;29(december):404–11.

18. Marino S, Krimpenfort P, Leung C, van der Korput H a GM, Trapman J, Camenisch I, et al. PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumourigenesis in the cerebellum. Development. 2002;129:3513–22.

19. Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, Mitra P, Poluha W, Lambert S, et al. A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. J Neurosci. 2000;20(4):1404–13.

20. Gu T, Zhang Z, Wang J, Guo J, Shen WH, Yin Y. CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. Cancer Res. 2011;71(8):2821–5.

21. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. Vol. 11, Current Opinion in Neurobiology. 2001. p. 272–80.

22. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca2+ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. Neuron. 1998;20(4):709–26.

23. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. Vol. 25, Trends in Endocrinology and Metabolism. 2014. p. 89–98.

24. Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, et al. Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. Neuron. 2006;50(3):377–88.

25. Fraser MM, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Baker SJ. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. Neuroscience. 2008;151(2):476–88.

26. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. J Neurosci. 2005;25(49):11300–12.

27. Sperow M, Berry RB, Bayazitov IT, Zhu G, Baker SJ, Zakharenko SS. Phosphatase and tensin homologue (PTEN) regulates synaptic plasticity independently of its effect on neuronal morphology and migration. J Physiol. 2012 Feb;590(4):777–92.

28. Wang Y, Cheng A, Mattson MP. The PTEN phosphatase is essential for long-term depression of hippocampal synapses. Neuromolecular Med. 2006 Jan;8(3):329–36.

29. Butler MG, Dasouki MJ, Zhou X-P, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, et al. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. J Med Genet. 2005;42(4):318–21.

30. Lugo JN, Smith GD, Arbuckle EP, White J, Holley AJ, Floruta CM, et al. Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. Front Mol Neurosci. 2014;7(April):27.

31. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(14):5166–70.

32. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol. 1981;150(4):467–86.

33. Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. J Biochem. 1997;122(5):977–82.

34. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis. 2000 Mar;26(2):99–109.

35. Marangos PJ, Schmechel DE, Parma AM, Goodwin FK. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. Brain Res. 1980;190(1):185–93.

36. Napoli E, Ross-Inta C, Wong S, Hung C, Fujisawa Y, Sakaguchi D, et al. Mitochondrial dysfunction in Pten Haplo-insufficient mice with social deficits and repetitive behavior: Interplay between Pten and p53. PLoS One. 2012;7(8).

37. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. Science. 2009;325(5937):210–3.

38. Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. PNAS. 2010;107(5):2367–72.

39. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 1965;124(3):319–35.

40. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neuroscience. 1993;56(2):337–44.

41. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science (80-). 1977;197(4308):1092–4.

42. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci. 1996;16(6):2027–33.

43. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(6):3168–71.

44. Gould E, Daniels DC, Cameron HA, McEwen BS. Expression of adrenal steroid receptors by newly born cells and pyknotic cells in the dentate gyrus of the postnatal rat. Mol Cell Neurosci. 1992;3(1):44–8.

45. Brännvall K, Korhonen L, Lindholm D. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Mol Cell Neurosci. 2002;21(3):512–20.

46. Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM. An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat. Eur J Neurosci. 2003;18(4):923–30.

47. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci. 2000;20(24):9104–10.

48. Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. Eur J Pharmacol. 2001;411(1–2):67–70.

49. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. Mol Cell Neurosci. 1998;11(4):234–45.

50. Aberg M a, Aberg ND, Hedbäcker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. J Neurosci. 2000;20(8):2896–903.

51. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. Proc Natl Acad Sci. 1999;96(9):5263–7.

52. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Vol. 386, Nature. 1997. p. 493–5.

53. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci. 1999;2(3):266–70.

54. Praag H Van, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(23):13427–31.

55. Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y, Akhavan MM, Semnanian S, Safari M. Voluntary exercise ameliorates cognitive deficits in morphine dependent rats: The role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor. Neurobiol Learn Mem. 2011;96(3):479–91.

56. Hopkins ME, Bucci DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. Neurobiol Learn Mem. 2010;94(2):278–84.

57. Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. J Neurosci. 2000;20(8):2926–33.

58. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. Eur J Neurosci. 2003;18(10):2803–12.

59. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. J Neurosci. 2001;21(5):1628–34.

60. Redila VA, Christie BR. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. Neuroscience. 2006;137(4):1299–307.

61. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming G-L, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. J Neurosci. 2006;26(1):3–11.

62. Chen Y-W, Lin M-F, Chen Y-C, Hung C-H, Tzeng J-I, Wang J-J. Exercise training attenuates postoperative pain and expression of cytokines and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in rats. Reg Anesth Pain Med. 2013;38(4):282–8.

63. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat Rev Neurosci. 2013 Jun;14(6):383–400.

64. Bruel-Jungerman E, Veyrac A, Dufour F, Horwood J, Laroche S, Davis S. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. PLoS One. 2009;4(11).

65. van Praag H, Fleshner M, Schwartz MW, Mattson MP. Exercise, Energy Intake, Glucose Homeostasis, and the Brain. J Neurosci. 2014;34(46):15139–49.

66. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. Mech Ageing Dev. 1990;55(1):69–87.

67. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. Cell Metab. 2014 Feb;19(2):181–92.

68. Fontán-Lozano A, Sáez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Domínguez SA, López-Lluch G, et al. Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor. J Neurosci. 2007;27(38):10185–95.

69. Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. Vol. 16, Journal of Nutritional Biochemistry. 2005. p. 129–37.

70. Texel SJ, Camandola S, Ladenheim B, Rothman SM, Mughal MR, Unger EL, et al. Ceruloplasmin deficiency results in an anxiety phenotype involving deficits in hippocampal iron, serotonin, and BDNF. J Neurochem. 2012;120(1):125–34.

71. Kawamoto EM, Scavone C, Mattson MP, Camandola S. Curcumin requires tumor necrosis factor ?? signaling to alleviate cognitive impairment elicited by lipopolysaccharide. NeuroSignals. 2013;21(1–2):75–88.

72. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory". Nat Protoc. 2006;1(3):1306–11.

73. Ferguson D, Sapolsky R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. J Neurosci. 2007;27(30):8046–52.

74. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. Behav Brain Res. 2001;124(1):47–54.

75. Okun E, Griffioen K, Barak B, Roberts NJ, Castro K, Pita M a, et al. Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(35):15625–30.

76. Vasconcelos AR, Yshii LM, Viel TA, Buck HS, Mattson MP, Scavone C, et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. J Neuroinflammation. 2014;11(1):85.

77. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248–54.

78. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.

79. Kawamoto EM, Munhoz CD, Glezer I, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R, et al. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2005 Jun;26(6):857–64.

80. Masson GS, Costa TSR, Yshii L, Fernandes DC, Soares PPS, Laurindo FR, et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. Ulrich H, editor. PLoS One. 2014 May 1;9(5):e94927.

81. Furigo IC, Metzger M, Teixeira PDS, Soares CRJ, Donato J. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. Brain Struct Funct. 2017 Jan 12;222(1):341–63.

82. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. Vol. 13, Cognitive Processing. 2012. p. 93–110.

83. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Vol. 36, Brain research. Brain research reviews. 2001. 60-90 p.

84. Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig K a. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. J Neurosci. 2004;24(15):3826–36.

85. Fan X, Jin WY, Wang YT. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. Front Cell Neurosci. 2014 Jun 10;8:160.

86. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):6216–20.

87. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. Am J Clin Nutr. 2007 Jul;86(1):7–13.

88. Smith GD, White J, Lugo JN. Superimposing Status Epilepticus on Neuron Subset-Specific PTEN Haploinsufficient and Wild Type Mice Results in Long-term Changes in Behavior. Sci Rep. 2016 Nov 7;6:36559.

89. Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon C-H, Zhang W, Sinton C, et al. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. J Neurosci. 2009;29(6):1773–83.

90. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Behav Brain Res. 2002 Aug 21;134(1–2):49–57.

91. Anchan D, Clark S, Pollard K, Vasudevan N. GPR30 activation decreases anxiety in the open field test but not in the elevated plus maze test in female mice. Brain Behav. 2014 Jan;4(1):51–9.

92. Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol Sci. 2008 Oct;29(10):493–8.

93. Okada R, Matsumoto K, Tsushima R, Fujiwara H, Tsuneyama K. Social isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neuro-signaling system and Egr-1 expression in the brain. Neurochem Res. 2014 May;39(5):875–82.

94. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. Mol Cell. 2010 Oct;40(2):310–22.

95. Jurado S, Benoist M, Lario A, Knafo S, Petrok CN, Esteban JA. PTEN is recruited to the postsynaptic terminal for NMDA receptor-dependent long-term depression. EMBO J. 2010 Aug;29(16):2827–40.

96. Rubenstein JLR, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. Genes Brain Behav. 2003 Oct;2(5):255–67.

97. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. Exp Neurol. 2015 Jan;263:235–43.

98. Pestana MC, Dziabas MCC, Garcia EM, Santos MF dos, Nascimento MM, Cardoso SC. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver). 3ª ed. Funaro VMB de O, editor. São Paulo: Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas; 2016. 100 p.