NATÁLIA PRUDENTE DE MELLO

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

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

São Paulo
2018

NATÁLIA PRUDENTE DE MELLO

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

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Versão original.

São Paulo
2018

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)

Prudente de Mello, Natália
PTEN e Klotho: Influência do sexo e possível tratamento para condições associadas à deleção da proteína PTEN / Natália Prudente de Mello; orientador Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe. -- São Paulo, 2018.
58 p.

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

1. PTEN. 2. Klotho. 3. Influência do sexo. 4. Alterações morfológicas neuronais. 5. Rab7. I. Mitiko Kawamoto Iwashe, Profa. Dra. Elisa, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Titulo da Dissertação/Tese:

Orientador:

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

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

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

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

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

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

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Avaliação dos efeitos da proteína klotho sobre as alterações morfológicas neuronais características da deleção da proteína PTEN***", registrado sob o protocolo nº ***75/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***24/08/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Elisa Mitiko Kawamoto***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Natalia Prudente de Mello (Pós-graduando), Caio Henrique Yokoyama Mazucanti (Pós-graduando), João Victor Cabral Costa (Pós-graduando), Cristoforo Scavone (Pesquisador colaborador), Diana Zukas Andreotti (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Analysis of the effects of the klotho protein over the neuronal morfological alterations caracteristics from PTEN deletion***", protocol nº ***75/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***8/24/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Elisa Mitiko Kawamoto***
- Team members: *Natalia Prudente de Mello (Graduate Student), Caio Henrique Yokoyama Mazucanti (Graduate Student), João Victor Cabral Costa (Graduate Student), Cristoforo Scavone (Colaborator Researcher), Diana Zukas Andreotti (Laboratory Technician).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*eno-PTEN Background 005938-STOCK Tg (Eno2-cre) 39Ume/J (Jax mice) e PTEN loxp/t*	*Fêmea/female* *Macho/Male*	*2 meses/months* *2 meses/months* *Embrião*	*80* *20* *240*

São Paulo, 26 de agosto de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

À minha família, meu bem maior, a qual nunca mede esforços e palavras de incentivo para que eu alcance todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisa Kawamoto, minha orientadora, por todo ensinamento e aprendizado. Obrigada por todas as discussões, tanto científicas quanto pessoais, e por toda a confiança e liberdade que me concedeu. As nossas longas discussões sobre dados, hipóteses e novos experimentos foram sempre motivadoras, me permitindo ter um crescimento pessoal e profissional que são imensuráveis.

Ao Prof. Dr. Cristoforo Scavone, pelas contribuições acadêmicas e pelo comportamento contagiante e questionador, sempre incentivando o desenvolvimento do nosso pensamento crítico.

Ao Prof. Dr. Daniel Berwick, meu supervisor na *The Open University*, por ter me recebido de braços abertos e por todo o ensinamento proporcionado. Agradeço, também, pela hospitalidade e pela constante preocupação com o meu bem estar durante todo o meu período no exterior.

À todos os meus amigos do laboratório, em especial Amanda Galvão, Ana Maria Orellana, Diana Andreotti, Jacqueline Alves, João Victor Cabral-Costa, Larissa Lima e Paula Kinoshita, que, além de tornaram cada dia dessa jornada muito mais leve e divertida, estiveram sempre dispostos a me ajudar e a me ensinar. Obrigada por terem se tornado meus parceiros de trabalho e de vida.

À minha mãe, que, independente do momento ou da distância, sempre se mostrou presente e pronta para me ajudar; por ter feito das nossas vidas, a sua razão de viver; e por todo amor e dedicação sem nunca esperar nada em troca. Ao meu pai, que nunca nos cobrou nada além do que dedicação aos estudos e que sempre nos incentivou a continuar estudando. Os meus mais sinceros agradecimentos por tudo que me proporcionam até hoje.

Aos meus irmãos, meus eternos amigos. À Renata, por ter me apresentado o meio acadêmico e por sempre me orientar como uma irmã, mãe e professora – você será

sempre o meu exemplo. Ao Roberto e ao Rodrigo, por todo zelo e toda ajuda, e por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Obrigada por sempre apoiarem todos os meus sonhos

À Olívia e ao Pedro, meus sobrinhos e donos do meu coração. Tão pequenos, mas tão essenciais - Inúmeros foram os dias em que recorri aos seus vídeos e fotos para recarregar minhas energias. Independente da distância, espero que vocês sempre possam sentir o meu amor e a minha gratidão pela vida de vocês.

Às minhas amigas, em especial Beatriz Correia, Fabiane De Santi, Camila Pedrosa, Carolina Vazquez e Julia Akemi, por todas as conversas profissionais, pessoais, ou banais, e por dividirem comigo os meus problemas, sonhos e conquistas - obrigada por entenderem a minha ausência e por estarem sempre presente quando precisei.

Aos meus amigos da Inglaterra, especialmente Bradley, Tom, Adina e Clara, os quais se tornaram muito mais do que apenas meus *housemates*. Obrigada por todo apoio e toda a amizade, e por enriquecerem ainda mais a minha experiência nesse período.

À Deus, pela minha vida e a de todos ao meu redor.

À CAPES/CNPq pelo suporte financeiro.

Aos Processos nº 2015/25491-2 e 2017/25279-9, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo o apoio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14
1.1 PTEN.....14
1.2 Klotho.....16
1.3 Influência do Sexo.....18
2 OBJETIVOS.....19
2.1 Objetivo Geral.....19
2.2 Objetivos Específicos.....19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....19
3.1 Comissão de Ética.....19
3.2 Sistema Cre-loxP e Obtenção dos Animais.....20
3.3 Cultura Celular.....22
3.3.1 Cultura Embrionária Primária Neuronal.....22
3.3.2 *Human Embryonic Kidney* (HEK293T).....23
3.4 Ensaios Bioquímicos.....23
3.4.1 Reação de Cadeia em Polimerase (PCR).....23
3.4.2 Extração de Proteínas Citosólicas e Nucleares.....27
3.4.3 Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....27
3.4.4 Ensaio de *Western Blotting*.....27
3.4.5 ELISA.....28
3.5 Técnica de Microscopia.....29
3.5.1 Imunofluorescência.....29
3.6 Técnica de Biologia Molecular.....30
3.6.1 Plasmídeo de RNA de interferência da PTEN.....30
3.6.2 Transformação Bacteriana.....30
3.6.3 Purificação dos Plasmídeos.....30
3.6.4 Transfecção.....30
3.7 Análise Estatística.....31
4 RESULTADOS.....31
4.1 Validação in vitro do Modelo Animal de Deleção Condicionada da PTEN pelo Sistema Cre-LoxP.....31
4.1.1 Análise de Pureza da Cultura Primária Embrionária Neuronal.....31

4.1.2 Análise Temporal de Expressão da Enzima Cre recombinase.....32
4.1.3 Análise Temporal do Perfil de Expressão da Proteína PTEN 35
4.1.4 Análise da Fosforilação da AKT 38
4.1.5 Análise da Morfologia Neuronal.....39
4.2 Influência do Sexo na via de sinalização da PTEN-PI3K-AKT em animais adultos.....40
4.3 Influência do Sexo na Expressão da Proteína Klotho 42
4.4 PTEN e Klotho 43
4.4.1 Klotho como um possível substituto para a ausência de PTEN 43
5 DISCUSSÃO.....48
5.1 Validação do modelo de deleção da PTEN in vitro e Análise da Influência do Sexo nas Expressões das Proteínas PTEN e Klotho.....48
5.2 Klotho como um possível tratamento na ausência da PTEN 51
6 CONCLUSÃO.....53
REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

1.1 PTEN

A PTEN (*Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten*), originalmente caracterizada como supressora tumoral (LI, 1997), é uma proteína que apresenta como sua principal ação fosfatase dependente a desfosforilação do 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP_3), um potente ativador da AKT, em 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2). A partir dessa ação, a PTEN antagoniza a ação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e atua como um regulador negativo da ativação da AKT (Figura 1), a qual está relacionada principalmente com proliferação, crescimento e sobrevivência celular (MAEHAMA; DIXON, 1998; SUN et al., 1999).

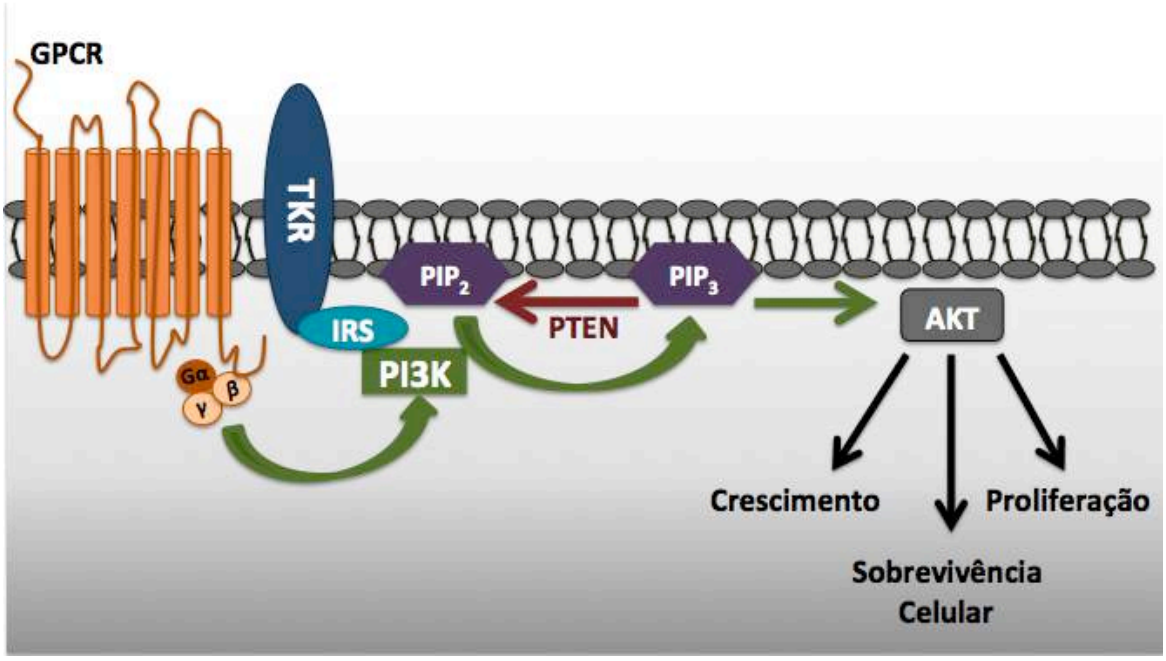


Figura 1. Regulação negativa da AKT pela PTEN. Por meio de sua ação fosfatase dependente de conversão de PIP_3 em PIP_2, a PTEN antagoniza a ação da PI3K e atua como um regulador negativo da via de ativação da AKT, a qual está relacionada com crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Fonte: Adaptado de Manning et al., 2017.

Em condições fisiológicas, a estimulação de receptores do tipo tirosina quinase (TKR) ou de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) resulta no recrutamento e na ativação da PI3K, que, por meio da fosforilação da PIP_2, produz o PIP_3 (MANNING; TOKER, 2017). Este, por sua vez, pode causar a ativação da AKT ou sofrer desfosforilação pela ação da PTEN, resultando, assim, na terminação do sinal (VANHAESEBROECK et al., 2010). No entanto, na ausência da PTEN, PIP_3 se

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

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

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

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

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

1.2 Klotho

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

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

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

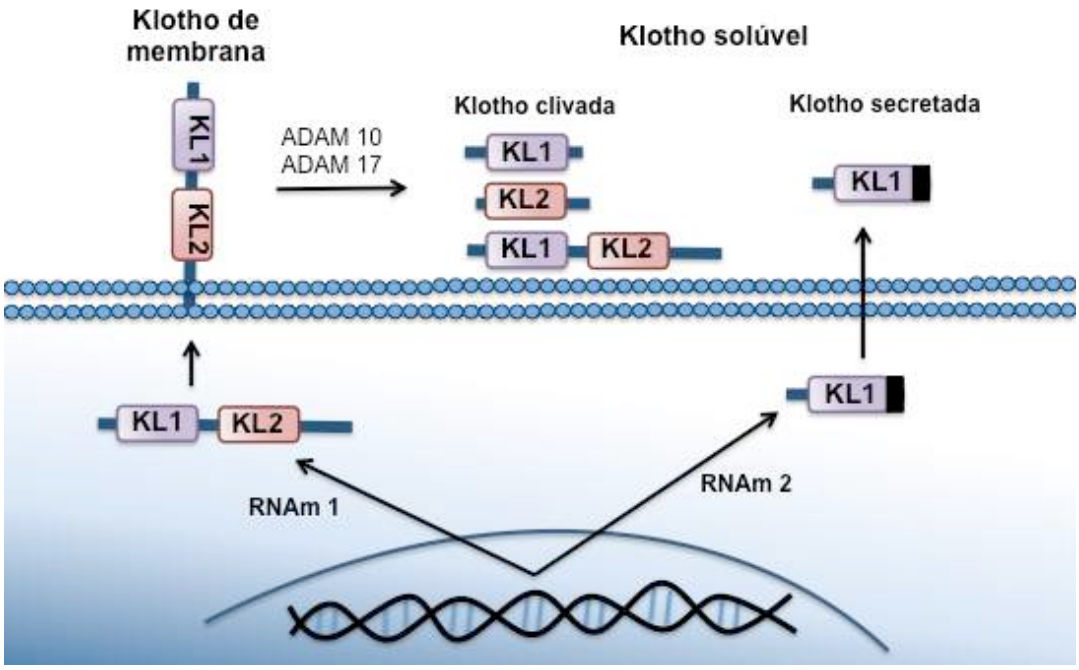


Figura 2. Isoformas da klotho. A proteína klotho pode ser encontrada tanto na forma de membrana quanto na forma solúvel, a qual pode ser decorrente da clivagem da klotho de membrana pelas ADAM 10 e 17 ou de um *splicing* alternativo do RNA mensageiro. Fonte: Adaptado de Cararo-Lopes *et al*., 2017.

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

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

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

1.3 Influência do Sexo

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A realização deste projeto teve como objetivo investigar o potencial terapêutico da Klotho na ausência da PTEN, bem como analisar a possível influência do sexo na expressão fisiológica de ambas as proteínas.

2.2 Objetivos Específicos

a) Analisar os efeitos da Klotho nas alterações morfológicas neuronais características da deleção da PTEN;

b) Caracterizar a influência do sexo sobre a expressão da proteína PTEN tanto em células neuronais embrionárias quanto em animais adultos;

c) Analisar a influência do sexo sobre a expressão da proteína Klotho;

d) Analisar o potencial terapêutico da klotho na atividade da Rab7 na ausência da proteína PTEN, bem como os possíveis mecanismos de ação, por meio do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular - Desenvolvido na *The Open University*, UK.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comissão de Ética

O projeto, registrado sob o protocolo nº 75/2016, passou por avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e foi declarado aprovado, uma vez que se encontra de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Sistema Cre-loxP e Obtenção dos Animais

Os camundongos da linhagem PTEN$^{loxp/+}$; Nse-Cre^{+} são animais nocautes condicionados por meio do sistema Cre-loxP (Figura 3). O funcionamento deste sistema requer a presença de dois componentes para que ocorra a deleção do gene de interesse, sendo eles a enzima *Cre recombinase* e os sítios loxP, uma sequência de 34 pares de base. A enzima Cre, que pode ter sua expressão modulada por um promotor tecido-específico, é responsável por reconhecer os sítios loxP e, dependendo da sua orientação, promover deleção, inversão ou translocação entre os cromossomos (NAGY, 2000). No caso dos animais utilizados, a Cre promove a deleção da região entre os sítios loxP e é guiada pelo promotor do gene da enolase específica de neurônio de rato (*Nse*), cuja expressão é mais significativa após o 5º dia pós-natal (MARANGOS et al., 1980).

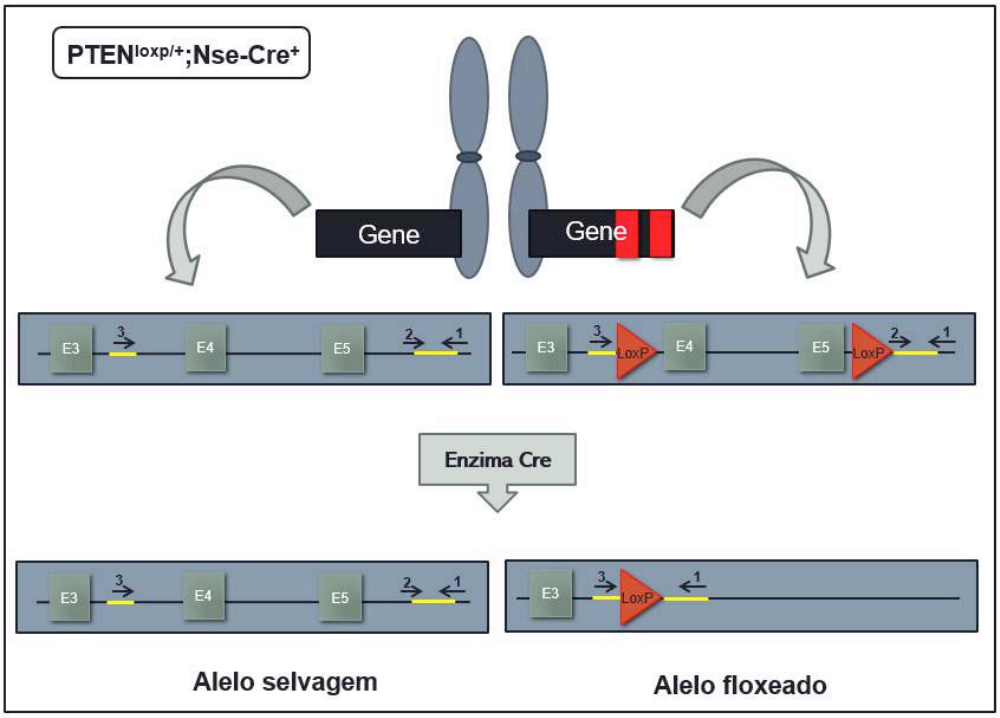


Figura 3. Esquema da recombinação da região floxeada pelos sítios loxP pela enzima *Cre recombinase*. A região de interesse do gene da PTEN, entre os éxons 4 e 5 (E4 e E5), pode encontrar-se ou não flanqueadas pelos sítios loxP, os quais são reconhecidos pela *Cre recombinase*. A ausência de sítios loxP (alelo selvagem) não permite que ocorra a recombinação. As setas indicam as regiões onde ocorrem anelação dos *primers* durante a genotipagem, permitindo a identificação da presença ou não de sítio loxP.

Os sítios loxP, por sua vez, podem estar presentes somente em um ou nos dois alelos, resultando, respectivamente, em uma deleção parcial ou total na

presença da enzima cre. Consequentemente, em casos de ausência da expressão da cre, a deleção não ocorrerá, caracterizando o animal *wild-type*.

- Linhagem PTEN$^{loxp/+}$; Nse-Cre^{+}

A linhagem PTEN$^{loxp/+}$; Nse-Cre^{+} é originada do cruzamento de animais *Pten*$^{loxp/loxp}$ (fundo genético da linhagem C57/BL6) com animais transgênicos *Nse-Cre*$^{+}$ (fundo genético nas linhagens C57/BL6 e SJL), obtidos na *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA). Tal linhagem 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, USA)* e acondicionada no Biotério de Camundongos do laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de no máximo 5 sob ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 7 – 19h) e temperatura ambiente mantida constante (22 ± 2ºC). Durante todo o período, foi mantido o fornecimento de água e ração *ad libitum.*

Para a realização desse estudo foram utilizados animais machos e fêmeas com fenótipo PTEN$^{+/+}$ (WT) com 2 meses de idade e embriões (E16.5) machos e fêmeas com fenótipos WT e PTEN$^{-/-}$ (HO). Para a obtenção dos embriões, animais heterozigotos PTEN$^{loxp/+}$; Cre^{+} foram colocados juntos para acasalamento no final do dia e separados no início da manhã seguinte, contabilizando 0,5 dia de uma possível gestação. Conforme mostrado na Figura 4, o acasalamento de animais heterozigotos permite a obtenção de embriões de todos os genótipos, incluindo os HOs, os quais foram utilizados para a realização da cultura primária neuronal embrionária do córtex.

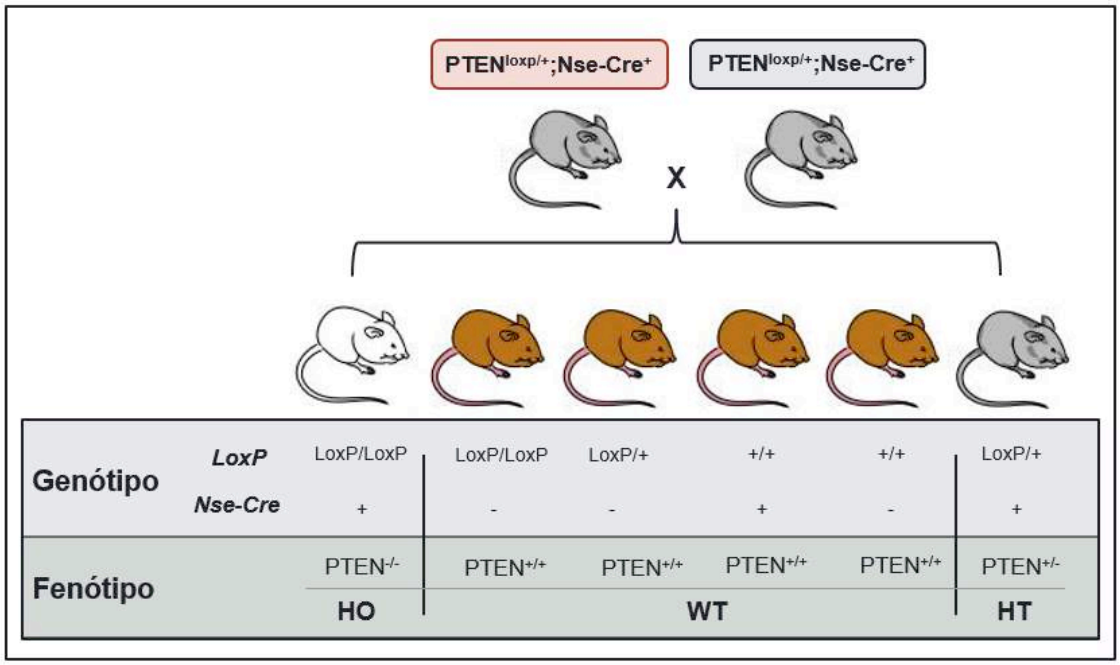


Figura 4. Esquema representativo do cruzamento entre animaisPTEN$^{loxp/+}$; Nse-Cre^{+}.Uma vez que o sistema de recombinação Cre-loxP é um sistema de deleção condicionada, a determinação do fenótipo (HT, WT ou HO) requer a análise conjunta dos componentes Cre e sítios loxP. Como pode ser observado, o cruzamento entre animais HT permite a possibilidade de obtenção de todos os genótipos.

3.3 Cultura Celular

3.3.1 Cultura Embrionária Primária Neuronal

Após adição de lamínulas nos poços, as placas de cultura foram pré-tratadas com polietilenoimina (PEI) 24 horas antes da realização da cultura e deixadas durante a noite na estufa. Após esse período, antes de iniciar o experimento, as placas foram lavadas 3x com H_2O estéril. Durante a dissecação e a retirada de meninges, o encéfalo foi mantido em solução HHGN (Solução de sais balanceada de Hanks, tamponada com HEPES 2,5 mM, acrescida de glicose 35 mM, bicarbonato de sódio 4 mM e 1% de penicilina e estreptomicina) e, posteriormente, foi transferido para falcon também com meio Hanks onde permaneceu, no gelo, até a dissecação de todos os embriões. Tendo em vista a diferença de sexo e os três diferentes genótipos possíveis, cada embrião teve suas regiões do córtex dissecadas e armazenadas em diferentes falcons e, consequentemente, todos os passos do protocolo da cultura foram realizados separadamente para cada um deles. Ao término da dissecação, retirou-se o meio Hanks e adicionou-se 1mL de solução 0,05 mg/mL de tripsina (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em cada falcon, os quais foram incubados por 20 minutos a 37°C. Em seguida, lavou-se 1x com meio MEM (Cultilab,

Campinas, SP, Brasil) acrescido de 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Após a lavagem, adicionou-se 1 mL do mesmo meio acrescido com 50 µL de DNAse I (Sigma-Aldrich St Louis MO, USA) para a trituração do tecido de forma delicada a fim de evitar ao máximo a formação de bolhas. Foi diluída uma alíquota do conteúdo do falcon em *Trypan Blue Stain* (Gibco - ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA,) e as células foram contadas na câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas na concentração de $1x10^5$ cel/mL e mantidas na estufa a 37°C, 5% CO_2. Após 3 horas, o meio foi substituído por meio Neurobasal (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) + 1% antibiótico + 0,5 mM glutamina acrescido de B27 (50 µL/mL) imediatamente antes do uso.

3.3.2 *Human Embryonic Kidney* (HEK293T)

Células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% penicilina/estreptomicina. A passagem das células foi realizada a cada dois dias ou quando as mesmas tivessem atingido 70-80% de confluência. Para a realização da passagem, o meio foi completamente removido e as células foram lavadas com HBSS antes da adição de tripsina. Células foram ressuspendidas em DMEM e passadas na diluição de 1:9 para outra garrafa ou, quando necessário, plaqueadas em placas pré-tratadas com Poli-D-Lisina *(PDL).*

3.4 Ensaios Bioquímicos

3.4.1 Reação de Cadeia em Polimerase (PCR)

- Extração do DNA e Genotipagem

A genotipagem foi realizada a partir da cauda dos animais seguindo o protocolo já bem estabelecido no laboratório, o qual se baseou nas recomendações do fornecedor dos animais Nse-Cre^+ (*The Jackson Laboratory*) e no protocolo existente no laboratório do Dr. Mark Mattson (*Laboratory of Neurosciences, National Institute on Aging, NIH, USA*) . A fim de extrair o DNA, foi realizada a digestão das caudas dos embriões com o tampão de extração (NaOH 25 mM, EDTA 0,2 mM) por 1 hora a 98ºC sob agitação de 500 rpm. Em seguida, após as amostras terem sido colocadas no gelo, adicionou-se a solução de Tris HCl 40 mM pH 5,5 e centrifugou-se as amostras a 1.500 rcf por 3 minutos. O sobrenadante foi recolhido e uma

alíquota foi utilizada para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no termociclador LightCycler480, Roche Diagnósticos.

- Reação em Cadeia da Polimerase

Cre-LoxP

Para a PCR, cada tubo de reação conteve 1 µL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores (10 µM) senso e anti-senso, 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) e 3 µL da amostra do DNA. As condições das reações para genotipagem da Cre e loxP, bem como a sequência dos oligonucleotídeos, estão descritas nas tabelas a seguir.

Tabela 1. Protocolo da PCR para identificação da enzima cre.

Reação PCR - Cre		
Oligonucleotídeos	*Forward*: 5´- AGG TGT AGA GAA GGC ACT TAG C – 3´ *Reverse*: 5´- CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG G – 3´	
Ciclo 1 (1x)	Etapa 1	95ºC por 2 minutos
Ciclo 2 (40x)	Etapa 1	95ºC por 30 segundos
	Etapa 2	55ºC por 30 segundos
	Etapa 3	72ºC por 45 segundos
Ciclo 3 (1x)	Etapa 1	72ºC por 10 minutos
Ciclo 4 (1x)	Etapa 1	4ºC por ∞

Tabela 2. Protocolo da PCR para identificação do sítio LoxP.

Reação PCR - loxP		
Oligonucleotídeos	*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´	
Ciclo 1 (1x)	Etapa 1	95ºC por 2 minutos
Ciclo 2 (40x)	Etapa 1	95ºC por 30 segundos
	Etapa 2	55ºC por 60 segundos
	Etapa 3	72ºC por 60 segundos
Ciclo 3 (1x)	Etapa 1	72ºC por 10 minutos
Ciclo 4 (1x)	Etapa 1	4ºC por ∞

SX

O protocolo de genotipagem do sexo baseou-se no descrito por McFarlane et al. (2013). Para a PCR, cada tubo de reação conteve 19 µL do *mix* (0,4 µL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores (10 µM) senso e anti-senso; 0,4 DNTP 10 mM; 2 µL 10x thermo pol buffer (0,89 µL $MgCl_2$ + 1,11 µL buffer $(NH_4)_2SO_4$); 0,2 µL Taq polymerase; 15,6 µL H_2O DEPC) e 1 µL da amostra do DNA. As condições da reação para genotipagem da sexagem, bem como a sequência dos oligonucleotídeos, estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 3. Protocolo da PCR para identificação do sexo do embrião de camundongo.

Reação PCR - SX		
Oligonucleotídeos	*Forward*: 5´-GAT GAT TTG AGT GGA AAT GTG AGG TA – 3´; *Reverse*: 5´-CTT ATG TTT ATA GGC ATG CAC CAT GTA – 3´	
Ciclo 1 (1x)	Etapa 1	95ºC por 3 minutos
Ciclo 2 (35x)	Etapa 1	95ºC por 15 segundos
	Etapa 2	55ºC por 30 segundos
	Etapa 3	72ºC por 40 segundos
Ciclo 3 (1x)	Etapa 1	72ºC por 5 minutos
Ciclo 4 (1x)	Etapa 1	12ºC por ∞

O produto obtido foi diluído em tampão de amostra (azul de bromofenol 420 µg/mL, glycerol 0,5%) e 2µL Gelred (#41003-0, Biotium, CA, USA), e separado por eletroforese em gel de agarose 1,8% a 100V por 40 minutos em tampão de corrida TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 0,11%, EDTA 1 mM). Para análise do gel foi utilizado o aparelho G-Box (Syngene/Synoptics, Cambridge, Inglaterra) (Figura 5).

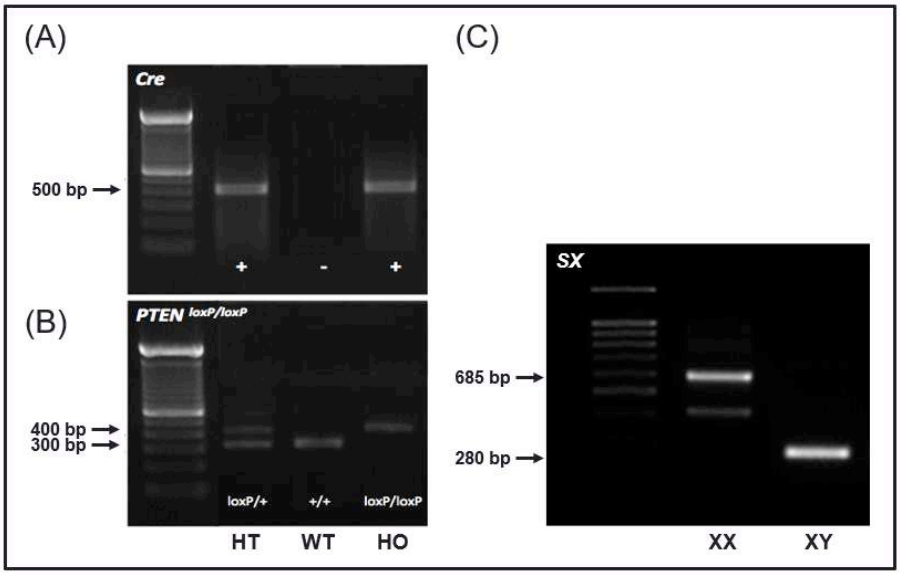


Figura 5. Imagens representativas das genotipagens. Tamanhos aproximados de pares de base (pb) das bandas representativas da (A) presença ou a ausência da enzima *Cre recombinase* (+ ou -); (B) presença de um, nenhum ou de dois alelos floxeados (loxP/$^{+}$, +/+ e loxP/loxP), respectivamente; e do (C) gene X ou Y, respectivamente.

3.4.2 Extração de Proteínas Citosólicas e Nucleares

O método utilizado baseou-se em trabalhos realizados anteriormente no nosso grupo (VASCONCELOS et al., 2014). Os tecidos do córtex foram homogeneizados em tampão de lise (HEPES pH 7.9 10 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; EGTA 1,0 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM; Leupeptina 2,5 µg/mL; Antipaína 2,5 µg/mL; B-GP 5mM) e fosfatases (Na_3VO_4 3 mM, Pirofosfato de Sódio 20 mM; NaF 30 mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 30 segundos a 4ºC, coletando-se o sobrenadante e armazenando-o a - 80ºC para possível ensaio da NOS. O *pellet* foi ressuspendido novamente em tampão de lise e deixado 10 minutos no gelo. Após esse período, adicionou-se NP-40 10% às amostras, as quais foram vortexadas rigorosamente por 30 segundos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 30 segundos a 4ºC e o sobrenadante foi coletado (extração citosólica). O *pellet* resultante foi ressuspendido em tampão de extração (HEPES pH 7.9 20 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; EDTA 0,25 mM; NaCl 300 mM; EGTA 300 mM; glicerol 25%; PMSF 0,5 mM; Leupeptina 2,5 µg/mL; Antipaína 2,5 µg/mL; NaF 30 mM; Na_3VO_4 3 mM; B-GP 5mM; Pirofosfato de Sódio 20 mM) e incubado 20 minutos em gelo antes de ser centrifugado à 12.000 xg por 20 min a 4ºC para coleta do sobrenadante (extrato nuclear). As concentrações de proteínas dos extratos citosólico e nuclear foram determinadas segundo o método descrito abaixo. As amostras foram armazenadas a -80ºC até o momento do uso no ensaio de *Western Blotting*.

3.4.3 Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A dosagem foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando reagente da Bio-Rad (Richmond, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595nm em um leitor de microplacas (Epoch, BioTek). A comparação com a curva padrão de albumina forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras coletadas do córtex.

3.4.4 Ensaio de *Western Blotting*

O ensaio de *Western Blotting* foi baseado no método proposto por Laemmli (1970). Após a determinação da concentração de proteínas nas amostras, como descrito anteriormente, as proteínas foram ajustadas na concentração de 2,0 µg/µL com o tampão de amostra (125 mM tTris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 200 mM

de DTT; 0,02% de azul de bromofenol; pH 6,8) e, em seguida, foram fervidas por 5 minutos a 95° C. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida 10% [acrilamida/bisacrilamida (5:1), 10% SDS] para a separação das proteínas contidas na amostra. Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida constituído por 25 mM de Tris-base; 192 mM de glicina; 0,1% de SDS, correndo por 2 horas a 90V. Ao final desse processo, as proteínas separadas e contidas no gel foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Para a transferência utilizou-se um tampão contendo 25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol. Após a transferência e bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico para PTEN (1:1000, Cell Signaling Technology, #138G6), AKT (1:1000, Cell SignallingTechnology, #4685), pAKT^{T308} (1:1000, Cell Signaling Technology, #24469) em TTBS (Tris-base 100 mM, NaCl 0,9 %, Tween 20 0,05%) durante a noite a 4ºC. Após incubação, as membranas foram lavadas 5x por 5 minutos com TTBS e incubadas com o respectivo anticorpo secundário por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo específico para β-actina a qual foi utilizada como controle interno do ensaio. A revelação foi feita por meio do kit de quimioluminescência ECL-Amersham (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA).

3.4.5 ELISA

Para a quantificação das proteínas Klotho, utilizou-se um kit de ELISA (#OKEH01597, Aviva Systems Biology, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Antes do início dos experimentos, os padrões de Klotho para o kit foram preparados nas concentrações finais de 1 000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL, 15,6 pg/mL e 0.0 (branco). Após preparação,100 µL de cada padrão, amostra ou branco foram adicionadas em duplicata na microplaca e incubada por 2 horas a 37°C. Ao término do período de incubação, todo líquido foi descartado e adicionou-se 100 µL do detector do anticorpo 1X *Biotinylated KL* em cada poço utilizado, incubando a microplaca a 37°C por 1 hora. Descartou-se novamente todo o conteúdo líquido e lavou-se 3 x por 1 minuto. Ao final desse processo, foi adicionado 100 µL do conjugado 1X *Avidin-HRP* em cada poço e incubado a 37°C por 1 hora. Após lavagem, adicionou-se 90 µL do substrato em

cada poço e incubou, no escuro, a 37°C por 15 minutos. Passado esse período, foi adicionado 50 µL da solução de parada e realizada a leitura da microplaca a 450 nm.

3.5 Técnica de Microscopia

3.5.1 Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi adaptado do protocolo descrito por Glynn e Mcallister (2006). Após cultivo em lamínulas (1,0 x 10^5 células por lamínula circular de 13 mm de diâmetro), o meio foi retirado e as células foram lavadas 2x em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM e água destilada) gelado e fixadas com metanol 100% por 20 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram novamente lavadas em PBS e incubadas com soro de bloqueio (PBS + 0,05% Triton X-100 + 5% de soro normal de burro) por 1 hora à temperatura ambiente. Passado esse período, o excesso de soro de bloqueio foi retirado e as células foram incubadas durante a noite com anticorpo primário (diluído em solução de bloqueio) para GFAP (1:1000, Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA), Pan-Neuronal (1:1000, Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA), PTEN (1:200, Cell Signaling Technology, #138G6), $pAKT^{T308}$ (1:100, Cell Signaling Technology, #24469). No dia seguinte, as células foram lavadas 3x por 10 minutos com soro de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário (PBS + 0,05% Triton X-100 + anticorpo secundário) por 2 horas à temperatura ambiente protegido de luz. Em seguida, as células foram lavadas 2x com PBS por 10 minutos e, então, incubadas com solução de DAPI (1:50.000) por 15 minutos. Antes da selagem das lamínulas na lâmina, as células foram novamente lavadas 2x com PBS por 10 minutos.

As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA), máquina Nikon Digital Camera DXM 1200C (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA) e o software de imagem NIS-Elements Advanced Research 2,30 2006 (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA). Foram capturadas 4 campos representativos de cada lamínula, todos em objetiva de 20X, em cada filtro de interesse.

3.6 Técnica de Biologia Molecular

3.6.1 Plasmídeo de RNA de interferência da PTEN

Plasmídeo de RNA de interferência da PTEN foi adquirido da Addgene (#25638). Após transformação bacteriana e preparação do estoque de glicerol, o plasmídeo foi utilizado na técnica de transfecção.

3.6.2 Transformação Bacteriana

Para a transformação bacteriana, processo pelo qual DNA externo é introduzido na bactéria, 100 µL de células competentes foram colocadas com 10 µL do plasmídeo de interesse em um tubo de centrifugação. O processo de transformação foi realizado por meio do choque térmico, no qual o tubo foi colocado por 10 minutos no gelo, 45 segundos em água à 42ºC e 2 minutos em gelo novamente. Antes da centrifugação, adicionou-se meio LB (Luria-Bertani) sem antibiótico. Para a etapa de recuperação, a bactéria permaneceu por 45 minutos sob agitação à 37ºC. Após esse período, a bactéria foi plaqueada em placa ágar com LB e incubada durante a noite à 37ºC para crescimento. No dia seguinte, colônias foram coletadas e cultivadas durante a noite para posterior realização de *miniprep* e sequenciamento, a fim de identificar a colônia que apresentava a melhor inserção dos oligonucleotídeos. Após identificação, foi preparado estoque de glicerol e armazenado a - 80ºC.

3.6.3 Purificação dos Plasmídeos

A partir do estoque de glicerol, a bactéria foi coletada e colocada em tubo com meio LB e ampicilina na incubadora sob agitação a 37ºC durante a noite para crescimento. Após esse período, utilizou-se o kit de miniprep QIAprep (QIAGEN), o qual baseia-se na lise alcalina das células bacterianas seguida de absorção do DNA em sílica na presença de alta concentração salina, para a obtenção do DNA plasmidial. A concentração final do DNA purificado foi quantificada utilizando um Nanodrop.

3.6.4 Transfecção

Para a transfecção, 300 x 10^3 células foram plaqueadas em placas de 12 poços no dia anterior ao experimento. A transfecção foi realizada utilizando o

reagente de transfecção *GeneJuice* (Novagen®) de acordo com as instruções do fabricante. Assim, preparou-se uma solução contendo 310 µL de meio DMEM (sem SFB) e 9,5 µL de *GeneJuice*, da qual 100 µL foram adicionados a 0.5 µg dos respectivos plasmídeos de interesse. Após homogeneização, a solução permaneceu em repouso durante 15 minutos a temperatura ambiente e, por fim, os 100 µL da mistura foram adicionados nas células, as quais seguiram para a incubadora.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos dos ensaios de imunofluorescência, *Western Blotting* e transfecção foram analisados quantitativamente por meio do programa ImageJ (*National Institutes of Health*, EUA). Os resultados provenientes da análise *in vitro* da expressão da PTEN, bem como os do tratamento com a Klotho, receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey. Os demais resultados, tais como $pAKT^{T308}$ por imunofluorescência, *Western Blotting*, Klotho e dos efeitos do RNAi na Rab7, foram avaliados pelo test t de Student. As diferenças foram consideradas significativas para o valor $p < 0,05$. A análise estatística e a plotagem dos gráficos foram realizadas por meio do *software* Graphpad Prism 8.0. Todos os gráficos foram representados como a média dos valores ± o erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Validação in vitro do Modelo Animal de Deleção Condicionada da PTEN pelo Sistema Cre-LoxP

4.1.1 Análise de Pureza da Cultura Primária Embrionária Neuronal

Com o objetivo de buscar um possível tratamento para as alterações morfológicas neuronais causadas pela deleção da PTEN, bem como investigar a existência de possíveis diferenças frente ao sexo, realizou-se análise em cultura primária embrionária neuronal de animais WT e HO machos e fêmeas. A utilização dos embriões, além de resultar em uma cultura neuronal de melhor qualidade, também possibilita a obtenção de animais homozigotos, os quais possuem uma sobrevida limitada, permitindo uma observação mais nítida da alteração morfológica a ser analisada.

Para tanto, antes de iniciar a etapa de tratamento, etapas de padronização foram realizadas com o objetivo de analisar a pureza da cultura celular e o tempo *in vitro* necessário para que ocorra a expressão da enzima cre recombinase e consequentemente a deleção da PTEN, a fim de escolher o melhor tempo *in vitro* para se trabalhar com as células. É importante ressaltar que tal etapa é de extrema importância, visto a necessidade da obtenção de células em que já tenham ocorrido a deleção da PTEN, validando esse modelo de deleção condicionada *in vitro*, e que já apresentem as alterações morfológicas características.

- *Pureza da cultura celular*

Para a análise da pureza da cultura celular foi realizada a quantificação de células não neuronais presentes na cultura. Para tal, após 7 dias *in vitro,* foi realizada a técnica de imunofluorescência com marcação para neurônio (*Pan-Neuronal Marker*) e núcleo celular (DAPI) (Figura 6).

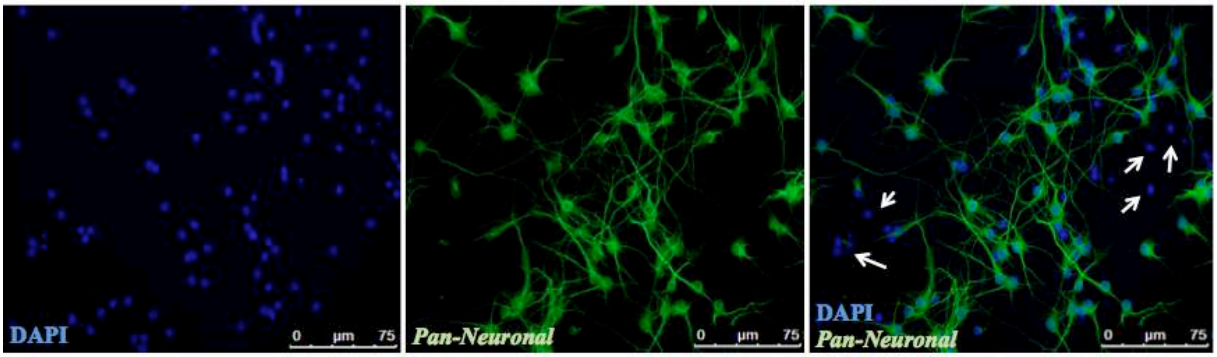


Figura 6. Imagem representativa da análise da pureza da cultura primária embrionária neuronal. Imagem representativa da composição de culturas celulares, as quais apresentaram, em média, cerca de 90% de células neuronais em sua composição. Setas indicam a presença de outro tipo celular, uma vez que houve marcação de núcleo celular (DAPI) sem a co-localização com marcação neuronal (*Pan-Neuronal*). Fotos em aumento de 20x.

Após quantificação, foi possível observar que aproximadamente 90% das células presentes eram neurônios, como pode ser observado na imagem representativa mostrada anteriormente. Dada a importância da comunicação intercelular, uma baixa porcentagem de células não neuronais já era esperada mesmo em uma cultura neuronal.

4.1.2 Análise Temporal de Expressão da Enzima Cre recombinase

Camundongos geneticamente modificados da linhagem td*Tomato*+, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Donato Júnior (Departamento de Fisiologia

do ICB/USP), foram utilizados para análise do perfil de expressão da enzima Cre recombinase. Por apresentarem um gene repressor, o qual encontra-se floxeado pelos sítios loxP, a expressão do gene repórter *tdTomato* fica impedida. No entanto, em presença da enzima Cre, ocorre o reconhecimento dos sítios e a consequente deleção do repressor, permitindo a expressão da proteína fluorescente *tdTomato* (Figura 7).

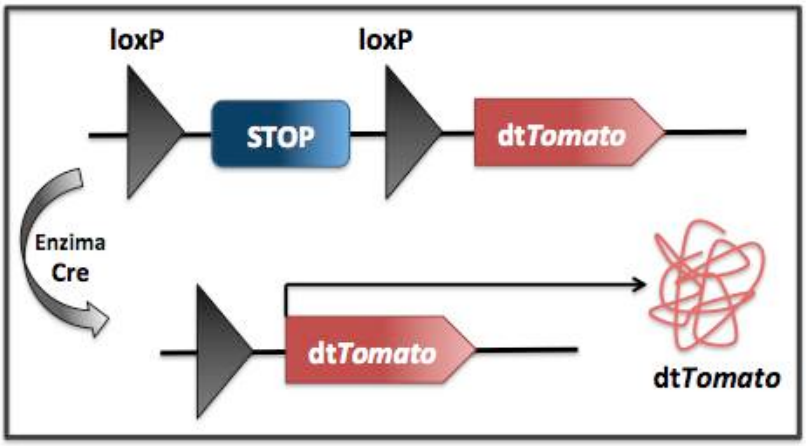


Figura 7. Esquema da recombinação da região flanqueada em animais da linhagem *tdTomato*$^{+}$. Na ausência da enzima Cre, a expressão do gene repórter *tdTomato* permanece inibida devido a presença do gene repressor, o qual se encontra floxeado pelos sítios loxP. No entanto, quando há o reconhecimento dos sítios loxP pela enzima cre, ocorre a deleção da região do gene repressor, o que permite a transcrição do gene tdTomato e conseqüente observação da fluorescência vermelha nas células.

A fim de analisar o tempo para início da expressão da enzima Cre *in vitro*, foi realizada uma cultura primária neuronal do córtex de embriões (E16,5) oriundos do acasalamento entre as linhagens *tdTomato*$^{loxP/loxP}$ e *Pten*$^{+/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$. O desenvolvimento das células foi acompanhado nos dias seguintes à realização da cultura e pôde-se observar o início da emissão da fluorescência vermelha pela proteína *tdTomato* a partir do terceiro dia *in vitro* (Figura 8), indicando o início da expressão da enzima cre.

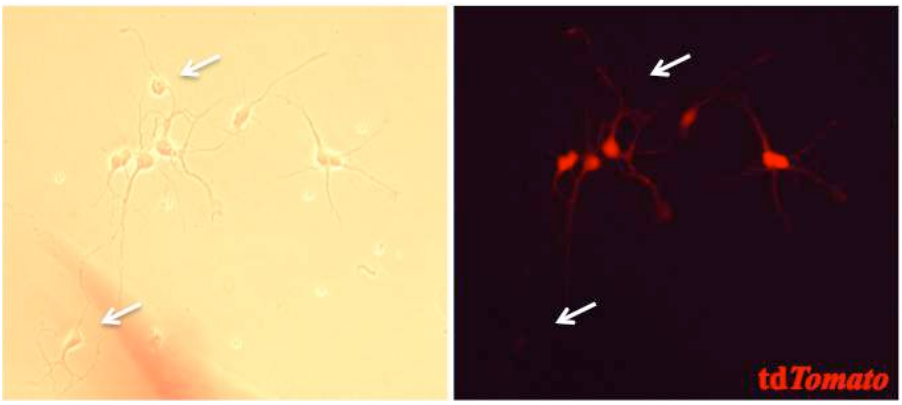


Figure 8. Análise do tempo para início da expressão da enzima Cre *in vitro*. Expressão da proteína fluorescente *tdTomato* observada a partir do terceiro dia *in vitro* em cultura primária neuronal embrionária do córtex, indicando o início da expressão da enzima Cre. Algumas células não expressaram a enzima (seta), o que pode indicar que a expressão ocorre em diferentes tempos ou que não ocorre em todos as células. Fotos em aumento de 20x.

Tendo em vista que a cre é guiada pelo promotor da enolase na linhagem PTEN$^{loxP/+}$; Nse-Cre^{+}, após quinze dias, as células foram fixadas e marcadas com *Pan-Neuronal* a fim de identificar o tipo celular em que se ocorreu a expressão da enzima cre (Figura 9).

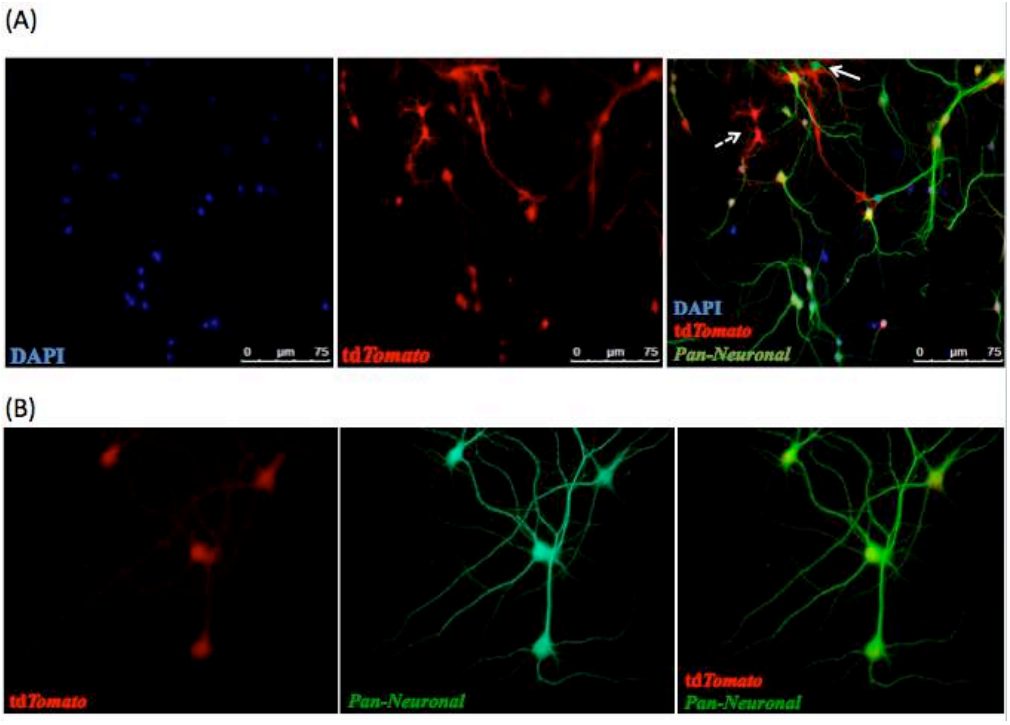


Figura 9. Expressão da enzima Cre recombinase. (A) Marcação de núcleo celular com DAPI (1:50000), expressão do gene *repórter tdTomato* e *Merge* de DAPI, *tdTomato* e *Pan-Neuronal*, mostrando que a expressão da enzima ocorre majoritariamente, mas não exclusivamente, em células neuronais. Embora em menores quantidades, é possível observar a presença de um neurônio que não expressou a enzima (seta contínua) e a expressão da Cre em células não neuronais (seta tracejada). Fotos em aumento de 20x. (B) expressão da enzima Cre ao longo de toda a célula neuronal. Fotos em aumento de 40x.

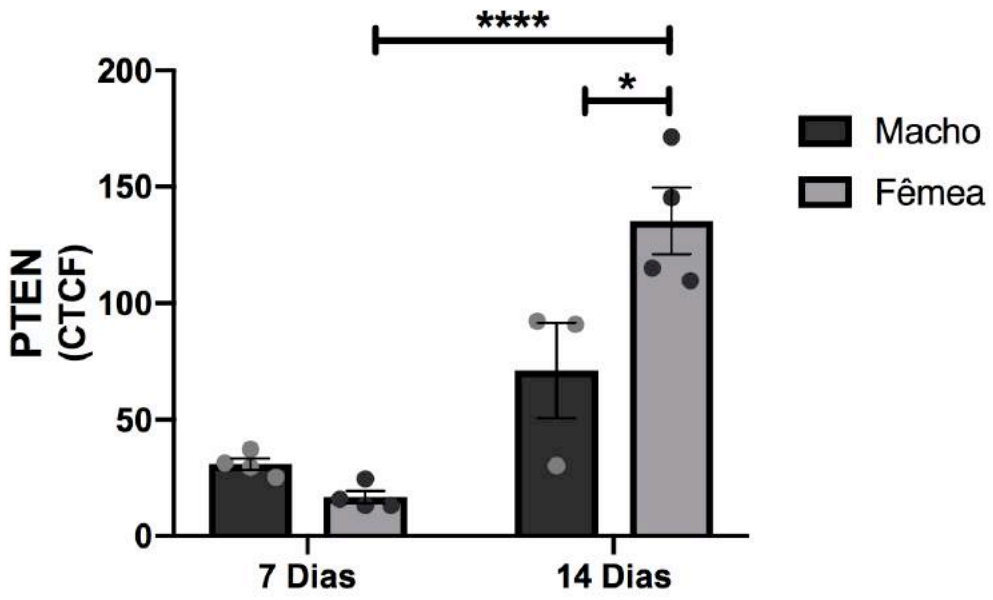
Assim, a partir da análise dos resultados, é importante ressaltar que, apesar de também ter ocorrido em outros tipos celulares, a deleção ocorre majoritariamente em células neuronais, como era de se esperar.

4.1.3 Análise Temporal do Perfil de Expressão da Proteína PTEN

Tendo em vista que o início da deleção da PTEN depende das expressões da enzima cre, a qual foi demonstrada iniciar-se após o 3º dia *in vitro,* e a da enolase, utilizado como guia neuronal, buscou-se padronizar quantos dias eram necessários para que houvesse uma redução significativa nos níveis de PTEN em relação ao genótipo. Além disso, também foi considerada relevante a análise de uma possível influência do sexo no perfil de expressão da proteína PTEN em células embrionárias, uma vez que eram utilizados embriões de ambos os sexos.

Assim, primeiramente analisou-se culturas neuronais a partir de embriões (E16,5) WT machos e fêmeas dos animais da linhagem *Pten*$^{loxP/+}$*;Nse-Cre*$^{+}$ *.* Após 7 e 14 dias, as células foram fixadas para a técnica de imunofluorescência, na qual foi realizada a marcação com o anticorpo para a PTEN (anti-PTEN 1:250). As imagens foram analisadas e quantificadas utilizando o programa *ImageJ* e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 10.

(A)



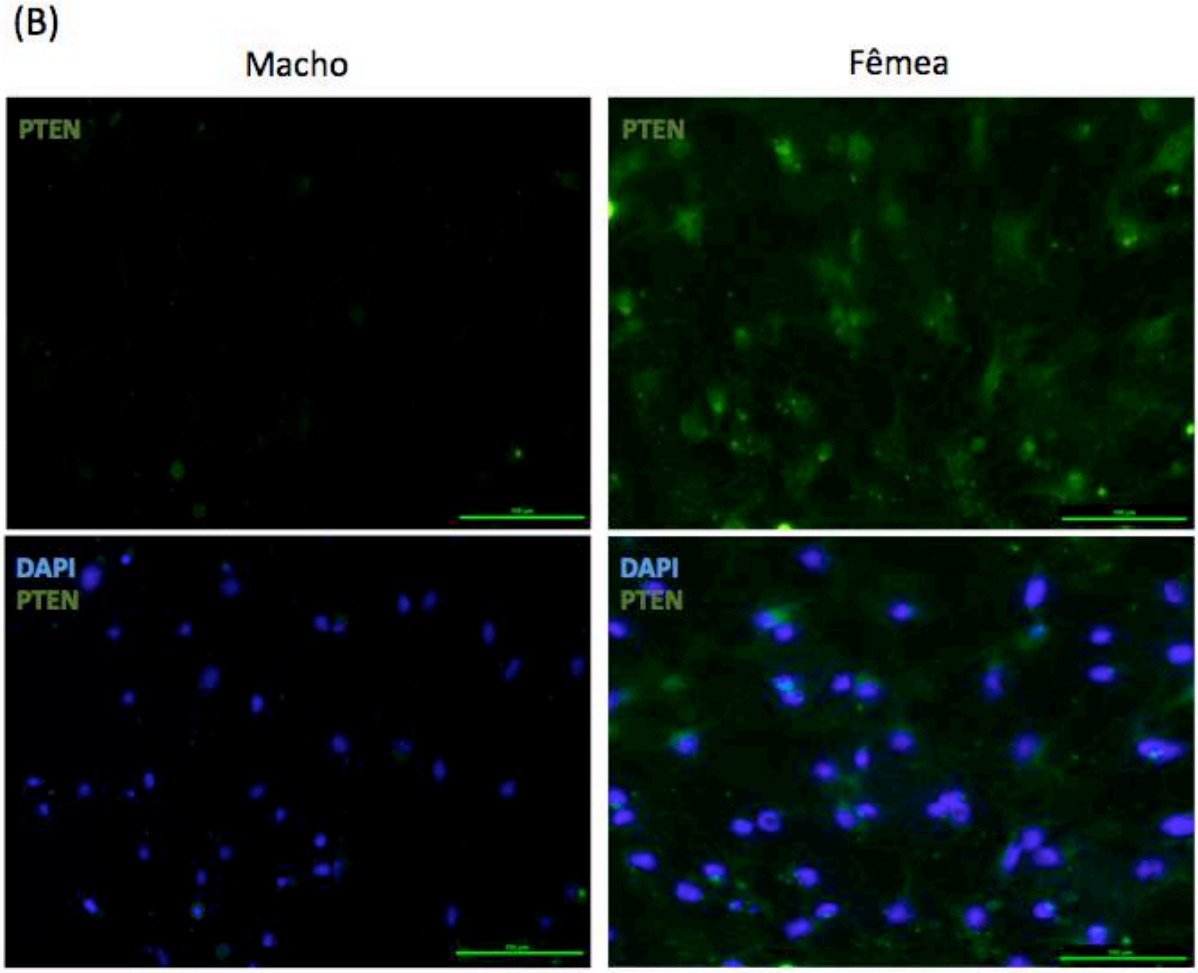
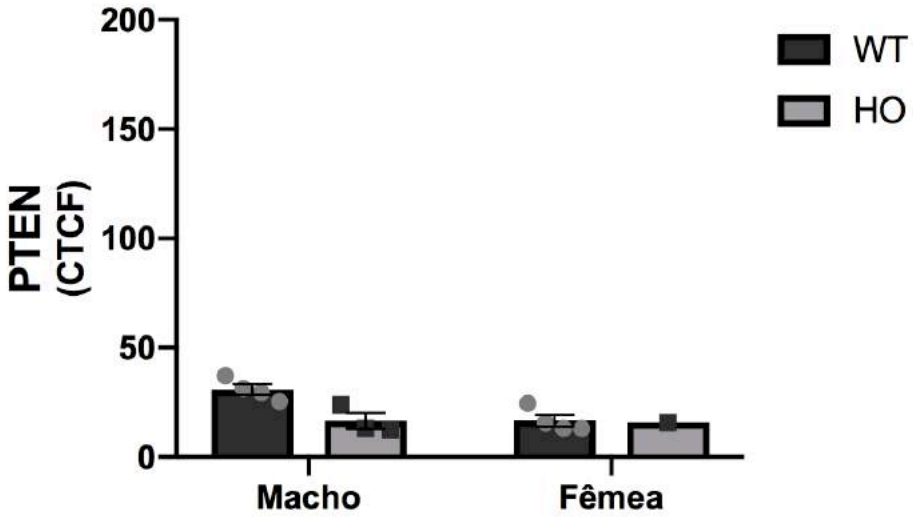


Figura 10. Avaliação da influência do sexo na expressão da PTEN em relação ao tempo. (A) Quantificação da análise temporal de expressão da proteína PTEN em células neuronais dos animais WT machos e fêmeas após 7 e 14 dias *in vitro*. Análise por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste Tukey. *p< 0,05 e ****p≤ 0,0001. Valores apresentados como a média dos valores ± o erro padrão da média. DIV7: n = 4 (macho e fêmea); DIV14: n = 3 (macho) e n = 4 (fêmea). (B) Imagem representativa de células neuronais embrionárias provenientes de embrião WT macho (esquerda) e fêmea (direita) após 14 dias *in vitro*. Escala = 100 µm.

Como pode ser observado em relação às células provenientes dos animais WT, após 7 dias *in vitro,* machos apresentaram uma pequena tendência em expressar uma maior quantidade de PTEN quando comparados com as fêmeas do mesmo período. No entanto, após 14 dias *in vitro*, as células das fêmeas WT apresentaram um significativo aumento no níveis de expressão da proteína PTEN, fazendo com que essas apresentassem uma expressão significativamente maior do que as dos machos do mesmo período.

Em seguida, analisou-se células WT e HO, de ambos os sexos, após 7 e 14 dias *in vitro* a fim de identificar o período com diferença significativa na expressão da PTEN em relação ao genótipo (Figura 11).

(A)



(B)

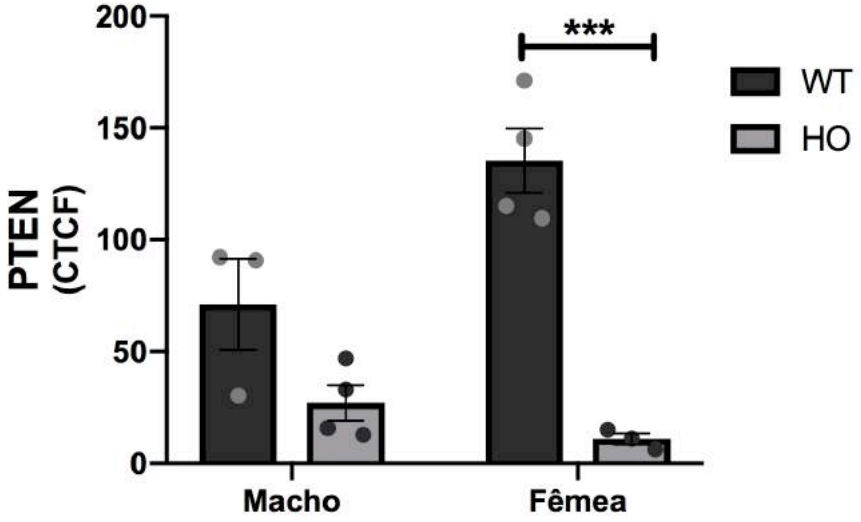


Figura 11. Avaliação da influência do sexo na expressão da PTEN em relação ao genótipo. Expressão da PTEN nas células neuronais dos animais machos e fêmeas, tanto WT quanto HO, após (A) 7 e (B) 14 dias *in vitro* (DIV). Não foi possível realizar análise estatística dos dados referente ao DIV7. Para DIV14, a análise foi realizada por meio da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste Tukey. *** $p \leq 0{,}001$. Valores apresentados como a média dos valores ± o erro padrão da média. DIV7: n = 4 (WT macho e HO macho), n = 4(WT fêmea) e n = 1 (HO fêmea); DIV14: n = 3 (WT macho), n = 4 (HO macho), n = 4 (WT fêmea) e n = 3 (HO fêmea).

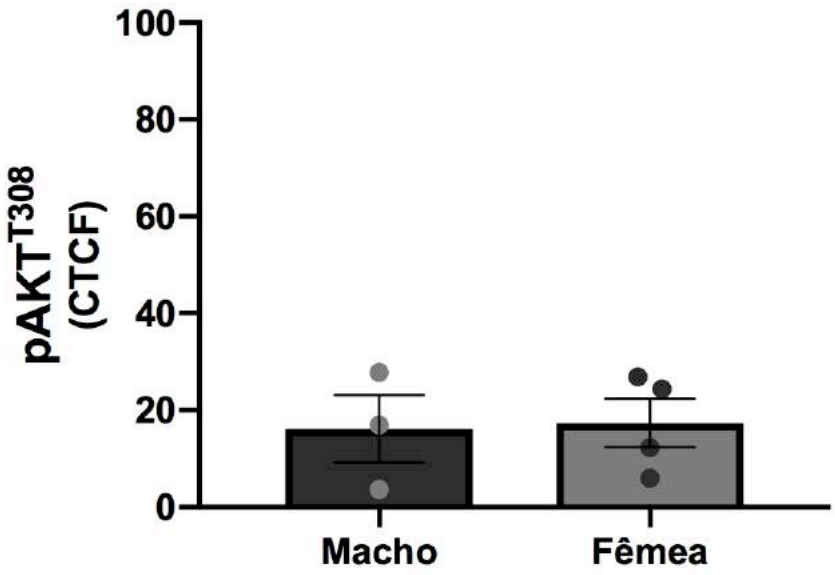
A partir dos resultados obtidos foi observado que, após 7 dias *in vitro,* ainda parece não haver diferença entre as expressões de PTEN, tanto em relação ao genótipo quanto ao sexo. Entretanto, ainda há a necessidade de um aumento do número amostral a fim de que se possa realizar análise estatística e obter informações mais precisas. Por outro lado, após 14 dias *in vitro*, além da diferença

citada anteriormente encontrada em relação ao sexo nas células dos animais WT (Figura 10), também pôde-se observar uma redução significativa na expressão da PTEN nas células das fêmeas HO em relação ao WT do mesmo sexo. Em relação às células neuronais provenientes dos machos, embora possa ser observada uma tendência, não foi possível observar uma diferença significativa em relação ao genótipo, o que talvez possa ser decorrente da grande variabilidade encontrada.

4.1.4 Análise da Fosforilação da AKT

Uma vez que a ativação da AKT é regulada negativamente pela PTEN, buscou-se analisar em ambos os sexos o perfil de fosforilação do resíduo T308 da AKT ($pAKT^{T308}$), onde já foi demonstrado haver ação da PTEN por outro trabalho do grupo (CABRAL-COSTA et al., 2018). Para isso, após 14 dias *in vitro,* foi realizado imunofluorescência em células neuronais provenientes de embriões WT machos e fêmeas com marcação para $pAKT^{T308}$ (Figura 12).

(A)



(B)

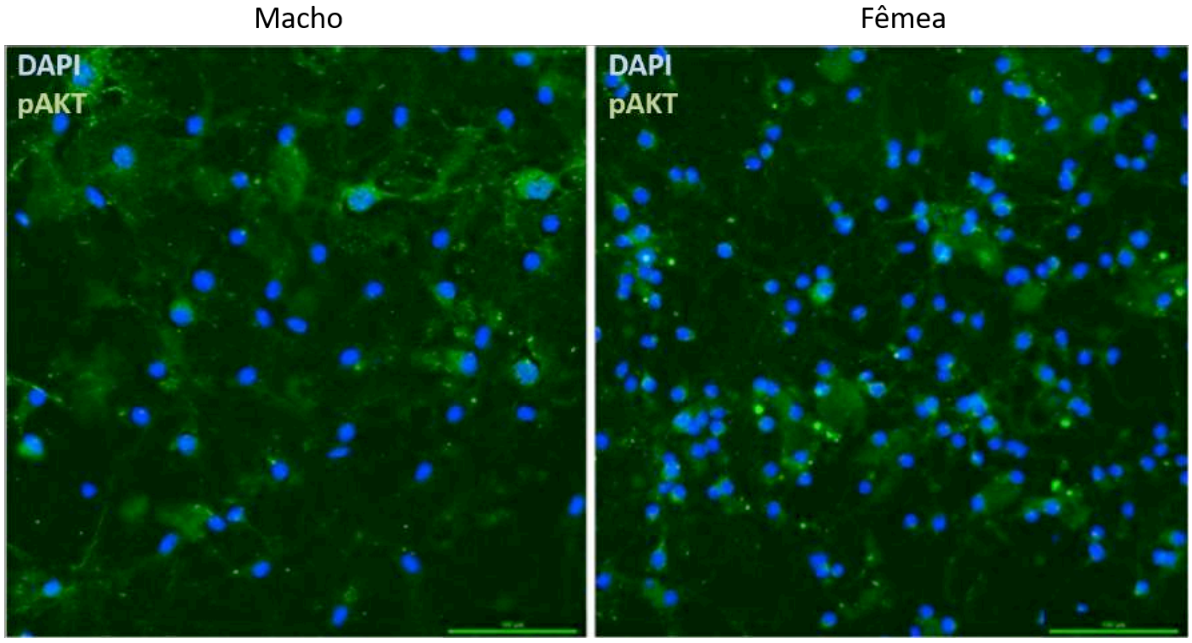


Figura 12. Análise da expressão da pAKT^{T308} em relação sexo. (A) Quantificação e (B) imagem representativa da expressão da pAKT^{T308} nas células neuronais dos embriões WT machos (esquerda) e fêmeas (direita) após 14 dias *in vitro*. Análise por teste t de Student. Não houve diferença estatística. Valores apresentados como a média dos valores ± o erro padrão da média. n = 3 (macho) e n = 4 (fêmea). Escala = 100 µm.

Curiosamente, não foi observada diferença em pAKT^{T308} entre as células neuronais dos embriões WT machos e fêmeas, mesmo com a variação encontrada na expressão da PTEN em relação ao sexo.

4.1.5 Análise da Morfologia Neuronal

Como mencionado anteriormente, a ausência da proteína PTEN resulta em alterações na morfologia neuronal, como, por exemplo, aumento da soma celular e aumento do calibre e do número de ramificações. Dessa forma, tendo em vista o interesse pela busca de um tratamento, a etapa inicial de padronização também teve como objetivo a identificação do tempo *in vitro* necessário para que se pudesse observar tais alterações em função da deleção da proteína PTEN. Para tanto, células foram fixadas e marcadas com *Pan-Neuronal* a fim de se observar a morfologia do neurônio (Figura 13).

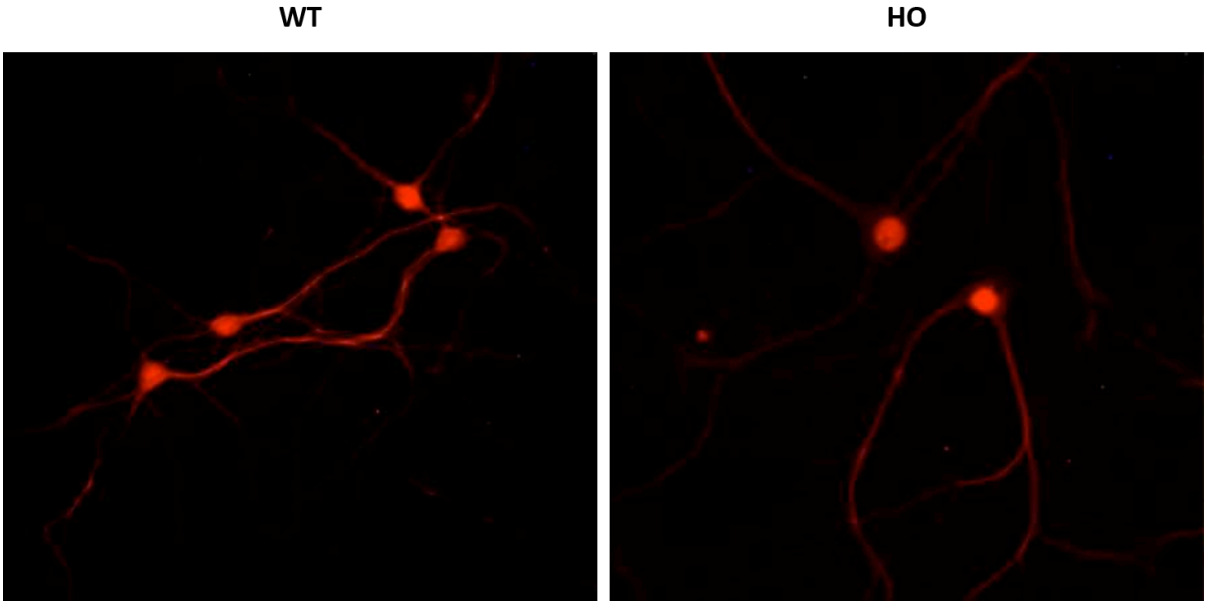


Figura 13. Imagem representativa da morfologia neuronal. Marcação neuronal com anticorpo *Pan-Neuronal* (1:1000) de células provenientes de embriões WT (esquerda) e HO (direita) após 14 dias *in vitro*. Aumento de 20x.

Após análise temporal foi possível concluir que, nas células embrionárias provenientes do modelo animal utilizado neste trabalho, as alterações descritas na literatura são observadas após 14 dias *in vitro*, corroborando com a análise temporal de expressão da PTEN, a qual demonstrou ser significativamente reduzida também após esse período (Figura 11B). Embora ainda não foi possível realizar uma análise comparativa da morfologia em relação ao sexo, devido ao grande número de grupos e a dificuldade de obtenção dos animais HO, tais dados validam e padronizam um modelo de estudo para as alterações morfológicas neuronais características da deleção da PTEN *in vitro*.

4.2 Influência do Sexo na via de sinalização da PTEN-PI3K-AKT em animais adultos

Paralelamente, a fim de continuar investigando a influência do sexo na expressão da PTEN ao longo do tempo, córtex de animais *wild-type* machos e fêmeas de dois meses de idade foram utilizados para análise da expressão da proteína por meio da técnica de *western blotting* (Figura 14).

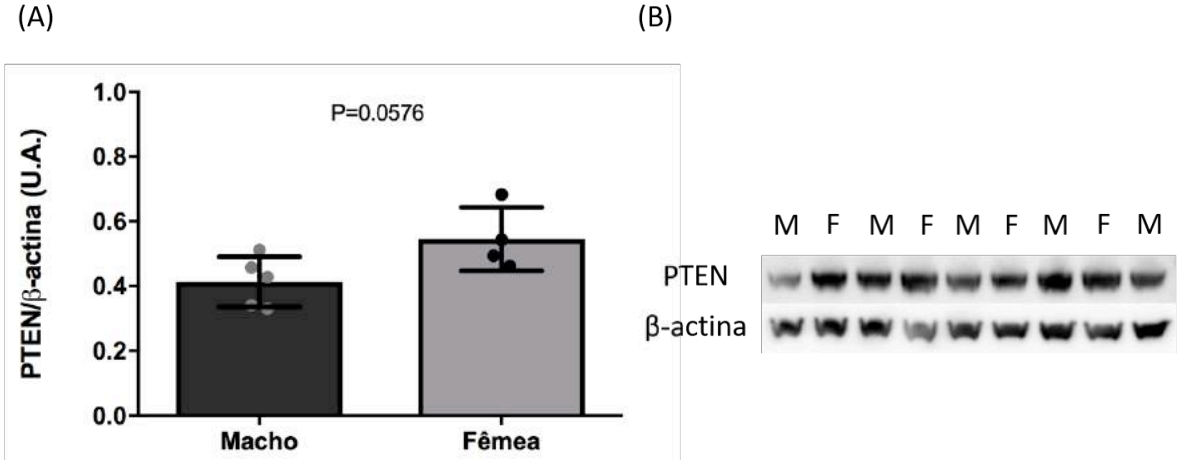


Figura 14. Influência do sexo na expressão da proteína PTEN em animais WT adultos. (A) Representação gráfica dos níveis de expressão da PTEN em animais WT machos e fêmeas condicionados da PTEN. (B) Representação das bandas referentes à PTEN e à β-actina dos animais machos (M) e fêmeas (F). Análise por teste t de Student. P=0.0576. Valores apresentados como a média dos valores ± o erro padrão da média. N=5 (macho) e N=4 (fêmea).

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

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

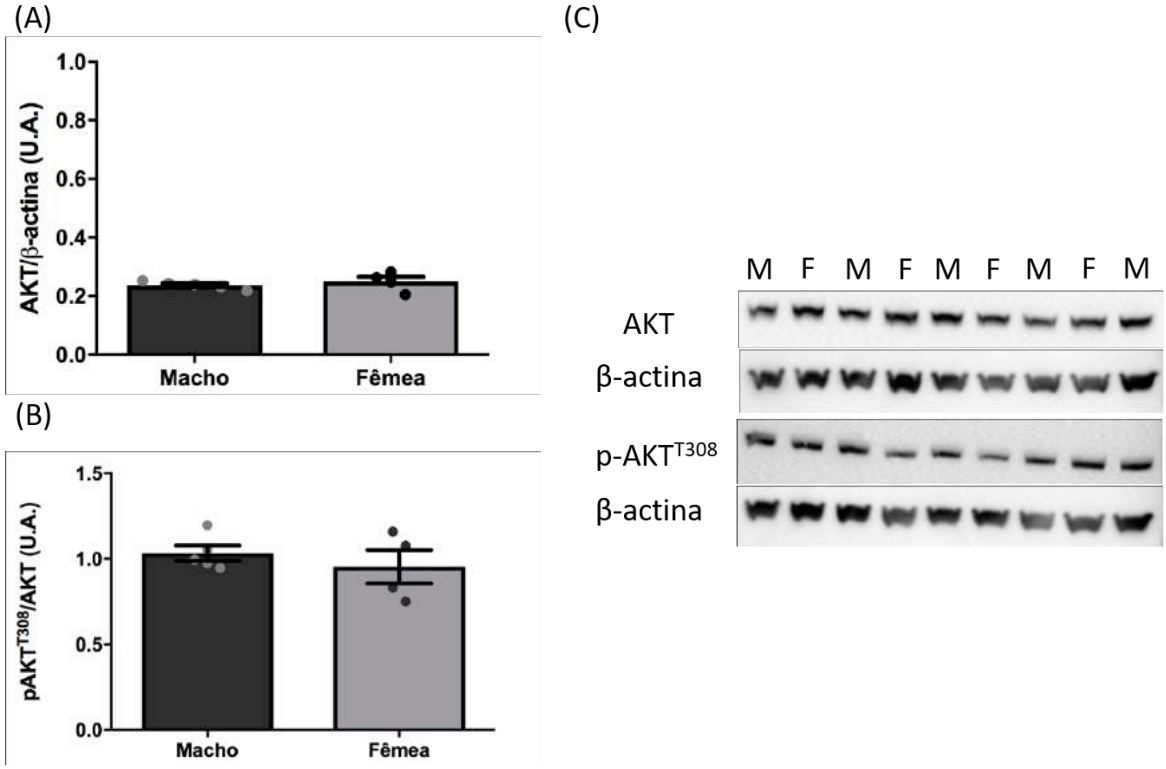


Figura 15. Análise de expressão da AKT e da pAKT^{T308} em relação ao sexo. Quantificação da expressão da (A) AKT total e da (B) pAKT^{T308} em animais WT machos e fêmeas condicionados da PTEN. (C) Imagens representativas das bandas. Análise por teste t de Student. Não houve diferença estatística. Valores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

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

4.3 Influência do Sexo na Expressão da Proteína Klotho

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

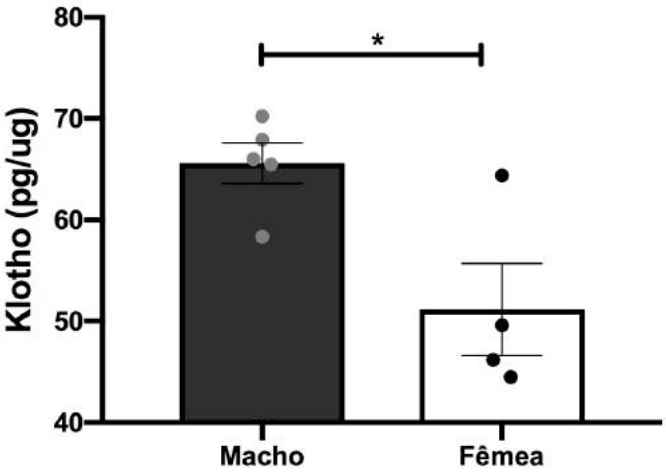


Figura 16. Análise da expressão da proteína Klotho em relação ao sexo. Quantificação da expressão da Klotho em animais adultos WT machos e fêmeas condicionados da PTEN. Análise por teste t de Student. *p < 0,05. Valores apresentados como a média dos valores ± o erro padrão da média. n =5 (macho) e n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

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

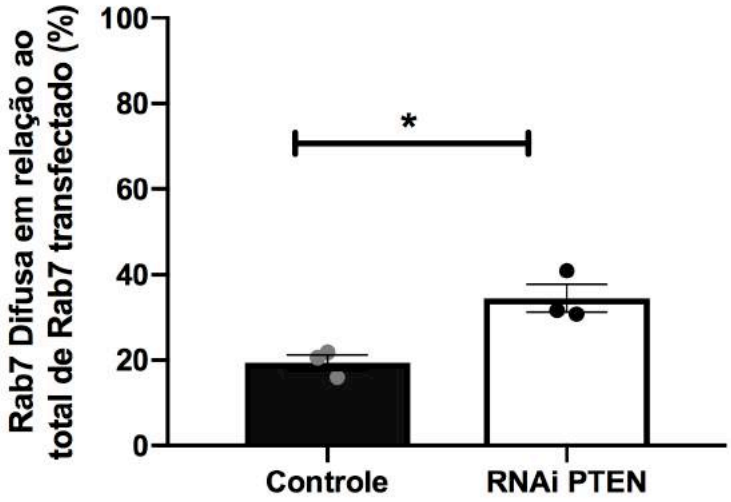
4.4 PTEN e Klotho

4.4.1 Klotho como um possível substituto para a ausência de PTEN

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

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

(A)



(B)

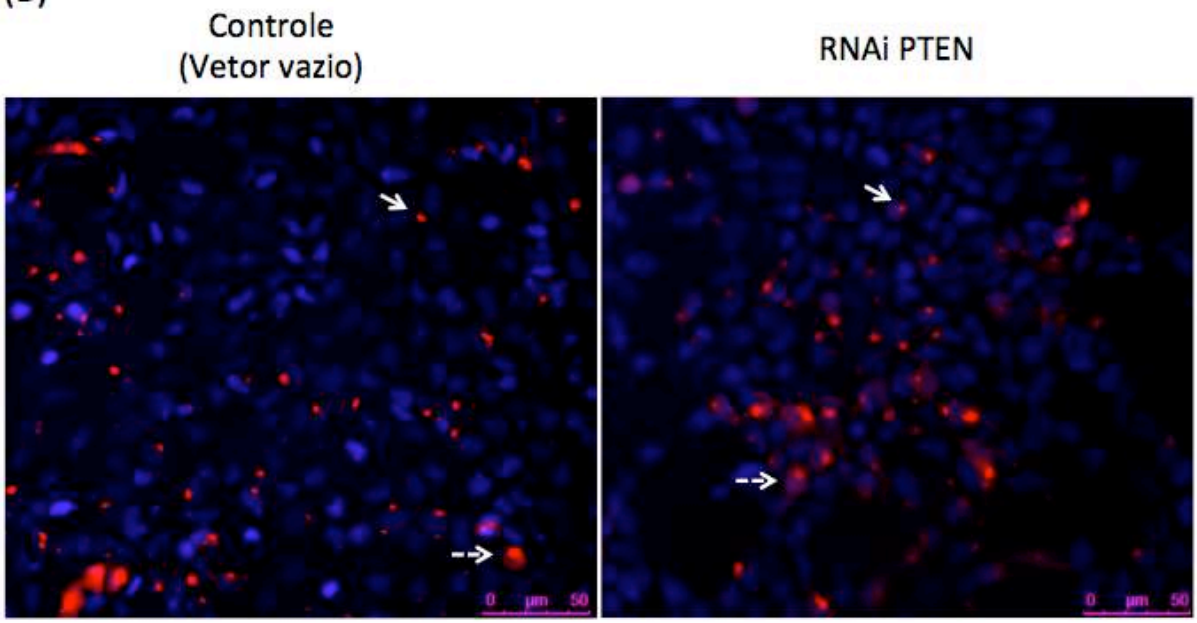


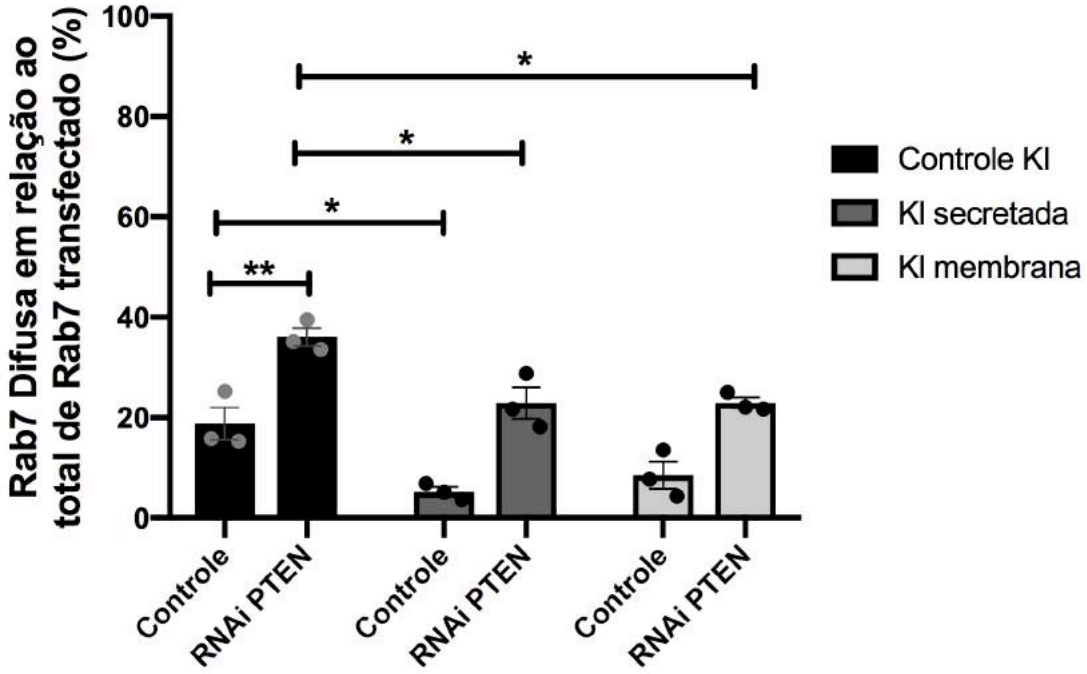
Figura 17. Análise da transfecção de RNAi PTEN na proteína Rab7. (A) Quantificação da forma difusa de Rab7 em relação ao total transfectado em células HEK293 na presença do vetor vazio (controle) e do plasmídeo com o RNAi da PTEN. (B) Imagem representativa da proteína Rab7 (mChrerry) e DAPI (azul) nas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

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

- *Efeito do tratamento com Klotho na proteína Rab7*

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

(A)



(B)

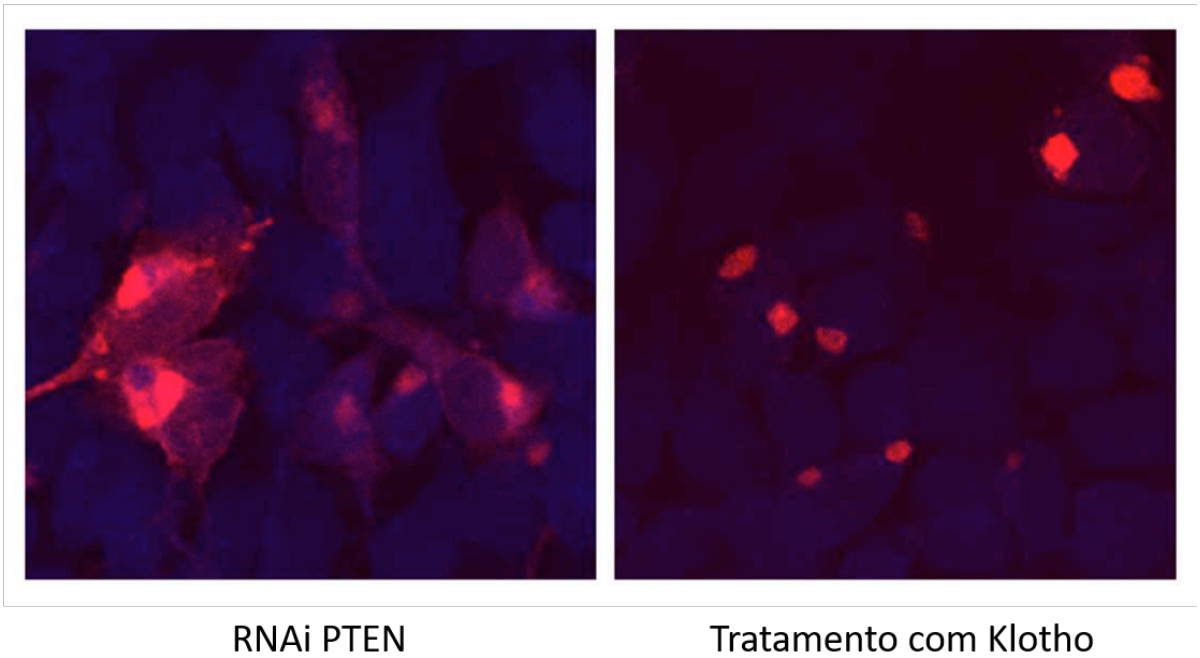


Figura 18. Efeito da Klotho na proteína Rab7 frente aos efeitos deletérios do silenciamento da PTEN. (A) Quantificação de Rab7 difusa em relação ao total de Rab7 transfectada nas condições com vetor vazio (Controle Kl) e hiperexpressão das formas secretada (Klsecretada) e de membrana (Klmembrana) da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

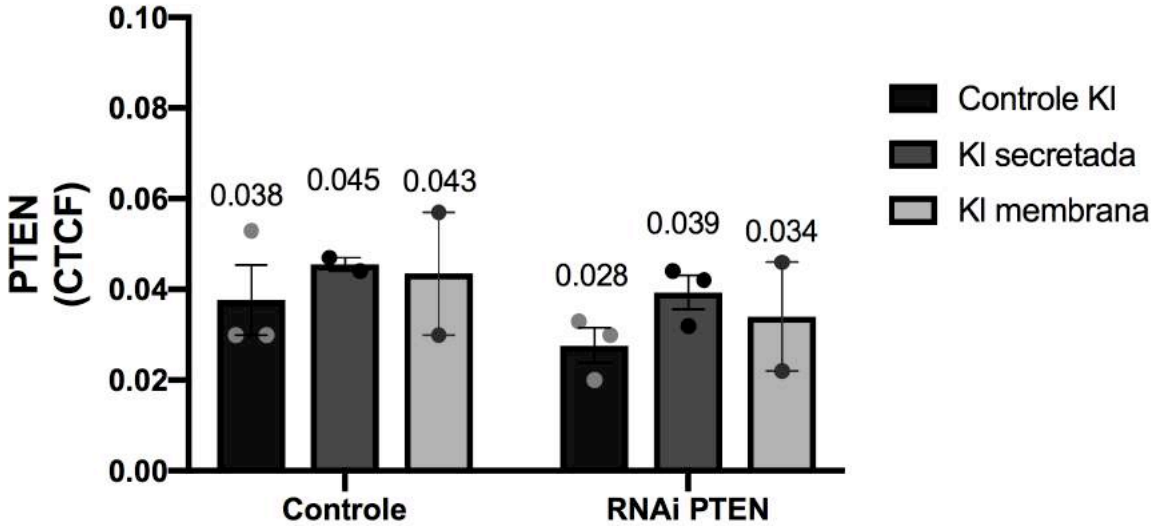
A partir da análise dos resultados obtidos, observou-se que a proteína klotho, tanto a forma secretada quando a de membrana, é capaz de restaurar os níveis de desfosforilação da proteína Rab7 para condições próximas ao basal mesmo na presença do RNAi da PTEN. Além disso, em níveis normais de PTEN, a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

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

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

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

(A)



(B)

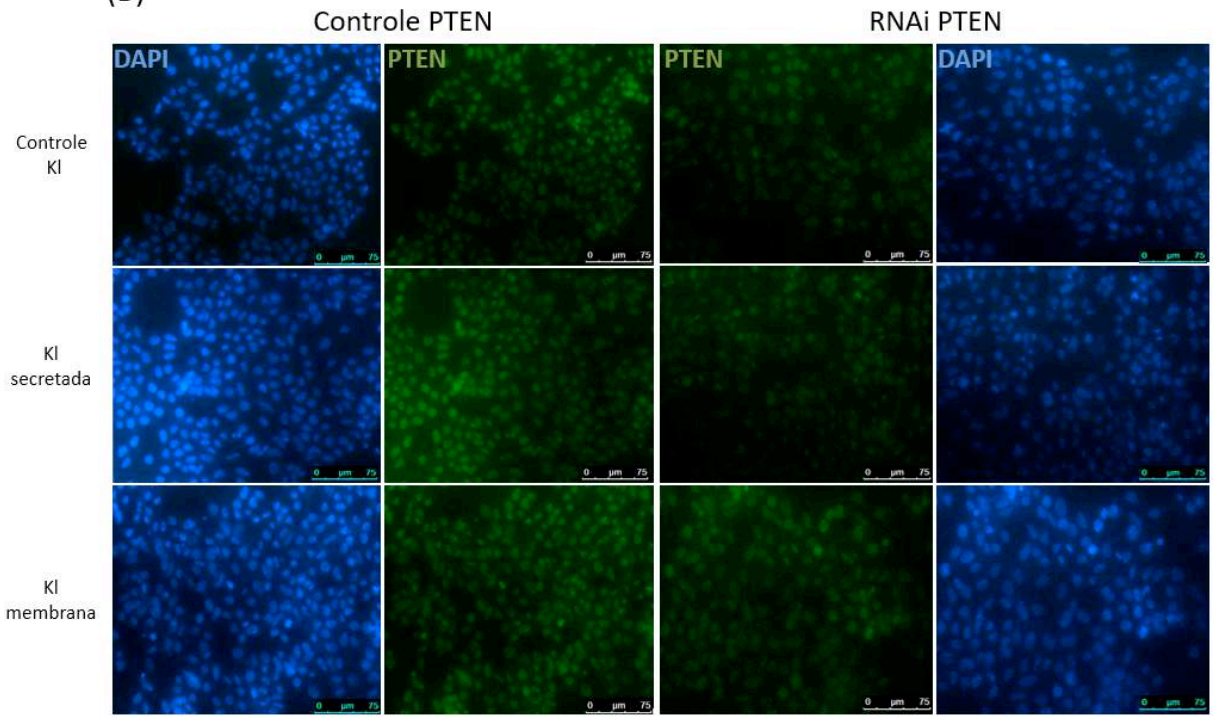


Figura 19. Efeitos da hiperexpressão da Klotho nos níveis da proteína PTEN. (A) Quantificação da imunofluorescência para a proteína PTEN na presença (Controle) e ausência (RNAi PTEN) da PTEN frente às condições normais (Controle Kl) e de hiperexpressão das formas secretada (Kl secretada) e de membrana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

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

5 DISCUSSÃO

5.1 Validação do modelo de deleção da PTEN in vitro e Análise da Influência do Sexo nas Expressões das Proteínas PTEN e Klotho

Tendo em vista o interesse na análise da morfologia neuronal e da necessidade da utilização de cultura embrionária, se fez necessário a validação *in vitro* do modelo de deleção condicionada da PTEN. Primeiramente, a análise da pureza da cultura celular demonstrou a presença majoritária de células neuronais (Figura 6), confirmando a eficiência da técnica. Além disso, a partir da etapa de padronização, verificou-se que a enzima cre recombinase começa a ser expressa por volta do terceiro dia *in vitro* (Figura 8), permitindo que se dê início ao processo de deleção da PTEN, a qual se mostrou ser significativamente deletada após 14 dias *in vitro* (Figura 11). Em relação à morfologia neuronal, a hipertrofia da soma celular, a qual já é descrita na literatura (FRASER et al., 2008), também foi observada no 14° dia *in vitro* (Figura 13), corroborando com o período em que se obteve a redução na expressão da PTEN entre as células de fêmeas WT e HO (Figura 11). De acordo com a análise estatística apresentada anteriormente, as células provenientes das fêmeas apresentaram uma redução significativa na expressão da PTEN que não foi observada nos machos (Figura 11), o que pode estar relacionado à grande variabilidade nos resultados de tal grupo. No entanto, devido ao número amostral insuficiente para análise morfológica em relação ao sexo, ainda não foi possível analisar se uma maior redução se reflete em alterações mais drásticas na morfologia

das células. Da mesma forma, também devido às limitações para obtenção dos animais e do tempo, ainda não foi possível analisar os possíveis efeitos da Klotho sobre tais alterações.

Além da validação do modelo, buscou-se também analisar a influência do sexo no perfil de expressão da PTEN. Curiosamente, embora em 7 dias *in vitro* as células neuronais dos embriões WT machos aparentem apresentar mais PTEN do que as das fêmeas, após 14 dias *in vitro* ocorre a inversão desse fenômeno (Figura 10). Tais dados sugerem que, a partir de um certo período, as fêmeas podem necessitar de uma maior quantidade de PTEN do que os machos para o seu desenvolvimento, ou que os machos podem apresentar alguma via de inibição da expressão de tal proteína. De qualquer maneira, o fator sexo demonstrou exercer uma diferença significativa já no desenvolvimento *in vitro* de células embrionárias, evidência semelhante ao observada por Carruth *et al*. (2002), que demonstrou que células provenientes do 14º dia embrionário (E14) de roedores se diferenciaram sexualmente em relação ao número de neurônios dopaminérgicos. De forma paralela, visto que o estudo comparativo em células entre animais *wild-type* de ambos os sexos permitiu a revelação de um fenômeno interessante, também buscou-se analisar a influência do sexo na via da PTEN-PI3K-AKT em animais adultos. Pela análise do resultado, embora não tenha ocorrido uma diferença estatística, observou-se uma grande tendência de camundongos fêmeas WT de 2 meses de idade apresentarem uma expressão basal da proteína PTEN maior do que a dos machos WT da mesma idade (Figura 14), o mesmo fenômeno observado nas células embrionárias após 14 dias *in vitro* (Figura 10).

Curiosamente, tanto na análise da cultura embrionária quanto nos animais adultos WT, não foi observada diferença estatística na fosforilação da AKT em relação ao sexo (Figuras 12 e 15, respectivamente), mesmo com a variação sexo dependente de expressão da PTEN, a qual regula negativamente a ativação da AKT. Tais dados reforçam a hipótese de que possa estar havendo algum fator dependente do sexo influenciando nos níveis de ativação da AKT e contribuindo para o balanço da via. Outra hipótese, no entanto, é a de que esse aumento de expressão da PTEN total também possa estar acompanhado do aumento de PTEN fosforilada, a qual se torna inativa. De acordo com um estudo realizado em amostras do músculo esquelético (SAMAAN et al., 2015), mulheres apresentaram uma menor atividade da PTEN quando comparadas aos homens, tanto devido à uma menor

expressão do gene da PTEN como de um aumento da fosforilação da mesma. Embora não seja referente ao SNC, tal estudo também demonstra que a ação da PTEN está sujeita à influência do sexo, corroborando com os dados deste trabalho. No que diz respeito à expressão da PTEN, por sua vez, sabe-se que diversos fatores de transcrição, micro-RNAs e modificações pós-translacionais têm demonstrado exercer influência sobre tais ações, seja como regulador positivo ou negativo (BERMÚDEZ BRITO, 2015). Como alguns dos exemplos, dentre os ativadores da expressão da PTEN, pode-se citar EGFR, PPARγ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) e P53, os quais se ligam diretamente à região promotora da PTEN (PATEL et al., 2001; STAMBOLIC et al., 2001; VIROLLE et al., 2001). Por outro lado, fatores de transcrição como NF-κB e c-Jun são responsáveis pela repressão da transcrição dessa proteína (HETTINGER et al., 2007; VASUDEVAN; GURUMURTHY; RANGNEKAR, 2004).

Já em relação à Klotho, também foram observadas variações nos seus níveis de expressão em relação ao sexo, de forma que fêmeas WT adultas demonstraram expressar uma quantidade significativamente menor de Klotho do que os machos da mesma idade (Figura 16). De acordo com a literatura, no que se refere à regulação da expressão da proteína Klotho, um estudo realizado com amostras do rim de animais com deleção da aromatase, a enzima responsável por converter a testosterona em estradiol, observou que a ausência de tal proteína resultou em aumento nos níveis de expressão da Klotho (ÖZ et al., 2007). Embora seja necessário considerar as particularidades de cada sistema do organismo, essa ação da testosterona/estradiol sobre a Klotho pode ser uma das razões que explique as diferenças de expressões observadas em cada um dos sexos. De forma similar, outro trabalho também demonstrou que a testosterona é capaz de hiperexpressar Klotho renal atuando via sinalização mediada pelo receptor de andrógeno (HSU et al., 2014). Assim, corroborando com a literatura, os dados obtidos neste trabalho reforçam a influência do sexo na regulação da expressão da Klotho. Além disso, é importante ressaltar que ambas as proteínas PTEN e Klotho demonstraram sofrer influência do sexo, porém de forma inversamente proporcional, tanto nos animais machos quanto nas fêmeas. Levando-se em consideração que a Klotho também é capaz de regular negativamente a via da AKT, como mencionado anteriormente, os dados deste trabalho sugerem que tal fenômeno pode estar relacionado com um controle da ativação da AKT de forma dependente do sexo, o que reforça o potencial

de utilização da Klotho em condições associadas à ausência da PTEN. Entretanto, ainda são necessários mais experimentos para uma melhor compreensão desse fenômeno.

De forma geral, em relação ao sexo, os dados deste trabalho reforçam o fato de que essa diferença parece ser capaz de exercer influência desde a fase embrionária até a fase adulta. Além disso, tais dados sugerem que o grau de importância de cada proteína pode variar de acordo com o sexo, o que pode estar relacionado com a maior ou menor susceptibilidade de cada um desses grupos ao desenvolvimento de determinadas doenças, como por exemplo as neurológicas e neurodegenerativas citadas anteriormente.

5.2 Klotho como um possível tratamento na ausência da PTEN

Por meio de técnicas de biologia molecular desenvolvidas na *The Open University*, UK, buscou-se criar ferramentas que pudessem auxiliar no estudo da interação PTEN e Klotho, bem como investigar os possíveis efeitos terapêuticos provenientes da Klotho. Para tanto, utilizou-se RNA de interferência para promover reduções transientes na expressão da PTEN a fim de continuar analisando os danos causados frente à ausência da mesma e de analisar os efeitos da Klotho em tais condições.

Além de comprovar a eficácia na redução da expressão da PTEN, a co-transfecção dos plasmídeos de RNAi e de Rab7 reforçaram o importante papel da PTEN na desfosforilação da proteína Rab7, corroborando com dados da literatura (SHINDE; MADDIKA, 2016). Como pôde ser observado, a ausência da PTEN impede a ativação da proteína Rab7, fazendo com que a mesma apresente uma distribuição difusa no citoplasma da célula (Figura 17) e não atue no processo de maturação de endossomos, bem como na subsequente fusão desses com os lisossomos. De acordo com Shinde e Maddika (2016), essa ação da PTEN na desfosforilação da proteína Rab7 é a responsável por controlar a via endocítica de degradação do EGFR, o qual já se mostrou estar envolvido com alguns casos de câncer (SIGISMUND; AVANZATO; LANZETTI, 2018).

Em relação aos efeitos provenientes da Klotho, buscou-se investigar seu potencial terapêutico frente aos danos causados pela ausência da PTEN. De forma inédita, ao hiperexpressar a proteína Klotho, tanto a forma secretada quanto a

solúvel, observou-se uma redução dos níveis de Rab7 na forma difusa a condições próximas das basais, revelando o potencial da Klotho em reverter os danos causados pela deleção da PTEN na proteína Rab7 (Figura 18). Além disso, em níveis normais de PTEN, a Klotho secretada demonstrou ser capaz de reduzir a porcentagem de Rab7 na forma difusa para níveis ainda menores, o que talvez possa indicar um aumento da atividade da Rab7 e, consequentemente, da via endocítica, a qual é essencial para processos de internalização e degradação de, por exemplo, receptores e patógenos (SCHROEDER; MCNIVEN, 2014).

Embora na análise de expressão da PTEN os níveis de variações obtidos não tenham sido significativos, tanto em relação à redução causado pelo RNAi quanto ao possível aumento causado por ambas as formas da Klotho, é possível observar que, após a hiperexpressão de Klotho, os níveis de PTEN se aproximam ao valor do controle (Figura 19). Além disso, mesmo em condições normais, a hiperexpressão da Klotho parece ser favorável à expressão da PTEN (Figura 19). Assim, em relação ao mecanismo de ação, os dados deste trabalho sugerem que a Klotho é capaz de promover o aumento de expressão da proteína PTEN, a qual, por sua vez, desempenha sua atividade na proteína Rab7 restaurando aos níveis basais de atividade da mesma (Figura 20), que, dentre outras funções, permite a degradação do EGFR e consequentemente a regulação da via de crescimento e proliferação celular.

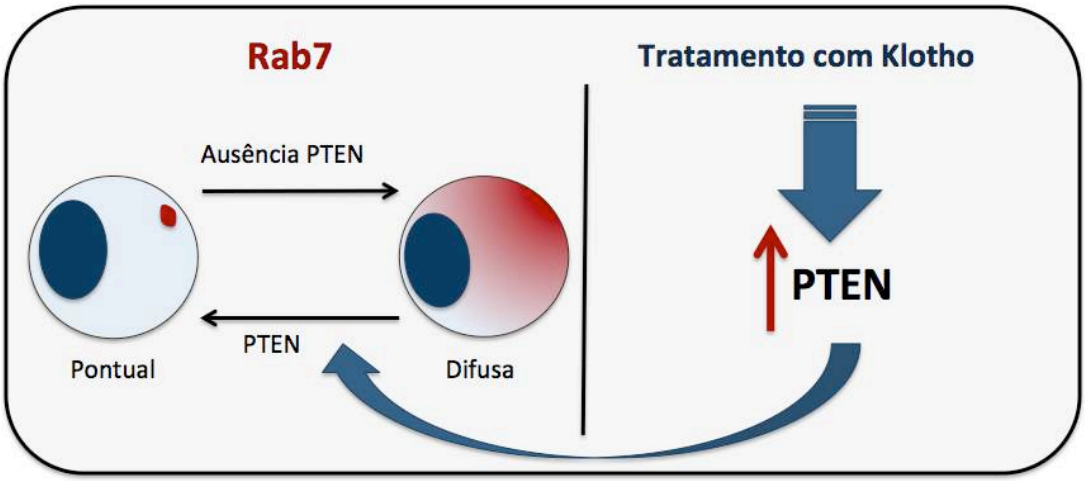


Figura 20. Modelo de mecanismo de ação proposto. Em condições fisiológicas, a PTEN desfosforila a proteína Rab7 por meio de uma interação direta, tornando-a ativa (forma pontual) para desempenhar suas funções na via endocítica. No entanto, frente a reduções nos níveis de expressão da PTEN, a Rab7 permanece inativa, apresentando-se de forma difusa pelo citoplasma celular. Assim, tendo em vista a análise dos resultados obtidos, sugere-se que a hiperexpressão da Klotho é capaz de reverter os efeitos deletérios causados na ausência da PTEN devido à indução do aumento da expressão da mesma.

Levando-se em consideração que a quantificação da redução na intensidade da expressão da PTEN por ação do RNAi também não foi significativa quando analisada pela técnica de imunofluorescência, embora tal redução tenha sido observada de forma indireta por meio do efeito significativo na Rab7, acredita-se que pelo fato dos plasmídeos de RNAi para PTEN e de superexpressão de Klotho não possuírem marcadores fluorescentes, diferentemente do plasmídeo de Rab7, todas as células estão sendo quantificadas, inclusive as não transfectadas, o que provavelmente pode estar mascarando os resultados. Assim, outros experimentos ainda serão realizados com o intuito de analisar a veracidade da hipótese do mecanismo proposto.

Por fim, é importante ressaltar que a hiperexpressão da forma de membrana da Klotho também resultou em efeitos semelhantes aos da forma secretada quando na ausência da PTEN (Figura 18). Tendo em vista que a maioria dos estudos realizados são referentes à forma secretada e que as ações de cada uma das formas da Klotho ainda não são bem definidas, tal resultado também pode trazer novas informações em relação à Klotho para a literatura.

6 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, C. R. et al. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 13, p. 1671–1679, set. 2012.

ARKING, D. E. et al. Association Between a Functional Variant of the KLOTHO Gene and High-Density Lipoprotein Cholesterol, Blood Pressure, Stroke, and Longevity. **Circulation Research**, v. 96, n. 4, p. 412–418, 4 mar. 2005.

ARNOLD, A. P. Mouse Models for Evaluating Sex Chromosome Effects that Cause Sex Differences in Non-Gonadal Tissues. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 377–386, abr. 2009.

ARNOLD, A. P. A general theory of sexual differentiation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 291–300, 2 jan. 2017.

AUYEUNG, B. et al. Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old children. **Molecular Autism**, v. 1, n. 1, p. 11, 2010.

BERMÚDEZ BRITO, M. Focus on PTEN regulation. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. July, p. 1–15, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BUCCI, C. et al. Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 2, p. 467–480, fev. 2000.

BUTLER, M. G. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 4, p. 318–321, 1 abr. 2005.

CABRAL-COSTA, J. V. et al. Intermittent fasting uncovers and rescues cognitive phenotypes in PTEN neuronal haploinsufficient mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8595, 5 dez. 2018.

CARRUTH, L. L.; REISERT, I.; ARNOLD, A. P. Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 933–934, 16 out. 2002.

CHEN, C.-D. et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19796–19801, 11 dez. 2007.

CHEN, C.-D. et al. Identification of Cleavage Sites Leading to the Shed Form of the Anti-Aging Protein Klotho. **Biochemistry**, v. 53, n. 34, p. 5579–5587, 2 set. 2014.

CHENG, M.-F. et al. Signals mediating Klotho-induced neuroprotection in hippocampal neuronal cells. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 75, n. 1, p. 60–71, 2015.

CLINTON, S. M. et al. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. **Brain Research**, v. 1527, p. 1–14, ago. 2013.

CRISTOFANO, A. D. et al. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. **Nature Genetics**, v. 19, n. 4, p. 348–355, 1 ago. 1998.

DUBAL, D. B. et al. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. **Cell Reports**, v. 7, n. 4, p. 1065–1076, maio 2014.

ERBEN, R. G.; ANDRUKHOVA, O. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. **Bone**, v. 100, p. 62–68, jul. 2017.

FRASER, M. M. et al. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. **Neuroscience**, v. 151, n. 2, p. 476–488, jan. 2008.

FRAZIER, T. W. et al. Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 9, p. 1132–1138, 2015.
GERMAN, D. C. et al. Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 7, p. 1483.e25-1483.e30, jul. 2012.
GLYNN, M. W.; MCALLISTER, A. K. Immunocytochemistry and quantification of protein colocalization in cultured neurons. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1287–1296, out. 2006.
GOTO, M. et al. IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells. **REPRODUCTION**, v. 137, n. 5, p. 835–842, maio 2009.
HETTINGER, K. et al. c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 2, p. 218–229, 5 fev. 2007.
HSU, S.-C. et al. Testosterone increases renal anti-aging klotho gene expression via the androgen receptor-mediated pathway. **Biochemical Journal**, v. 464, n. 2, p. 221–229, 1 dez. 2014.
JAWORSKI, J. Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11300–11312, 7 dez. 2005.
KIM, Y. S. et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample. **American Journal of Psychiatry**, v. 168, n. 9, p. 904–912, set. 2011.
KREIS, P. et al. Subcellular targeting and dynamic regulation of PTEN: implications for neuronal cells and neurological disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, n. April, p. 1–19, 2014.
KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45–51, 1997.
KUROSU, H. et al. Suppression of Aging in Mice by. v. 309, n. September, p. 1829–1834, 2005.
KWON, C. H. et al. Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. **Neuron**, v. 50, n. 3, p. 377–388, 2006.
LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
LEON, J. et al. Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and α-Synuclein Transgenic Mice. **Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 1360–1371, ago. 2017.
LI, J. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943–1947, 28 mar. 1997.
LI, S.-A. et al. Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. **Cell Structure and Function**, v. 29, n. 4, p. 91–99, 2004.
LIU, H. et al. Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803–806, 10 ago. 2007.
LUIKART, B. W. et al. Pten Knockdown In Vivo Increases Excitatory Drive onto Dentate Granule Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 4345–4354, 16 mar. 2011.
MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The Tumor Suppressor , PTEN /. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13375–13378, 1998.
MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.

MARANGOS, P. J. et al. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. **Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 185–193, maio 1980.
MATSUMURA, Y. et al. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626–630, jan. 1998.
MCFARLANE, L. et al. Novel PCR Assay for Determining the Genetic Sex of Mice. **Sexual Development**, v. 7, n. 4, p. 207–211, 2013.
NAGY, A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. **genesis**, v. 26, n. 2, p. 99–109, fev. 2000.
ÖZ, O. K. et al. Aromatase Deficiency Causes Altered Expression of Molecules Critical for Calcium Reabsorption in the Kidneys of Female Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1893–1902, 20 ago. 2007.
PATEL, L. et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARγ agonists are mediated via upregulation of PTEN. **Current Biology**, v. 11, n. 10, p. 764–768, maio 2001.
PERANDONES, C. et al. Correlation between synaptogenesis and the PTEN phosphatase expression in dendrites during postnatal brain development. **Molecular Brain Research**, v. 128, n. 1, p. 8–19, set. 2004.
PODSYPANINA, K. et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 4, p. 1563–1568, 16 fev. 1999.
PRATHER, A. A. et al. Longevity factor klotho and chronic psychological stress. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 6, p. e585-6, 2015.
SAMAAN, M. C. et al. Sex differences in skeletal muscle Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) levels: A cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9154, 17 ago. 2015.
SCHROEDER, B.; MCNIVEN, M. A. Importance of endocytic pathways in liver function and disease. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1403–1417, 2014.
SEMBA, R. D. et al. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 37–40, jan. 2014.
SHINDE, S. R.; MADDIKA, S. PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10689, 12 dez. 2016.
SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 1, p. 3–20, 2018.
STAMBOLIC, V. et al. Regulation of PTEN Transcription by p53. **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, p. 317–325, ago. 2001.
SUN, H. et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 11, p. 6199–6204, 25 maio 1999.
SUZUKI, A. et al. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. **Current Biology**, v. 8, n. 21, p. 1169–1178, out. 1998.
TAMBORSKI, S.; MINTZ, E. M.; CALDWELL, H. K. Sex Differences in the Embryonic Development of the Central Oxytocin System in Mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 4, abr. 2016.
TILOT, A. K.; FRAZIER, T. W.; ENG, C. Balancing Proliferation and Connectivity in PTEN-associated Autism Spectrum Disorder. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 609–619, 2015.

TOMAS, A.; FUTTER, C. E.; EDEN, E. R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 1, p. 26–34, jan. 2014.
VANHAESEBROECK, B. et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 329–341, 9 maio 2010.
VASCONCELOS, A. R. et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 85, 2014.
VASUDEVAN, K. M.; GURUMURTHY, S.; RANGNEKAR, V. M. Suppression of PTEN Expression by NF- B Prevents Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 3, p. 1007–1021, 1 fev. 2004.
VIROLLE, T. et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 1124–1128, 1 dez. 2001.
WOLF, I. et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, p. 7094–7105, 1 nov. 2008.
YAMAMOTO, M. et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 38029–38034, 2005.
ZELDICH, E. et al. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24700–24715, 2014.