

DIANA ZUKAS ANDREOTTI VIANA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO NA
NEUROGÊNESE E NA PLASTICIDADE SINÁPTICA NA PROLE DE
CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO CONDICIONADA DA PTEN**

**Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências**

São Paulo

2018

DIANA ZUKAS ANDREOTTI VIANA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO NA
NEUROGÊNESE E NA PLASTICIDADE SINÁPTICA NA PROLE DE
CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO CONDICIONADA DA PTEN**

**Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Farmacologia
Orientadora: Prof^a Dra Elisa Mitiko Kawamoto
Co-orientador: Crsitoforo Scavone
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)

Zukas Andreotti Viana, Diana
Avaliação da influência do exercício físico voluntário na neurogênese e na plasticidade sináptica na prole de camundongos com deleção condicionada da PTEN / Diana Zukas Andreotti Viana; orientador Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe; coorientador Cristoforo Scavone. -- São Paulo, 2018. 126 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Exercício Físico Voluntário. 2. PTEN. 3. Aspectos Cognitivos e Comportamentais. 4. Plasticidade Sináptica. I. Mitiko Kawamoto Iwashe, Elisa, orientador. II. Scavone, Cristoforo, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título 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:



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

Decl. CEUA.034/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 114/14/CEUA, datado de 12/12/2014, e por solicitação do Prof. Dr. **Cristoforo Scavone**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Diana Zukas Andreotti** ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação da influência do exercício físico voluntário na neurogênese e na plasticidade sináptica na prole de camundongos com deleção condicionada da PTEN*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 08 de maio de 2015.

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **114** nas fls. **24** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Cristoforo Scavone**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação da influência do exercício físico voluntário na neurogênese e na plasticidade sináptica na prole de camundongos com deleção condicionada da pten*" do qual participam o(s) aluno(s) **João Victor Cabral Costa**, Jovem Pesquisador **Elisa Mitiko Kawamoto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.12.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 12 de dezembro de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

O DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
NOS TERMOS DO ARTIGO 74, PARÁGRAFO ÚNICO,
INCISO 5, ALÍNEA "B", DO
ESTATUTO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
CERTIFICA QUE

DIANA ZUKAS ANDREOTTI



DE NACIONALIDADE BRASILEIRA,
PORTADORA DA CÉDULA DE IDENTIDADE
RG Nº 43.940.656-0 SP,
NASCIDA EM 4 DE FEVEREIRO DE 1985
E NATURAL DO ESTADO DE SÃO PAULO,
CONCLUIU O



**CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA NA
MODALIDADE DE DIFUSÃO:
CURSO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA**

E, PARA QUE POSSA GOZAR DE TODOS OS
DIREITOS E PRERROGATIVAS LEGAIS,
OUTORGA-LHE O PRESENTE CERTIFICADO.

SÃO PAULO, 21 DE OUTUBRO DE 2011.



PRESIDENTE DA COMISSÃO
DE CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

EDNA TERUKO KIMURA



DIRETOR
RUI CURÍ

*A meus pais, Valentim e Cristina, meus alicerces.
A meu esposo, Eduardo, meu amor e companheiro de vida.*

*A Meus grandes incentivadores,
minha eterna gratidão.*

Agradecimentos

Após 4 anos de trabalho completo, são muitos os agradecimentos a fazer, porque nada na vida se conquista sozinho, inclusive uma tese de doutorado.

Primeiramente agradeço a Deus e a Nsa Sra. Aparecida, a qual sou devota, pelo dom da vida, a oportunidade de me candidatar a esse título e por trabalhar com ciência, pois como disse Louis Pasteur: “Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.

Agradeço também ao Prof. Cristoforo, pela confiança, pela co-orientação e pela amizade nesses 8 anos de trabalho em seu laboratório. Como aluna agradeço pela co-orientação, como técnica, agradeço a confiança em mim depositada e a humanidade que sempre me tratou, assim como trata a todos os seus colaboradores. Obrigada pelas valiosas discussões de muitos assuntos diferentes, mesmo com as nossas divergências em diversos pontos de vista.

Muito obrigada a minha orientadora, Prof.^a Elisa, que mesmo não me conhecendo direito aceitou me orientar e me deu a oportunidade desse enorme crescimento pessoal e científico que é desenvolver uma tese de doutorado.

À minha amiga e colega de laboratório Larissa, por me cobrir quando eu precisei nos diversos afazeres do Laboratório, pela amizade, pela disposição em sempre ajudar em tudo, desde os experimentos, até a leitura e sugestões nessa tese.

A meu colega e amigo João Victor, fundador da EquiPTEN, obrigada por caminhar junto comigo desde o início dessa linha de pesquisa, pela amizade, pelos conselhos, desabafos e risadas. Nunca vou esquecer das piadas do tio João! Obrigada pela leitura crítica desta tese, pelo companheirismo de bancada e de compartilhamento de conhecimento científico. Nós mano!

Às minhas queridas amigas e companheiras de laboratório Ana Maria, Jacqueline e Paula, que ajudaram a tornar esses quatro anos de doutorado mais leves e divertidos! A Amanda Galvão e Natália, que chegaram um pouquinho depois do início dessa história. Obrigada pela amizade, pelas conversas, pelas discussões, terapia em grupo, pelas risadas e principalmente pelos cafezinhos e pelas comilanças quase diárias! À vcs meninas, meu agradecimento, minha amizade e meu amor! Tamo junto manos!

Agradeço às colegas de laboratório que não estão mais no nosso grupo, porém participaram dessa história: Andréa, Beatriz, Marina Cararo, Lídia, Ana Elisa, Rosana Alves. Vocês fazem muita falta na convivência nossa de todos os dias.

Meus agradecimentos às minhas alunas de Iniciação Científica, Fábiana Tano e Camilla Marques que também contribuíram com esse trabalho e me proporcionaram a experiência de orientar, mesmo que não oficialmente.

Por fim, meu obrigada aos colegas que chegaram a pouco tempo no nosso grupo, Amanda Matumoto, Geovanni e Marina Saade. Obrigada pelo companheirismo e compreensão nos dias mais atribulados desse último ano de doutorado.

Enfim, a todos do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular e do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional que me fizeram conhecer o significado verdadeiro de trabalho em equipe.

Aos colegas, funcionários do Departamento de Farmacologia, Carmem, Guiomar, Moacir, Sônia, Antônio, Cida, Helory, Simone, Rosângela e Sidnei, obrigada pelo companheirismo e pelas palavras de incentivo que eu sempre recebi. Ao Fernando, Manoel Messias, Mariana e Sandra por cuidarem com tanto zelo dos animais usados neste e em outros projetos. À Mônica, Camila, Rosa e Laiane pela disposição e paciência para ajudar sempre. A vocês meu muito obrigada! Que essa titulação sirva para abrir cada vez mais portas para a valorização dos funcionários da Universidade de São Paulo. Se a USP ostenta a qualidade e a posição que tem hoje, foi por contar com funcionários dedicados, qualificados e competentes em suas funções.

Meu agradecimento eterno a meus pais, Valentim e Cristina, sem vocês eu jamais teria chegado até aqui! Obrigada por tantos sacrifícios para que eu pudesse ter uma educação de qualidade e hoje conseguir andar com as minhas próprias pernas. Quiçá todos nesse país possam ter acesso à uma boa educação e a oportunidade de uma vida digna! Amo vocês para sempre!

A meu amado esposo, Eduardo, pelo seu amor, pela sua admiração para com o meu trabalho, principalmente pela sua paciência, nos dias felizes e nos dias frustrantes dessa caminhada. Obrigada por segurar a minha mão e aguentar esse tranco comigo, primeiro como namorado, depois como noivo,

agora como marido. A você todo meu amor, minha gratidão e respeito. Te amo demais!

A toda minha família, tios, primos, sogros, avós, obrigada pelas orações e pelos incentivos que vocês sempre me deram! Obrigada vó Victória pelas orações diárias em minha intenção e por seus conselhos valiosos, de quem já passou por tudo nessa vida e tem uma sabedoria gigantesca. Obrigada Laura e Isadora, minhas irmãs amadas, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando. Família é a base de tudo!

Não poderia deixar de agradecer ao meu filho canino Lemmy que participou da escrita da minha tese, ficando ao meu lado ou deitado no meu pé, um apoio silencioso e carinhoso, do amor mais puro e verdadeiro que existe nesse mundo. "Não há nenhum psiquiatra no mundo como um cachorro lambendo seu rosto." - Bern Williams. Meu agradecimento também aos animais que deram a vida pela realização deste projeto, muito da nossa qualidade de vida atual devemos a eles.

Por fim, agradeço ao Instituto de Ciências Biomédicas e a Universidade de São Paulo pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste projeto. Obrigada a todos os profissionais envolvidos direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Agradeço a FAPESP, ao CNPQ e a CAPES pelo aporte financeiro para a realização deste projeto.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.”

Gandalf, O Cinzento

O Senhor dos Anéis – J.R.R. Tolkien

Resumo

Andreotti-Viana, D.Z. Avaliação da influência do exercício físico voluntário na neurogênese e na plasticidade sináptica na prole de camundongos com deleção condicionada da PTEN. [Tese de Doutorado em Farmacologia] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

O gene da PTEN (Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten) foi primeiramente estudado como um gene supressor de tumor. No entanto, devido as características abrangentes desta fosfatase que podem influenciar a proliferação, sobrevivência e migração celular, a PTEN também parece estar envolvida nos fenômenos da neurogênese e plasticidade sináptica.

Estudos sugerem que não somente fatores genéticos, mas também ambientais podem influenciar o processo de neurogênese. Entender os mecanismos pelos quais isso ocorre pode trazer benefícios no tratamento ou até mesmo na prevenção de doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC). Como exemplo, o exercício físico tem demonstrado exercer efeitos benéficos em processos associados ao envelhecimento e a doenças neurodegenerativas. A prática de exercício físico durante a gestação também pode favorecer a neurogênese e a plasticidade sináptica na prole, e esses efeitos benéficos podem perdurar até a idade adulta desses animais.

Portanto, este projeto teve como escopo avaliar os efeitos do exercício físico voluntário na neurogênese e na plasticidade sináptica em animais com a deleção parcial do gene da PTEN. Foram observadas alterações positivas quanto ao aprendizado da prole com a deleção condicionada da PTEN durante o aprendizado da tarefa do Labirinto Aquático de Morris, além do aumento de marcadores moleculares relacionados ao fenômeno da plasticidade sináptica da subunidade NR1 do receptor glutamatérgico nesses animais e o aumento da do fator neurotrófico derivado do cérebro.

De forma geral o exercício físico materno foi capaz de aumentar alguns marcadores relacionados ao fenômeno da plasticidade sináptica, envolvido diretamente na formação de memória e da capacidade de aprendizado. Portanto, os resultados sugerem que o exercício físico materno, desde que

respeitada as condições do cuidado materno durante o puerpério e a amamentação, pode ser benéfico para a prole *wild type* e com a deleção parcial da PTEN.

Palavras-chaves: PTEN, exercício físico voluntário, cognição, intervenções não-farmacológicas.

Abstract

Andreotti-Viana, D.Z. Evaluation of the influence of voluntary physical exercise on neurogenesis and synaptic plasticity in offspring of conditioned PTEN deletion. [ph.D thesis in Pharmacology] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

PTEN was first studied as a tumor suppressor gene. However, due to the comprehensive characteristics of this phosphatase that can influence cell proliferation, survival and migration, PTEN may be also involved in the neurogenesis and synaptic plasticity.

Studies suggest that not only genetic but also environmental factors can influence the process of neurogenesis. Understanding the mechanisms by which this occurs can bring benefits in the treatment or even the prevention of diseases related to the central nervous system (CNS). As an example, physical exercise has been shown to exert beneficial effects in processes associated with aging and neurodegenerative diseases. The practice of physical exercise during pregnancy seem also favor neurogenesis and synaptic plasticity in the offspring, and these beneficial effects may last until the adulthood of these animals.

Therefore, the purpose of this project was to evaluate the effects of voluntary physical exercise on neurogenesis and synaptic plasticity in animals with partial deletion of PTEN gene. Positive alterations were observed regarding offspring learning with the conditional PTEN deletion during the learning of the Morris water maze task, as well as the increase of the subunit N-Methyl-D-Aspartate receptor 1 (NR1) in these animals and an increase in brain derived neurotrophic factor levels.

In general, maternal physical exercise was able to increase some markers related to the phenomenon of synaptic plasticity, directly involved in the formation of memory and learning capacity. Therefore, the results suggest that maternal physical exercise, while respecting the conditions of maternal care during the puerperium and breastfeeding, may be beneficial to the wild type offspring and with the partial deletion of PTEN.

Key words: PTEN, voluntary physical exercise, cognition, non-pharmacological interventions.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
2. Revisão de Literatura.....	20
2.1. Sinalização da PTEN e seus efeitos fisiológicos.....	20
2.2. A relação da PTEN com as desordens neuropsiquiátricas.....	22
2.3. Neurogênese e plasticidade sináptica.....	23
2.4. Fatores ambientais: O exercício Físico.....	23
2.5 Sistema Cre/ Lox P.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
4. Materiais e Métodos.....	31
4.1. Animais de Experimentação.....	31
4.2. Genotipagem da Linhagem Transgênica <i>Pten</i> ^{loxP/+} ; <i>Nse-Cre</i> ⁺	32
4.3. Protocolo para o Exercício Físico Voluntário.....	34
4.4. Testes Comportamentais.....	35
4.4.1. Campo Aberto.....	35
4.4.3. Comportamento Social.....	36
4.4.2. Labirinto em Cruz Elevado.....	36
4.4.4. Labirinto Aquático de Morris.....	38
4.4.5. Esquiva Inibitória.....	38
4.5. Ensaio Bioquímicos.....	39
4.5.1. Extração de Proteínas Citosólicas e Nucleares.....	39
4.5.2. Determinação da Concentração de Proteínas.....	40
4.5.3. Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA).....	40
4.5.4. Ensaio de <i>Western Blotting</i>	41
4.6. Quantificação do BDNF.....	42
4.7. Avaliação da Neurogênese.....	43
4.8. Imunofluorescência.....	43

4.9. Análise dos Resultados.....	44
5. Resultados.....	45
5.1. Do estabelecimento da colônia da linhagem <i>Pten^{loxp/+};Nse-Cre⁺</i>	45
5.2. Dados Referentes ao Exercício Físico Voluntário em fêmeas da linhagem <i>Pten^{loxp/+}/Nse-Cre⁺</i>	45
5.2.1. Distância percorrida, Massa Corpórea e Consumo de Ração.....	45
5.2.2. Avaliação do perfil comportamental das fêmeas submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário.....	49
5.2.3. Ensaio Bioquímicos.....	54
5.2.4. Resumo dos dados obtidos pelo protocolo de exercício voluntário nas fêmeas WT e HT.....	64
5.3. Dados referentes aos efeitos do exercício físico materno na prole.....	68
5.3.1. Ensaio Bioquímicos realizados com o hipocampo das Progenitoras...	68
5.3.2. Avaliação do perfil comportamental da prole após o protocolo do exercício físico voluntário materno.....	69
5.3.3. Ensaio Bioquímicos.....	76
5.3.4. Avaliação da Proliferação de Células Neurais por injeção de BrdU e imunofluorescência.....	88
5.3.5. Resumo dos resultados da prole após o protocolo do exercício voluntário materno.....	91
5.4.1. Avaliação do perfil comportamental da prole após alteração do protocolo de exercício físico voluntário materno.....	92
6. Discussão.....	103
6.1. Nas progenitoras.....	103
6.2. Na prole.....	106
7. Conclusão.....	113
8. Referências Bibliográficas.....	114

1. Introdução

Descoberta primeiramente como um gene supressor de tumor, a PTEN vem sendo associada a doenças relacionadas ao déficit cognitivo, como a doença do espectro do autismo, sendo utilizado como modelo para estudos desta desordem neuropsiquiátrica. Dados da literatura descritos no item 1 e resultados prévios do grupo do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional destacam a importância da PTEN na modulação da plasticidade sináptica no hipocampo e no córtex e da neurogênese, em especial na região do giro dentado. Amplamente explorado na literatura, sabe-se também dos benefícios do exercício físico para o aumento da neurogênese e formação de memória, através do estímulo de fatores de crescimento, como o BDNF, e esses estímulos podem ser transmitidos para a prole desses animais, através da prática de exercício físico durante a prenhez.

Levando em consideração a função do hipocampo e do córtex nas atividades cognitivas, bem como na formação de memória e aprendizado, este projeto teve como objetivo principal caracterizar a função da PTEN e sua interação com os efeitos mediados pelo exercício físico, avaliando a via da PI3K/AKT e os efeitos comportamentais relacionados ao aprendizado e à memória na prole e nas progenitoras do modelo de camundongos *Pten^{loxp/+};Nse-Cre⁺* submetidos ao exercício físico voluntário. Desse modo, pode-se contribuir com alternativas para amenizar os sintomas provocados por doenças que tem relação com a supressão do gene da PTEN, além de uma melhor elucidação da ação fisiológica da PTEN sob a influência de fatores ambientais.

2. Revisão de Literatura

2.1. Sinalização da PTEN e seus efeitos fisiológicos

O gene da *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) é descrita como uma fosfatase, pois sua principal ação é a conversão do 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3) em 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2), que ativa a proteína quinase B (Akt) antagonizando a atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) no citoplasma, (Cairn et al, 1997; Gray et al, 1998; Carracedo e Pandolfi, 2008; Hafsi et al, 2012; Songe et al, 2018) (Fig 1.). A via da mTOR/S6quinase (S6K), que está a jusante da via da PI3K/ Akt, está presente nas sinapses e medeia a plasticidade sináptica através da síntese de proteínas no local (Alessi et al, 1996), podendo ser modulada pela expressão da PTEN. A Akt é responsável por fosforilar substratos que promovem a sobrevivência e o crescimento celular, como a glicogênio sintase quinase (GSK3), FOXO (*forkhead transcription factor*) e caspase 9 (Tang et al, 2002) e pode ainda modular a ação do fator de transcrição CREB (*cyclic AMP response element binding*), que sofre fosforilação através da via da PI3K/Akt (Manning e Cantley, 2007). Com a ativação do CREB, pode haver um aumento da transcrição do BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), uma neurotrofina envolvida na proteção do sistema nervoso central (SNC), no crescimento e diferenciação de novos neurônios e na formação de novas sinapses (Tamura et al, 1998; Salmena et al, 2008).

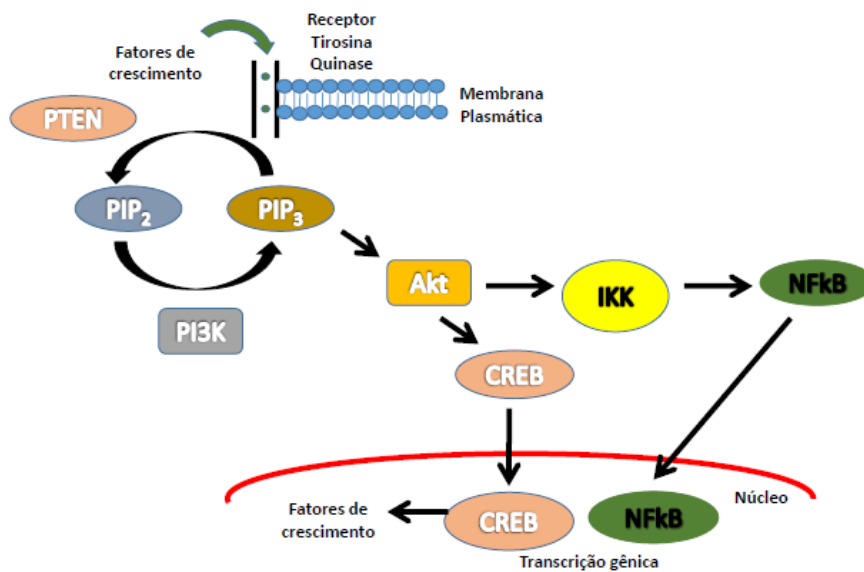


Figura 1. Via canônica da PTEN. A atividade de fosfatase da PTEN converte o PIP3 em PIP2, inibindo assim a atividade da PI3K. A deleção/mutação no gene da PTEN pode provocar uma maior ativação da via da PI3K e, conseqüentemente, da via da Akt, que pode resultar em estímulo para a proliferação celular.

Inicialmente estudado como gene supressor de tumor, a mutação do gene da PTEN pode estar associada a alguns tipos de câncer (Steck et al, 1997; Li et al, 1997), como glioblastomas e câncer de próstata (Li et al, 1997; Di Cristofano, 1998; Hafsi et al, 2012). Considerada um fator crítico para o período de desenvolvimento, a PTEN regula a sobrevivência e a proliferação celular durante a embriogênese (Di Cristofano, 1998; Mahanial e Dixon, 1998; Barnes et al, 2014;). Camundongos que possuem deleção parcial da PTEN apresentam crescimento anormal de múltiplos órgãos (Di Cristofano, 1998; Podsypanina et al, 1999; Stambolic et al, 1998; Suzuki et al, 1998; Garcia-Junco-Clemente e Goshani, 1998), ao passo que os animais nocautes homozigotos nem chegam a nascer, morrendo precocemente durante a vida embrionária (Di Cristofano, 1998; Stambolic et al, 1998; Podsypanina et al, 1999; Raftopoulos et al, 2004). Animais que apresentam mutação no gene da PTEN na fase adulta tem a proliferação e a diferenciação de células precursoras em neurônios aumentadas, podendo resultar em alteração morfológica das mesmas (Lyu et al, 2015). Esse processo de proliferação e diferenciação pode ser ativado também através da via GSK3 β / β -catenina (Song et al, 2018).

Estudos demonstram que a ação da PTEN possui diferentes ações dependendo do local onde é expressa (Tai et al, 2003; Fricano-Kugler, et al. 2018; SONG et al. 2018.). Na membrana, a PTEN regula a migração celular e exerce efeitos sobre o citoesqueleto (Salmena et al, 2008), no núcleo, a PTEN mantém a integridade do cromossomo, impedindo a quebra do centrômero e translocações cromossômicas durante a fase G1 da mitose (Shen et al, 2018). Uma vez associada a p53, que também é um gene supressor de tumor (Dashtiyani et al, 2017), a PTEN pode ativar genes pró-apoptóticos, em resposta a algum dano no DNA (Chen et al, 2006; Lehman et al, 2011), interrompendo o ciclo celular e com isso induzindo senescência. Além disso, a PTEN pode participar da regulação do tamanho do corpo celular de neurônios (Fricano-Kugler, et al. 2018).

2.2. A relação da PTEN com as desordens neuropsiquiátricas

No SNC, a PTEN é expressa em praticamente todos os neurônios, presente nos dendritos e nas espinhas dendríticas do córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório (Backman et al, 2001; Kwon et al, 2006). A deleção da PTEN no SNC afeta o número, tamanho e capacidade de migração das células (Lanchykar et al, 2000; Backman et al, 2001, Marino et al, 2002), sendo associadas a características da desordem de espectro do autismo e do retardo mental, além de macrocefalia (Butler et al, 2005; Kwon et al, 2006; Ly et al, 2013) e hamartomas como a doença de Lhermitte-Duclos e a síndrome de Cowden (Backman et al, 2001; Hobert e Charis, 2009).

A PTEN é essencial para o desenvolvimento e manutenção da estrutura e função do SNC (Garcia-Junco-Clemente, 1998), participando de processos relacionados à neurogênese e plasticidade sináptica. A deleção da PTEN em neurônios hipocámpais leva a hipertrofia dendrítica (Fraser et al, 2008) e o crescimento de ramos dendríticos ectópicos, além do crescimento progressivo da arborização axonal no giro dentado (Maehani e Dixon, 1998; Chen et al, 2005), aumento de vesículas pré-sinápticas (Weston et al, 2012) e conexões sinápticas anormais no córtex (Lugo et al, 2014). Estes efeitos podem justificar

a associação de mutações da PTEN a déficits cognitivos e à desordem do espectro de autismo (Butler et al, 2005). De fato, estudos em camundongos nocautes condicionados da PTEN observaram distúrbios comportamentais associados ao autismo, como dificuldade de interação social, ansiedade e deficiência no aprendizado (Kwon et al, 2006; Lugo et al, 2014).

Em pacientes com autismo, observa-se que 5 a 10% dos casos são relacionados a mutação no gene da PTEN (D'antonni et al, 1998), porém, quando esta mutação é associada a algum déficit de desenvolvimento ou retardo mental, essa prevalência sobe para 12,2% (Varga et al, 2002). A redução dos níveis da PTEN pode ocorrer via mutação genética ou por mecanismos epigenéticos, sem especificidade de região cerebral (Varga et al, 2002; Zhou et al, 2012). Portanto, evidências apontam para uma estrita relação em mutações do gene da PTEN e algumas doenças que acometem o SNC, dando-se destaque para a desordem do espectro do autismo (Varga et al, 2002; Zhou et al, 2012). Além do envolvimento da PTEN em doenças como o câncer e desordens do SNC, a PTEN também pode participar de processos fisiológicos, como a plasticidade sináptica e a neurogênese.

2.3. Neurogênese e plasticidade sináptica

A definição mais geral de neurogênese no adulto consiste na produção de novos neurônios funcionais no cérebro adulto, fato essencial para a ocorrência de fenômenos como o aprendizado e a formação de memória (Kempermann et al, 2018). Em 1998, Eriksson e colaboradores, desenvolveram uma metodologia para estudar a neurogênese no hipocampo humano, através da injeção de bromodeoxiuridina (BrdU), que é incorporado no DNA de células em divisão. Neurônios marcados com o BrdU indicam que esta célula estava em proliferação no exato momento em que ocorreu a aplicação do BrdU no indivíduo.

A neurogênese é um processo bastante complexo que pode durar até 7 semanas, incluindo divisão celular, migração e diferenciação (Kempermann e Gage, 2000). Atualmente são conhecidos dois nichos germinativos no cérebro adulto: a zona subventricular (SVZ), dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro dentado no hipocampo (SGZ), formando um microambiente favorável para a proliferação celular (Kempermann e Gage, 2000, Gage e van Praag, 2002). Depois de gerados, os novos neurônios passam por um período de alta excitabilidade e plasticidade, o que é essencial para sobrevivência e integração com as demais células neuronais (Tashiro et al, 2007).

As células progenitoras originadas por células-tronco na zona subventricular migram em direção ao bulbo olfatório, onde irão se diferenciar em interneurônios locais (Li et al, 2014). No hipocampo, neurônios migram da zona subgranular até a zona granular, onde se integram com as células já existentes (Jessberg e Gage, 2014). Neurônios recém-diferenciados no giro dentado, tem crescimento axonal em direção a região do CA3, sendo esse processo mediado por fatores de transcrição como o CREB (Jessberger e Gage, 2014). Especificamente, a região do CA1 possui os neurônios em maior estágio de diferenciação, enquanto o giro dentado contém uma grande quantidade de células precursoras que irão gerar neurônios excitatórios do hipocampo (Sperow et al, 2012). A neurogênese depende não somente da presença de células-tronco mas da disposição de células precursoras neuronais e também de uma alta plasticidade sináptica (Kempermann et al, 2018). Fazendo um comparativo com o sistema reprodutor feminino, a proliferação das células tronco neuronais não ocorre de maneira substancial na fase adulta, sendo diminuída com o passar do tempo, caracterizando um período chamado “menopausa da neurogênese”, o que pode estar relacionado com o declínio cognitivo característico em indivíduos mais idosos (Kempermann et al, 2018).

Fatores genéticos, fisiológicos, patológicos, comportamentais e ambientais podem modular a neurogênese em adultos (Gage e van Praag, 2002; Jessberger e Gage, 2014). Por exemplo, estresse (Gould et al, 1998), glicocorticóides (Perez-Martim et al, 2003), inflamação e o envelhecimento (Khun et al, 1997) podem prejudicar esse processo em adultos. Por outro lado, hormônios como o estrogênio (Brannval et al, 2001; Perez-Martim et al, 2003),

antidepressivos (Malberg et al, 2000; Maney et al, 2001), fatores de crescimento como o BDNF (Zigova et al, 1998; Gage e van Praag, 2002), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento vascular (VEGF) (Kempermann e Gage, 2000; Jessberg e Gage, 2014; Brezen et al, 1999), neurotransmissores, como monoaminas e o glutamato (Brezen et al, 1999), o enriquecimento ambiental, o exercício físico voluntário (Gage e van Praag, 2002, Kempermann et al, 1997) atuam como possíveis estimulantes da neurogênese em adultos.

Nesse sentido, a PTEN pode exercer um importante papel na regulação da proliferação celular e da diferenciação de células progenitoras na zona subventricular dos ventrículos laterais (Butler et al, 2005; Grozser et al, 2001; Gregor et al, 2009). Além da sua função no desenvolvimento embrionário, a PTEN pode também regular as células progenitoras no cérebro de adultos, estimulando a migração das células já diferenciadas em direção ao bulbo olfatório (Li et al 2002 e 2003). A deficiência de PTEN nas células progenitoras ocasiona uma maior resposta proliferativa e aumento da capacidade de auto renovação (Grozser et al, 2001; Song et al, 2018), levando a macrocefalia, por um aumento na quantidade dessas células e diminuição da apoptose. Em alguns meses, com o aumento da diferenciação das células progenitoras, pode ocorrer um esgotamento do conjunto das mesmas (Ly et al, 2013).

Nos locais onde se observa o maior número de neurônios diferenciados, observa-se também mudanças na plasticidade sináptica, principalmente associada às formas de aprendizado e memória. A plasticidade neural pode ser definida por mudanças adaptativas na estrutura e função do sistema nervoso como resposta a estímulos internos e externos. Consiste no rearranjo de conexões sinápticas que, durante o desenvolvimento, e em menor intensidade na vida adulta, é essencial para a formação adequada dos circuitos neurais (Li et al, 2003).

O déficit na plasticidade sináptica é relacionado a anormalidades morfológicas em neurônios piramidais do hipocampo (Sperow et al, 2012). Encontrada em grande quantidade nas sinapses e co-localizada com a sinaptofisina (Maciel, 2007), a PTEN pode modular a estrutura e a plasticidade de neurônios hipocámpais. Nos locais onde ocorre a mutação da PTEN, além das alterações morfológicas, observa-se deficiências nos dois maiores

indicativos de plasticidade sináptica (Sperow et al, 2012), o LTP (*long term potentiation*) e o LTD (*long term depression*), relacionados principalmente com a formação de memória e o aprendizado (Kwon et al, 2006; Wang et al, 2007; Fraser et al, 2008; Knafo 2017; Cabral-Costa, 2018).

Assim aumentam-se as evidências da relação da PTEN com as desordens neuropsiquiátricas. Indivíduos com comportamentos anormais e déficits cognitivos podem apresentar mutação no gene da PTEN, logo, fenômenos relacionados à neurogênese e plasticidade sináptica podem estar comprometidos. Mecanismos exatos dessas sinalizações e sua implicação no aparecimento de tais doenças ainda não são claros, o que dificulta um tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais. Intervenções não-farmacológicas têm demonstrado possuir efeitos neuroprotetores, o que pode possibilitar seu uso na prevenção ou no tratamento de certas doenças. O exercício físico parece ser um exemplo dessas intervenções não-farmacológicas.

2.4. Fatores ambientais: O exercício Físico

Na pesquisa em animais, podem ser utilizados dois paradigmas de exercício físico: o voluntário e o forçado. O exercício físico voluntário tenta mimetizar indivíduos que buscam o exercício físico por conta própria, enquanto o exercício forçado pode representar aqueles que realizam o exercício físico como terapia ou por tratamento (Alkhadi, 2018). Na literatura encontram-se estudos que demonstram os benefícios do exercício físico voluntário em algumas funções cerebrais, como o aumento da neurogênese no hipocampo (van Praag et al, 1999; Kemperman e Gage, 2000; Kempermann et al, 2010), da plasticidade sináptica e, por consequência, melhora cognitiva (Glicoroska, e Manchievska, 2010; Alkadhi, 2018). Esse fato parece se relacionar ao melhor desempenho de animais submetidos ao exercício físico em testes comportamentais, como o labirinto aquático de Morris, que envolve fenômenos de aprendizado e memória (Kemperman e Gage, 2000; Clelland et al, 2009; Creer et al, 2010; van Praag, 2008). No hipocampo, mais especificamente no

giro dentado, encontra-se a maior quantidade de neurônios recém-diferenciados, como efeito do exercício físico (van Praag, 2008), e ocorre a formação da chamada “reserva neurogênica” (Kempermann, 2008), que pode ser definido como um conjunto de neurônios que tem a possibilidade de se adaptar ao circuito neuronal no hipocampo.

Evidências apontam para o aumento da liberação de hormônios e fatores de crescimento como o fator de crescimento da insulina (IGF-1), o BDNF (van Praag, 2008) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), em decorrência da atividade física (Carro et al, 2000, Trejo et al, 2001; Kempermann, 2008). Além disso, há o envolvimento de neurotransmissores, como o glutamato e o GABA, no aumento da proliferação celular e da plasticidade neural. Após sessões de exercício físico voluntário, a concentração do GABA diminui no sistema nervoso e há aumento da expressão de genes relacionados ao sistema glutamatérgico, como algumas subunidades do receptor NMDA (Kempermann et al, 2001; Molteni et al, 2002; Gee et al, 2007).

O BDNF é um dos principais fatores relacionados ao fenômeno da plasticidade sináptica que pode ser modulado pela atividade física (Alkadhi, 2018). O BDNF pode ter ação neuroprotetora, por ser um dos principais fatores relacionados à neurogênese, age sobre a sobrevivência celular e a resistência ao estresse (Vayman et al, 2003). O receptor de BDNF, o TrkB (*tropomyosin receptor kinase B*), pode levar ao aumento da transmissão sináptica mediada pelo glutamato, bem como à redução da transmissão sináptica inibitória (De Almeida et al, 2018). A interação BDNF/TrkB pode mediar os efeitos benéficos do exercício físico na plasticidade sináptica e na cognição (De Almeida et al, 2018). O aumento de BDNF induzido pelo exercício físico pode ainda aumentar a atividade da forma fosforilada do CREB em níveis que podem perdurar além do período do exercício físico (Alkadhi, 2018).

As mudanças na plasticidade sináptica ocorrem na mesma região onde a neurogênese é estimulada pelo exercício físico. Um estudo feito por van Praag e colaboradores (van Praag, 1999), comparando camundongos submetidos ao exercício físico com os sedentários, concluiu que a amplitude do LTP melhorou significativamente no giro dentado dos indivíduos que passaram pelo exercício físico, um fenômeno indicativo de plasticidade sináptica. Associado a indução do LTP, o exercício físico também aumenta a densidade

das espinhas dendríticas, que são protusões da membrana dos dendritos onde ocorre a maioria das sinapses excitatórias (van Praag, 2009). Além disso, estudos, como o de Allen e colaboradores (Allen et al, 2001), apontam para uma relação positiva entre distância percorrida pelo animal, proliferação celular e sobrevivência.

O trabalho descrito por Ogawa e colaboradores, mostrou que camundongos *Ptenlox^{p/+}; Nse-Cre⁺* correm com maior velocidade do que os selvagens, porém os nocautes apresentaram um padrão de atividade diferente dos selvagens, sendo que o primeiro apresenta maior intervalo durante as corridas, enquanto o segundo corre a uma taxa constante.

Os benefícios do exercício físico podem se estender para a prole, quando este é praticado durante o período gestacional (Robinson e Bucci, 2014). Os efeitos positivos se apresentam nos aspectos cognitivos, bem como a memória de curta duração (Kim et al, 2003; Lee et al, 2006), os níveis de BDNF e VEGF (Asku, 2012), e a neurogênese. Esses efeitos podem se estender até a idade adulta (Robinson e Bucci, 2014), porém poucos trabalhos foram feitos para explorar esse tema, que é um dos objetivos do presente estudo (Alkadhi, 2018).

2.5 Sistema Cre/ Lox P

O desenvolvimento de animais nocautes condicionados em tecidos específicos e temporalmente definidos tem se mostrado uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos da PTEN em diferentes tipos celulares e em diferentes momentos do desenvolvimento do animal, visto que os animais com deleção total da PTEN durante a embriogênese são inviáveis (Di Cristofano, 1998; Suzuki et al, 1998; Podsypanina et al, 1999).

Esses estudos são possíveis graças à tecnologia do sistema Cre-LoxP. Este mecanismo foi descoberto no bacteriófago P1 como parte do ciclo de vida normal do vírus que usa a recombinação Cre-LoxP para circularizar e facilitar a replicação do seu DNA genômico (Sternberg e Hamilton, 1981; Araki et al, 1997; Dayi et al, 2012).

Com este avanço, a estratégia de recombinação Cre-Lox tem sido desenvolvida para manipulação do genoma e aplicada em diversos contextos, como culturas de células de mamíferos, leveduras, plantas e camundongos (Nagy et al, 2000). O sistema requer dois componentes: a Cre recombinase do bacteriófago P1, que é a enzima que catalisa a recombinação entre dois sítios LoxP (sítio de recombinação) que são sequências de 34 pares de base reconhecidas pela enzima, e cuja orientação determina se ocorre uma deleção, inversão ou translocação entre cromossomos. A maioria dos tipos de recombinação Cre-LoxP é proveniente da deleção, ou seja, dois sítios LoxP são posicionados (*LoxP-flanked* = floxed) um de cada lado da sequência que codifica o gene alvo. A enzima Cre pode ser expressa sob o controle de um promotor tempo e tecido-específico. No caso do presente projeto, o promotor é do gene da enolase, expressa estritamente em neurônios, dando origem aos nocautes condicionados apenas em neurônios (Sternberg e Hamilton, 1981) (Fig. 2).

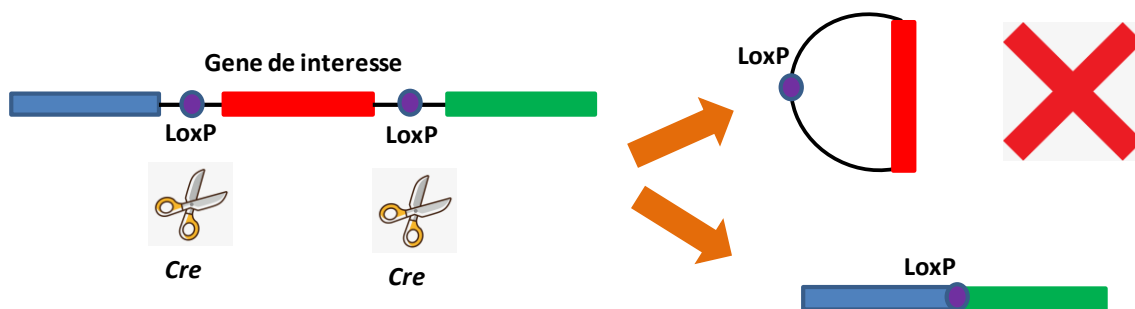


Figura 2. O sistema Cre/LoxP. O gene de interesse fica flanqueado entre dois sítios LoxP, cuja sequência de pares de base irá determinar uma translocação, inversão ou deleção do gene, este último demonstrado na figura. A presença da enzima Cre irá catalisar recombinação entre os sítios LoxP, formando um DNA circular contendo o gene de interesse que é eliminado pelo organismo, sobrando somente a fita com apenas um sítio Lox P e os genes adjacentes ao flanqueamento.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este projeto teve como objetivo caracterizar os efeitos mediados pelo exercício físico voluntário na interação materno-fetal sob alteração da via de sinalização da PTEN.

3.2. Objetivos Específicos

A. Avaliar a influência do exercício físico voluntário **em camundongos fêmeas** da linhagem $Pten^{loxp/+}Nse-Cre^+$, sejam do tipo *wyld type* (WT) ou do heterozigoto para a deleção do gene da PTEN (HT), em aspectos bioquímicos relacionados à via modulada pela PTEN e em aspectos cognitivos relacionados ao comportamento social e ao aprendizado e formação de memória.

B. Avaliar a influência do exercício físico voluntário **na prole masculina** (WT/HT) proveniente de camundongos fêmeas da linhagem $Pten^{loxp/+};Nse-Cre^+$ exercitadas ou sedentárias (controle), em aspectos bioquímicos relacionados à via modulada pela PTEN e em aspectos cognitivos relacionados ao comportamento social e ao aprendizado e formação de memória

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos adultos, machos e fêmeas, tanto nocautes condicionados da PTEN quanto *wild-type*, ambos os animais com idade entre 60 e 90 dias, provenientes do cruzamento de animais de diferentes genótipos. Abaixo, na figura 3, são demonstradas as possíveis combinações de genótipos dos animais utilizados nesse projeto, com a ressalva de que os animais homozigotos (HO) não são viáveis.

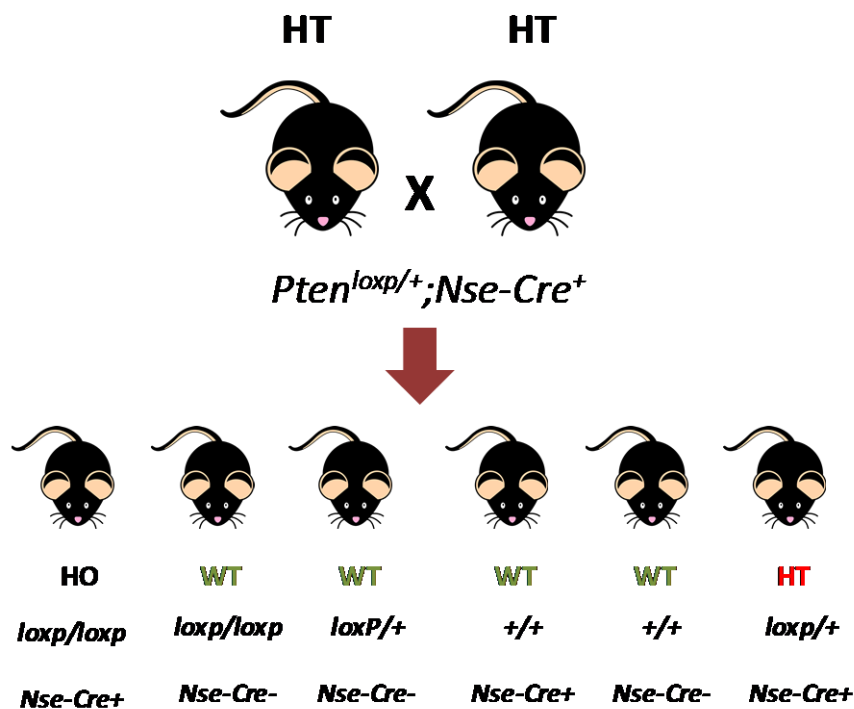


Figura 3. Representação esquemática do cruzamento de dois indivíduos heterozigotos. HO: homozigoto, WT: *wild-type*; HT: heterozigoto.

A linhagem $Pten^{loxp/+};Nse-Cre^{+}$ é proveniente do NIA/NIH (*National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD, EUA*), e foi gentilmente cedida pela Dra. Simonetta Camandola (*Laboratory of Neurosciences, NIA/NIH*). Os animais foram acondicionados no Biotério de Camundongos do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do

Departamento de Farmacologia do ICB/USP, em grupos de até cinco camundongos, em gaiolas plásticas esteve constante (22 ± 2 °C) e os animais foram mantidos sob um ciclo de iluminação controlado claro/escuro (claro entre 7 h – 19 h). Durante o período no qual os animais permaneceram em nosso biotério, foi fornecido água e ração *ad libitum*. No início do período experimental, todos os animais foram alocados em gaiolas individualmente, sendo os camundongos do grupo submetido ao exercício físico voluntário acondicionados em gaiolas com uma roda giratória instalada na sua parte interna.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (nº 114, fl. 24, livro 03) e o protocolo experimental seguiu todas as exigências descritas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)

4.2. Genotipagem da Linhagem Transgênica *Pten*^{loxp/+}; *Nse-Cre*⁺

A genotipagem foi realizada a partir de um fragmento de aproximadamente 2 mm da cauda dos camundongos, logo após o desmame, e os animais foram marcados utilizando um furador de orelhas. O protocolo foi baseado nas recomendações do fornecedor dos animais *Nse-Cre*⁺ (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, ME, EUA) e no protocolo aplicado no laboratório do Dr. Mark Mattson (*Laboratory of Neurosciences, NIA/NIH*, Baltimore, MD, EUA).

A cauda foi imersa em tampão de extração (NaOH 25 mM, EDTA 0,2 mM) por 1 h a 98 °C, sob agitação. A amostra foi acondicionada em gelo até que a temperatura da amostra chegasse aproximadamente à 15 °C e foi adicionada uma solução de Tris HCl 40 mM pH 5,5. Em seguida, foi centrifugada a 1.500 x g por 3 min e o sobrenadante foi recolhido. Uma alíquota foi retirada para a dosagem da concentração de DNA – realizada no leitor Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) – sendo o restante armazenado a -80 °C até a realização do ensaio de PCR. A PCR foi preparada adicionando-se: água DEPC (qsp); DNTP (200 µM); Tampão de Reação + NH₄OH (1X); Primer sense (Fw) (sequência do primer para Cre: 5'- AGG TGT

AGA GAA GGC ACT TAG C 3'; para Flox: 5' TGT TTT TGA CCA ATT AAA GTA GGC TGT 3') (10 pM); Primer anti-sense (Rev) (sequência do primer para Cre: 3' CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG G 5'; para Flox: 3' AAA AGT TCC CCT GCT GAT GAT TTG T 5') (10 pM); MgCl₂ (2,0 mM); Taq Polimerase (1 U) e amostra do DNA extraído (aproximadamente 400 ng/uL). Esse *pool* de reagentes foi colocado em termociclador (Techne, mod. FTC51H2D) e configurado o seguinte ciclo de reação: Cre – início: 95 °C por 2 min; 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 45 s; finalização 72 °C por 10 min e manutenção a 4°C; Flox - início: 95 °C por 2min; 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; finalização 72 °C por 10 min e manutenção a 4 °C.

Depois da realização do ciclo, foi adicionado *loading buffer* nas amostras (2 µL para cada 10 µL de amostra) e essas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1,8 g de agarose em 100 mL de TAE 1X e 10µL de brometo de etídeo) imerso em tampão TAE 1X (50X, 500 mL: 121 g de tris base, 28,5 mL de ácido acético glacial, 50 mL de EDTA, 0,5 M pH 8,0, água destilada q.s.p.). A cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte de energia e a corrida foi realizada a 100 V e 200 mA, por aproximadamente 50 min. A análise da corrida foi feita no fotodocumentador da marca G-Box (Syngene/Synoptics, Cambridge, Inglaterra).

A avaliação do genótipo dos alelos flanqueados pelo *LoxP* pode gerar três resultados: homozigoto (*Pten*^{loxp/loxp}), heterozigoto (*Pten*^{loxp/+}), ou *wild type* (*Pten*^{+/+}). No caso do gene da *Cre* possui apenas dois resultados: positivo (*Cre*⁺) ou negativo (*Cre*⁻) para o gene, uma vez que o *primer* utilizado não possibilita a distinção entre homozigoto positivo e heterozigoto, como ilustrado na figura 4.

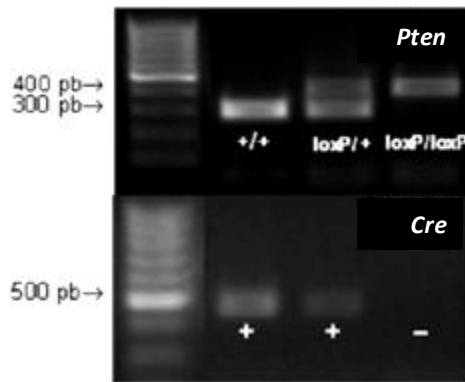


Figura 4. Imagem representativa da genotipagem da linhagem $Pten^{loxP/+}$ Nse-Cre⁺ realizada por eletroforese em gel de agarose. A banda da região próxima ao éxon 5 da PTEN, um dos sítios nos quais o loxP é inserido, tem aproximadamente 300 pares de base (pb).

4.3. Protocolo para o Exercício Físico Voluntário

Fêmeas da linhagem $Pten^{loxP/+};Nse-Cre^{+}$ foram divididas em quatro grupos: controle WT, controle HT (fêmeas sedentárias), exercício WT e exercício HT (fêmeas submetidas ao exercício físico voluntário). O protocolo de exercício físico voluntário (modificado de van Praag et al, 1999) consiste na disponibilização de uma roda giratória, dentro da caixa-moradia em tempo integral, possibilitando a realização de exercício físico voluntário. Inicialmente, foi realizado um experimento com duração de 10 dias, pois dados da literatura sinalizam que já ocorre aumento da neurogênese nesse período (Allen et al, 2001, van der Borght et al, 2006, Napoli et al, 2012). Antes do início da contagem do tempo experimental, os animais foram avaliados por 96h, a fim de se verificar sua motivação para andar nas rodas. Em caso negativo, trocou-se o animal por outro de genótipo semelhante e este também foi submetido ao mesmo tipo de avaliação. Para isto, utilizou-se de um aparato que detecta o número de giros da roda durante todo o período que o animal esteve nas gaiolas. Cada fêmea teve sua massa corpórea e consumo de ração avaliado semanalmente, durante o período experimental.

Após esse período de 10 dias foi colocado um camundongo macho HT com as fêmeas do grupo controle WT e exercício WT, próximo do período de maior atividade dos animais (começo da noite). Sete dias após um ciclo estral

completo da fêmea, o macho foi retirado e a fêmea permaneceu no mesmo ambiente com a roda giratória durante todo o período de gestação e amamentação. A prole somente foi separada da mãe após a data do desmame (21 dias).

Os filhotes machos obtidos ao atingir a idade entre 60 e 90 dias foram submetidos aos ensaios comportamentais e em seguida a eutanásia, por excesso de anestésico gasoso (isoflurano) seguido de decaptação, sendo dissecados o hipocampo e a região cortical (como mostrado na figura 5), destes animais para a utilização nos ensaios bioquímicos. As fêmeas obtidas nessas ninhadas foram destinadas para outros estudos.

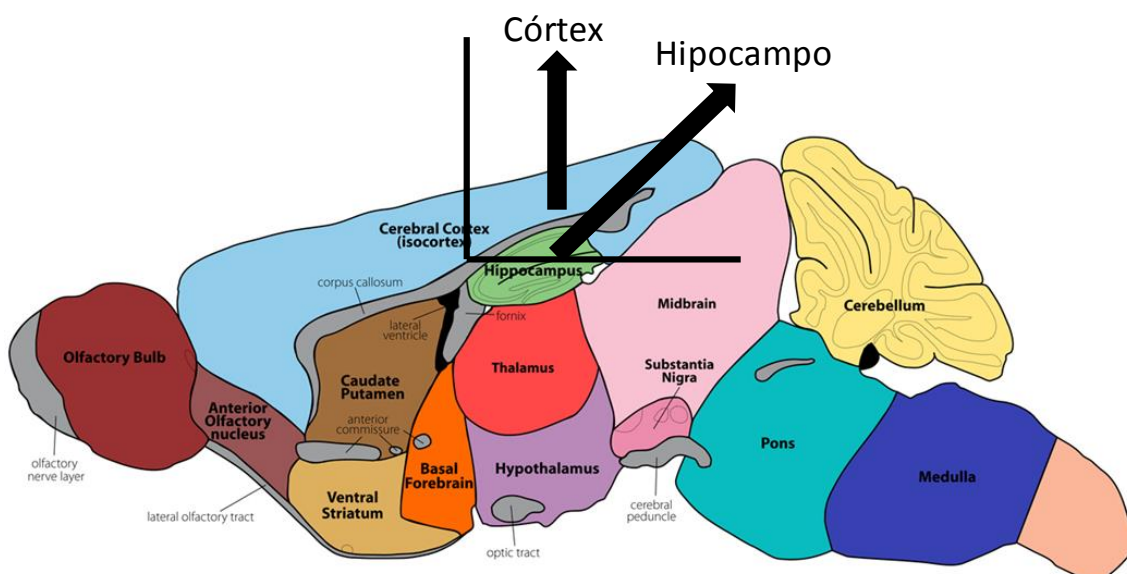


Figura 5. Representação esquemática dos locais de dissecação do cérebro de camundongos da linhagem $Pten^{loxP/+}; Nse-Cre^{+}$ (HCC - hipocampo; CTX - córtex; (fonte: <http://www.gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=39013>).

4.4. Testes Comportamentais

4.4.1. Campo Aberto

De acordo com a metodologia adaptada de Kawamoto e colaboradores, os animais foram acondicionados no centro de um aparato aberto de 40cm X 40cm e foram medidos os tempos de permanência desses animais no centro e

nas laterais do aparato durante 10 minutos de teste. O objetivo principal desse teste foi avaliar se a capacidade motora do animal não estava afetada, mas ainda pode-se determinar o comportamento ansioso do animal, caracterizado pela quantidade de tempo que o animal permanece na periferia ou no centro do aparato. O teste foi filmado através de uma câmera instalada na sala de ensaios comportamentais e as imagens foram analisadas através do software Anymaze® (Stoelting Co., EUA).

4.4.2. Labirinto em Cruz Elevado

O aparato consiste em um labirinto elevado cerca de 60cm do chão, composto de dois braços abertos opostos medindo 25 X 5cm cruzados por dois braços abertos de mesma medida. Cada animal foi colocado no centro do aparato e mediu-se durante 5 minutos a quantidade de vezes que o animal entra em cada tipo de braço e por quanto tempo permanece explorando o mesmo. Assim como o campo aberto, o teste permite determinar se o animal possui um comportamento ansioso. Se um animal passa muito tempo explorando somente os braços fechados, considera-se que ele apresenta um comportamento ansioso, já que o comportamento natural do roedor é explorar todo o ambiente (Texel et al, 2012). O teste foi filmado através de uma câmera instalada na sala de ensaios comportamentais e as imagens foram analisadas através do software Anymaze® (Stoelting Co., EUA).

4.4.3. Comportamento Social

4.4.3.1. Interação Social

O teste de interação social mensura a integração entre indivíduos da mesma espécie em um mesmo ambiente por certo período de tempo (Nadler et al, 2004). Para tanto, seguiu-se o seguinte protocolo, baseado nos trabalhos de Nadler e colaboradores. Em uma caixa de 20 cm X 40,5 cm X 22 cm, foram colocadas duas divisórias, formando três regiões: uma central e duas laterais.

Essa divisão foi feita por duas placas transparentes, com uma abertura de 3,5 cm de diâmetro, para passagem do animal. O animal testado foi colocado, então, no centro da caixa, por 5 min para habituação. Para prosseguir com o teste, o animal foi retirado e foram colocados dois objetos circulares nas laterais da caixa: um vazio e o outro contendo um indivíduo estranho ao camundongo em experimentação (o animal estranho foi previamente habituado ao aparato), que nunca teve qualquer tipo de interação com o animal teste. O objeto é utilizado para que o contato entre o indivíduo estranho e o experimental não seja de cunho agressivo ou sexual. Depois desse procedimento colocou-se novamente o animal teste no centro do aparato. Foram obtidos os tempos que os animais permaneceram em cada região da caixa e em contato direto com o objeto e com o animal estranho. As medições foram feitas durante 10 min. Após cada teste, o aparato foi limpo e a disposição do objeto vazio com o animal estranho foi alternada. A observação comportamental foi acompanhada por um sistema de captação digital computadorizado através do software Anymaze® (Stoelting Co. EUA).

4.4.3.2. Novidade Social

A segunda parte do teste de comportamento social, o teste de novidade social foi realizado 10 min após o teste de interação social. O animal estranho utilizado no teste anterior foi novamente utilizado em uma das laterais do aparato. Na outra lateral, no objeto que estava vazio, foi colocado outro animal estranho, que também foi previamente habituado a caixa de teste, porém sem ter tido nenhum tipo de contato com o animal teste. Assim como o protocolo anterior, o animal a ser avaliado permaneceu por 10 min dentro da caixa, onde foram efetuados os mesmos tipos de medições, para verificar a interação social com o animal já conhecido e um animal novo colocado no ambiente (Nadler et al, 2004). A observação comportamental foi acompanhada por um sistema de captação digital computadorizado através do software Anymaze® (Stoelting Co. EUA).

4.4.4. Labirinto Aquático de Morris

Este protocolo foi baseado no trabalho de Shaw e colaboradores. O labirinto aquático é uma piscina circular com água a 27°C corada com tinta branca não tóxica. Os animais apenas conseguem escapar da água subindo em uma plataforma submersa 0,5 cm abaixo da superfície da água – portanto, não visível – colocada, neste estudo, no quadrante superior esquerdo da piscina. A plataforma foi fixada durante o experimento, e, para a facilitação do aprendizado de sua localização, foram colocadas pistas ambientais nas paredes da sala. O experimento foi acompanhado pelo sistema de captação digital computadorizado através do software Anymaze®. Os camundongos foram submetidos, por 5 dias, a 4 sessões diárias nas quais eles foram desafiados a encontrar a plataforma escondida. Os animais dispuseram de 60 s para encontrá-la. Os animais que não acharam a plataforma nesse período de tempo foram conduzidos até a mesma e mantidos lá por 10 s. No último dia de treinamento, 4 h após a última sessão, a plataforma foi removida do local. A natação persistente no quadrante da plataforma é um indicativo da formação de memória espacial de curto prazo, e o tempo foi quantificado para a comparação entre os grupos. O mesmo procedimento de avaliação foi realizado 24 h após a última sessão, de forma a avaliar a memória de longo prazo.

4.4.5. Esquiva Inibitória

O protocolo da esquiva inibitória (92) é formado aparato consiste em dois compartimentos de acrílico do mesmo tamanho – um iluminado e o outro escuro – separados por uma porta automática, porém a região da câmara escura é eletrificada. Na sessão de treinamento, os animais foram colocados individualmente no compartimento iluminado e após 10 s a porta foi aberta. Assim que o camundongo entrou na câmara escura, a porta foi fechada e o animal recebeu uma descarga elétrica de 0,5 mA por 2 s. Imediatamente após o choque, o animal foi retirado do compartimento escuro e colocado de volta em sua gaiola. Vinte e quatro horas após a sessão de treinamento, os

camundongos foram submetidos à sessão de teste. Os animais foram colocados novamente no compartimento iluminado e foi medido o tempo que demoraram até entrar na câmara escura, com um tempo limite de 5 min. Com isso pode-se avaliar a memória relacionada ao medo do animal. A observação comportamental foi acompanhada por um sistema de captação digital computadorizado através do software Anymaze® (Stoelting Co. EUA).

4.5. Ensaio Bioquímicos

4.5.1. Extração de Proteínas Citosólicas e Nucleares

De acordo com Vasconcelos e colaboradores, os tecidos foram homogeneizados em *dounces* preenchidos com tampão de lise gelado (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM) adicionado de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM, Leupeptina 2 g/ml, Antipainá 2 g/ml) e fosfatases (NaF 30 mM, Na₃VO₄ 3 mM, Pirofosfato de Sódio 20 mM). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 s, 4°C, descartando-se o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuscitado com o mesmo tampão de lise descrito acima. Após este extrato passar 10 min em gelo, foi acrescentado NP40 10 % v/v em cada amostra e as mesmas foram vigorosamente agitadas por 30 s e em seguida centrifugadas a 12.000 x g por 30 s a 4°C. O sobrenadante foi então recolhido para o ensaio de *Western Blotting*. O *pellet* foi ressuscitado em tampão de extração (HEPES 20 mM, Glicerol 25 %, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 300 mM, EDTA 0,25 mM, PMSF 0,5 mM, Leupeptina 2 g/ml, Antipainá 2 g/ml, NaF 30 mM, Na₃VO₄ 3 mM, Pirofosfato de Sódio 20 mM) e incubado por 20 minutos em gelo seguido de centrifugação a 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante (extrato nuclear) foi recolhido e a concentração de proteínas determinada e as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso. O extrato nuclear foi utilizado para o ensaio do EMSA.

4.5.2. Determinação da Concentração de Proteínas

A dosagem da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente da BioRad (BioRad, Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm no leitor de microplacas (Asys UVM 340). A comparação com uma curva de concentração de albumina padronizada (BioRad Protein Assay Standard II) forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

4.5.3. Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

4.5.3.1. Marcação da Sonda

No protocolo descrito por Vasconcelos e colaboradores, o oligonucleotídeo do CREB (5'–AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC–3') foi marcado com a adição de γ -³²P ATP numa solução contendo Tampão T₄ quinase (Tris-HCl 700 mM pH 7,6, MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM), T₄ quinase e água, nas concentrações de 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T₄ quinase, 1 μ L de γ -³²P ATP (3000 Ci/mmol), 1 μ L de Tampão T₄ quinase (10X) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação a 37°C por 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25) em um tubo de microcentrífuga e centrifugou-se por 1 minuto a 3.000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo e aplicou-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação, o eluato foi recolhido e, no dia do ensaio, a atividade da sonda foi determinada, e foram somente utilizadas sondas com atividade final de 20.000 cpm/ μ L para o CREB.

4.5.3.2. Reação de Ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga 4 μ L de tampão de ligação 5X ($MgCl_2$ 5mM, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5mM, NaCl 300 mM, Tris-HCl 50mM pH 7,5, Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L, glicerol 20%), extrato nuclear (10 μ g de proteína) e água, para 20 μ L de volume final. O tubo foi incubado por 20 min a temperatura ambiente, adicionou-se em seguida a sonda marcada (1 μ L), e novamente o tubo foi incubado por 30 min a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μ L de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poli-acrilamida 5,5 % (acrilamida/bis-acrilamida 37,5: 1). Para a eletroforese foi utilizado o tampão TBE 0,5X (TBE 1X: Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). O gel foi corrido por aproximadamente 2h a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi submetido à secagem por vácuo, procedendo-se com a exposição do filme ao gel em cassete a $-80^\circ C$. Além dos ensaios de EMSA, foi realizado também o ensaio de competição, adicionando-se quantidades de oligonucleotídeo não-marcado 5, 10 ou 20 vezes em excesso e um oligonucleotídeo não-específico (TFIID) não-marcado 20 vezes.

4.5.4. Ensaio de *Western Blotting*

O ensaio de *western blotting* foi utilizado para a avaliação da expressão de proteínas relacionadas a via de sinalização modulada pela PTEN, além da expressão de marcadores de neurogênese e do fenômeno da plasticidade sináptica. Foram utilizados os seguintes anticorpos: PTEN Cell Signaling, cód. 1386G, diluição 1:1000; panAkt Cell Signaling, cód. 4685, diluição 1:1000; Akt fosfo-treonina 308, cód. 9271, diluição 1:1000; Sinaptofisina, Abcam, cód. Ab 8049, diluição 1:1000; PSD95 Santa Cruz, cód. sc71933, diluição 1:1000; NMDAR1, Cell Signaling, cód. 4204, diluição 1:1000; NMDAR1 fosfo-Serina 897, cód. 3385, diluição de 1:500; TrkB Cell Signaling, cód. 4603, diluição 1:1000; NR2A Cell Signaling, cód. 4205, diluição 1:1000; NR2B, cód. 4207, diluição 1:1000. O protocolo utilizado foi baseado no descrito por Laemmli (94).

A quantidade de proteína foi ajustada nas amostras a 2,0 µg/µL com o tampão de amostra (Tris-125 mM, SDS 4 %, glicerol 20 % v/v, DTT 200 mM, azul de bromofenol 0,02 %, pH 6,8) e foram incubadas por 5 minutos a 95 °C e imediatamente colocadas em gelo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10 % [acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1); 1 % de SDS], para que houvesse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %), sendo a corrida realizada em 2 h a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, Hercules, CA, EUA) por aproximadamente 90 min a 400 mA, utilizando um tampão de transferência (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Etanol 20 %).

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução vermelho de Ponceau (Ponceau-S 0,5 %, Ácido tricloro acético 5 %), lavadas com água bidestilada para que saísse o excesso da solução corante, e foram deixadas por 1 h em solução de albumina sérica bovina (BSA) 0,5 % em TBS-T (Tris-base 100 mM, NaCl 0,9 %, Tween 20 0,05 %), para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário por 2 h. A revelação foi feita através de kit de quimioluminescência (Millipore, Billerica, MA, EUA) e fotografadas no fotodocumentador G-Box (Syngene/Synoptics, Cambridge, Inglaterra). Para o controle endógeno dos extratos de tecido, foram utilizadas β-actina e α-tubulina.

4.6. Quantificação do BDNF

As dosagens de BDNF foram feitas por kits de ELISA segundo instruções do fabricante (Kit BDNF Emax® ImmunoAssay System, two sites, Promega, Madison, WI, USA), a partir de 50µL de homogenato de tecido hipocampal e cortical.

4.7. Avaliação da Neurogênese

Segundo protocolo adaptado de Lee e colaboradores, a bromodeoxiuridina (BrdU) é incorporada no DNA das células em divisão durante a fase S do ciclo celular. Os camundongos receberam injeção intraperitoneal de BrdU 50 mg/kg por 4 dias, e eutanasiados 1 semana após a última injeção de BrdU, para avaliação da proliferação das células progenitoras neuronais. Os animais foram perfundidos, para a fixação do tecido encefálico, com paraformaldeído (PFA) 4 %, e o cérebro foi posteriormente transferido para solução de sacarose 30 %. A estrutura foi então seccionada coronalmente em um micrótomo (35 μ M), a partir do início do hipocampo, e os cortes foram armazenados em solução *anti-freezing* (150g de Sacarose, 300mL de etilenoglicol, 500mL de PB 0,1M - 2,75 g de NaH₂PO₄ e 11g de Na₂HPO₄) ou em PBS 0,1M (PBS 10X: NaCl 82g; Na₂HPO₄ 10,5g e NaH₂PO₄ 3,55g; pH 7,2 qsp 1000 mL de água destilada) para posterior realização do ensaio de imunofluorescência.

4.8. Imunofluorescência

De acordo com protocolo descrito por Masson e colaboradores, contando com algumas adaptações, os cortes previamente obtidos foram incubados por 1h a 37°C em HCl 2N sob agitação branda. Em seguida, foi retirada a solução ácida e os cortes foram novamente submersos por duas vezes por 5min cada em solução tampão de Borato (1,24g de ácido bórico, 1,90g de tetraborato de sódio, 400mL de água). Ao término desse procedimento, retirou-se toda a solução tampão e os cortes foram submersos em solução de bloqueio (BSA 0,5%, leite em pó 0,5%, Triton X-100 0,01% em PBS) por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-BrdU (BioRad OBT0030 1:200) e anti-NeuN (Abcam 177487) em solução de incubação (BSA 0,5% e leite em pó 0,5% em PBS) por uma hora em temperatura ambiente sob agitação (Labroller

II, Labnet). No final desse período, os cortes foram mantidos em geladeira durante toda a noite.

No dia seguinte, após a retirada da solução de incubação, os cortes foram lavados em solução de PBS com 0,5% de Tween 20 em temperatura ambiente durante 10 min sob agitação branda, procedimento repetido por 6 vezes. Após as lavagens, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários AlexaFluor 488 anti-Rat 1:2000 e AlexaFluor 594 anti-Mouse ou Anti-Rabbit, em solução de incubação (BSA 0,5% e leite em pó 0,5% em PBS), por 2h à temperatura ambiente. Ao fim da incubação, os cortes foram novamente lavados por 6 vezes de 10min cada em solução de PBS com 0,5% de Tween20. Posteriormente, os cortes foram aderidos sob lâminas gelatinizadas, cobertos por solução de ImunoMount (Thermo) e selados com uma lamínula. Após secagem, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão), que possui o sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C, com aumento de 20X.

Para cada animal utilizado no experimento, foi confeccionada uma lâmina contendo de 6 a 8 cortes cada. O número total de células proliferativas, ou seja, as células que apresentaram marcação para BrdU (BrdU+) foram contabilizadas no giro dentado em cada corte e depois calculou-se a média da quantidade de células BrdU+ por lâmina. Para verificar quantas dessas células proliferativas eram neurônios, as imagens obtidas da marcação de BrdU e NeuN (NeuN+) foram sobrepostas e as células BrdU+ e NeuN+ resultantes dessa sobreposição de imagens foram contabilizadas como explicado anteriormente. As células BrdU+ e NeuN+ foram expressas como proporção (em %) das células proliferativas totais.

4.9. Análise dos Resultados

Os dados decorrentes do ensaio de EMSA e de *Western blotting* foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa “*ImageJ*” (National Institutes of Health, EUA). Os dados de *Western*

blotting, EMSA, ELISA, e do labirinto aquático de Morris receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de *Tukey*, em que as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p < 0,05$. Todos os gráficos foram representados como a média dos valores \pm erro padrão da média (EPM).

5. Resultados

5.1. Do estabelecimento da colônia da linhagem *Pten*^{loxp/+};*Nse-Cre*⁺

Como descrito no item 4.1, a colônia iniciou-se com quatro casais heterozigotos da linhagem *Pten*^{loxp/+} *Nse-Cre*⁺. que originaram os animais submetidos ao protocolo do exercício físico. Para saber o genótipo resultante dos filhotes, fez-se a extração do DNA e prosseguiu-se com o PCR. Animais heterozigotos da linhagem *Pten*^{loxp/+} *Nse-Cre*⁺ parecem possuir fertilidade reduzida, fato que dificultou de início a expansão da colônia da referida linhagem e da obtenção de filhotes para os protocolos descritos neste projeto.

5.2. Dados Referentes ao Exercício Físico Voluntário em fêmeas da linhagem *Pten*^{loxp/+}/*Nse-Cre*⁺

5.2.1. Distância percorrida, Massa Corpórea e Consumo de Ração

De acordo com o método descrito no item 4.3, os camundongos fêmeas *wild type* (WT) e heterozigoto (HT) foram expostas a uma roda de exercícios durante 10 dias. Dentro desse período, foi realizado acompanhamento da distância percorrida. Verificou-se que com o passar dos dias, não houve diferença significativa entre os genótipos quanto à distância percorrida por dia, sendo que as fêmeas de ambos os genótipos percorreram distâncias cada vez maiores com o passar do tempo. Animais WT passaram a percorrer distâncias diárias significativamente maiores a partir do quinto dia em relação ao primeiro

dia. Já os animais HT passaram a percorrer distâncias significativamente maiores em relação ao primeiro dia somente a partir do quarto dia (Fig 6A). Observou-se também que os animais apresentaram uma maior atividade entre 18-6h (período de escuro) independentemente do genótipo (Fig 6B).

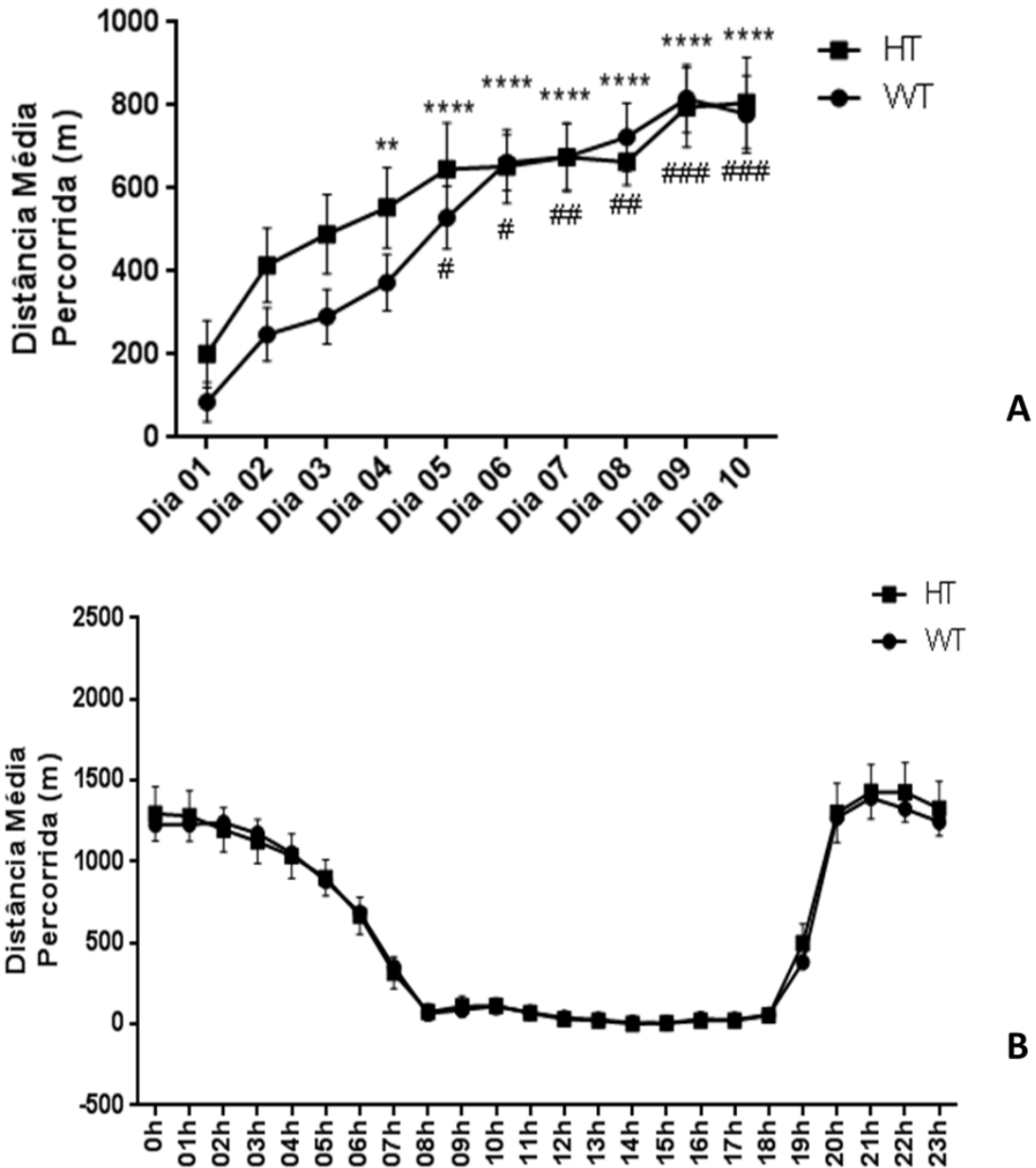


Figura 6. Avaliação da distância percorrida por camundongos fêmeas submetidas à roda de exercício. Em (A) a evolução das fêmeas na atividade com a roda giratória com o passar dos dias. Em (B) variação da atividade das fêmeas durante os períodos de claro e escuro no biotério. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=13 (WT) e n=9 (HT)) e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey). Para animais WT: **p<0,01 vs dia 01; ****p<0,0001 vs dia 01 e para animais HT: #p<0,05 vs dia 01; ##p<0,01 vs dia 01 e ###p<0,001 vs dia 01.

Duas outras medidas foram também avaliadas no protocolo do exercício físico voluntário: a massa corpórea e o consumo de ração, comparando-se as fêmeas submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário e as que

permaneceram na sua caixa moradia. Não houve diferença na variação de massa corpórea entre os grupos controle e exercício (Fig. 7A). Quanto ao consumo de ração, os animais exercitados consumiram mais ração em comparação às fêmeas controle, independentemente do genótipo (Fig. 7B).

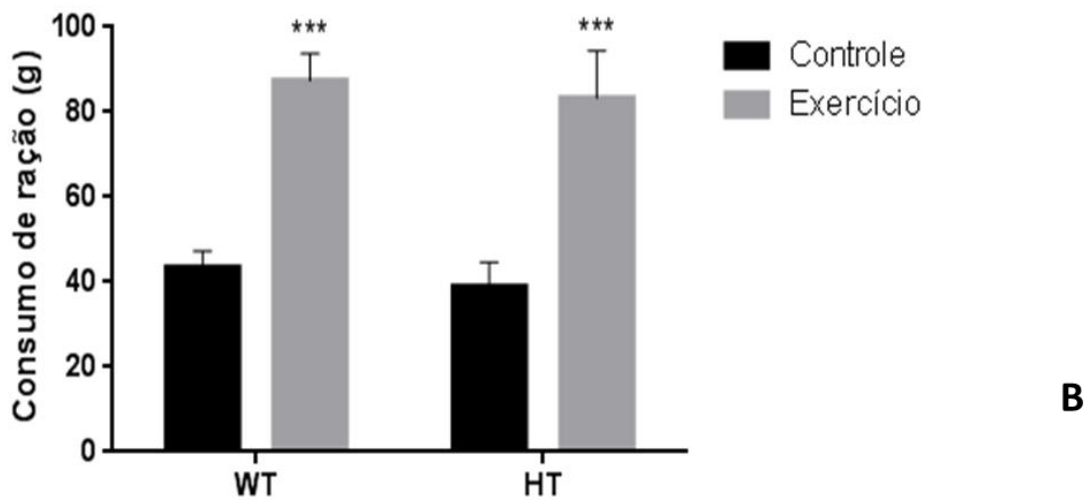
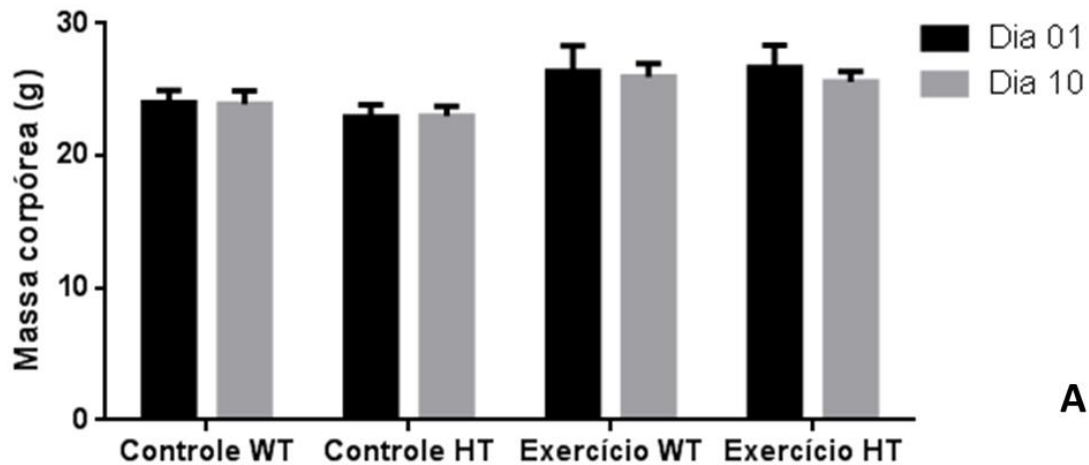


Figura 7. Diferença na massa corpórea (A) e no consumo de ração (B) após 10 dias de protocolo de exercício físico voluntário. Controle WT n= 8; Controle HT n=7; Exercício WT n=7; Exercício HT n=6. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ Controle WT vs Exercício WT e Controle HT vs Exercício HT.

5.2.2. Avaliação do perfil comportamental das fêmeas submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário.

Após o período de 10 dias em contato ou não com a roda de exercício físico voluntário, as fêmeas HT e WT foram submetidas a testes comportamentais como descritos a seguir.

5.2.2.1. Campo Aberto

O objetivo principal desse teste foi avaliar se houve alteração da capacidade locomotora do animal decorrente do protocolo experimental, mensurado por meio da distância percorrida no aparato e da velocidade média durante o ensaio. Não foi possível observar diferenças tanto na distância percorrida (Fig. 8A) quanto na velocidade média (Fig. 8B) durante o ensaio.

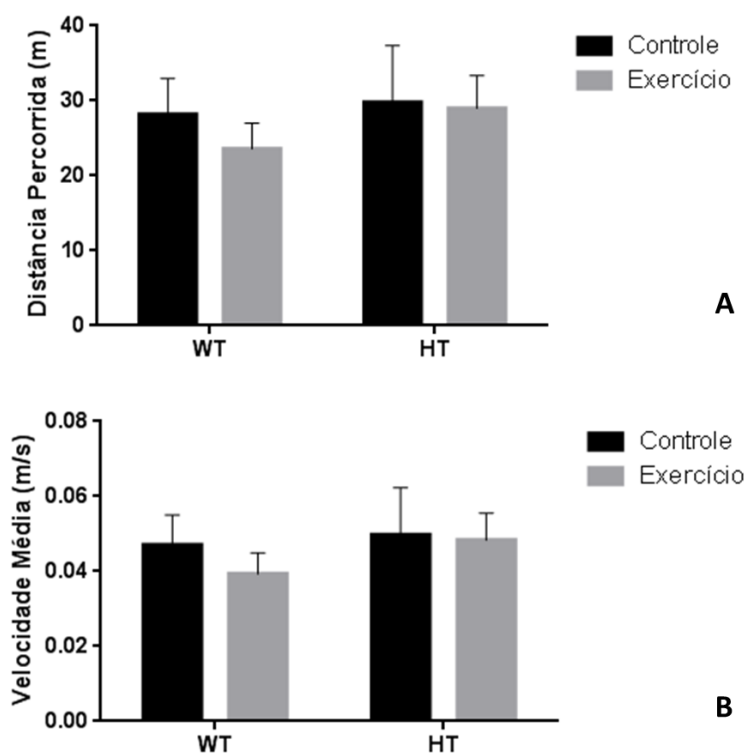


Figura 8. Distância total percorrida (A) e velocidade média (B) durante o teste do Campo Aberto por fêmeas sedentárias (Sedentária WT e Sedentária HT) ou submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 6; Sedentária HT, n= 4; Exercício WT, n= 7; Exercício HT, n=6. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

O Campo Aberto também pode ser utilizado como ferramenta para detecção de um comportamento ansioso nos animais e é determinado pela quantidade de tempo que os mesmos ficam no centro ou na periferia do aparato. Quanto maior o tempo que o camundongo passa na periferia, junto à parede do aparato, mais ansioso pode-se considerar esse animal (Kawamoto et al, 2013). A seguir são ilustrados o tempo e a distância percorrida pelas fêmeas no centro e na periferia do aparato (Fig. 9), porém, não foi possível observar diferença no comportamento ansioso dos grupos submetidos ao exercício voluntário ou que apresentam mutação no gene da PTEN (HT).

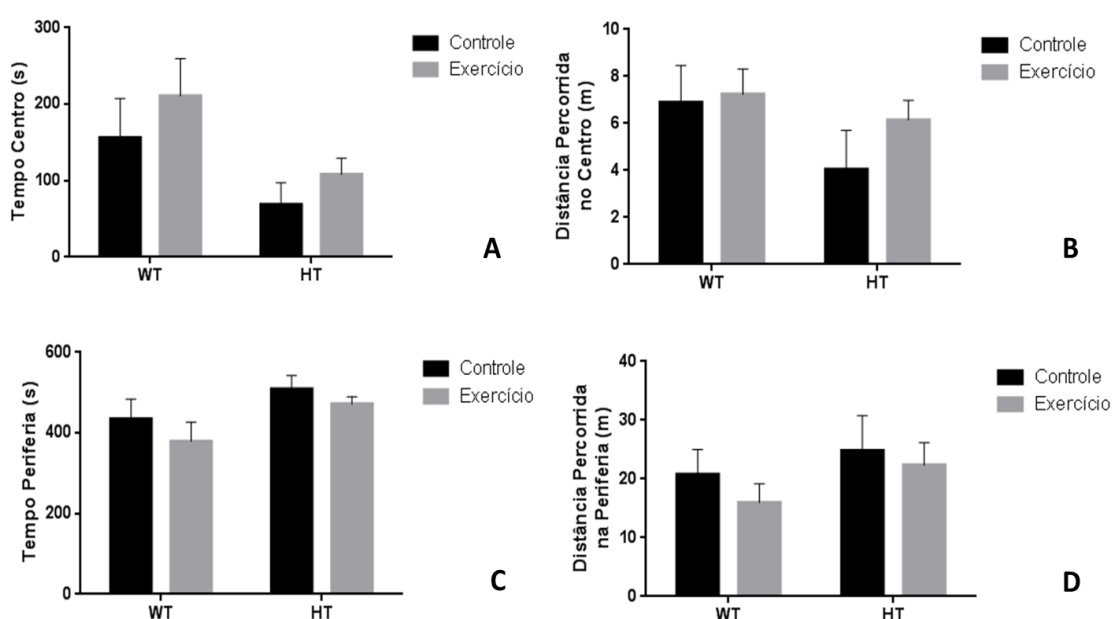


Figura 9. Tempo e distância no centro (A e B) e na periferia (C e D) do aparato durante o teste do Campo Aberto por fêmeas sedentárias (Sedentária WT e Sedentária HT) ou submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 6; Sedentária HT, n= 4; Exercício WT, n= 7; Exercício HT, n=6. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.2.2. Labirinto em Cruz Elevado

O teste do Labirinto em Cruz Elevado é um teste utilizado para avaliar o grau de ansiedade dos animais e é medido pelo tempo em que estes permanecem nos braços abertos e fechados do aparato. O animal caracterizado com um comportamento ansioso tende a permanecer mais tempo no braço fechado, local onde se sente mais seguro (Texel et al, 2012). Na figura 10 encontram-se os dados relativos ao tempo de permanência das fêmeas nos braços abertos e fechados do aparato. Analisando-se os dados obtidos, não foram observadas alterações relativas ao comportamento ansioso desses animais com a deleção da PTEN ou submetidos ao exercício físico voluntário.

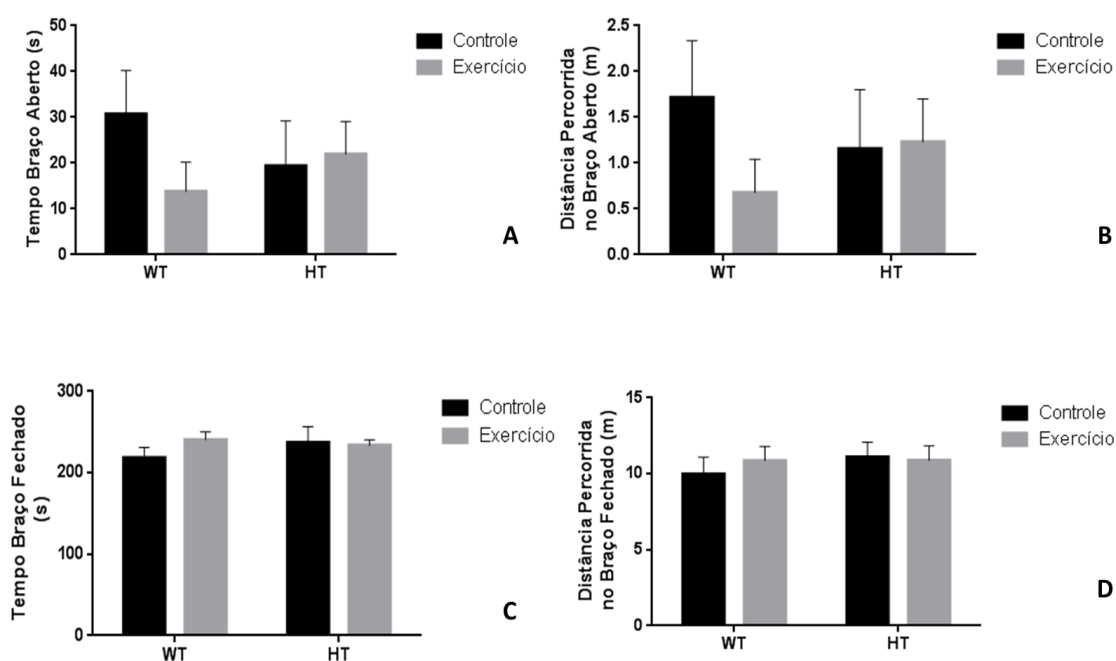


Figura 10. Tempo de permanência e distância percorrida nos Braços Abertos (A e B), e nos Braços Fechados (C e D) do aparato durante o teste do Labirinto em Cruz Elevado por fêmeas sedentárias (Sedentária WT e Sedentária HT) ou submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 6; Sedentária HT, n= 4; Exercício WT, n= 7; Exercício HT, n=6. Os resultados estão expressos como média±E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.2.3. Esquiva Inibitória

A esquiva inibitória é considerada um teste de memória associada ao medo e está relacionada a um estímulo intenso. A indução da formação de memória por meio desse teste está relacionada, principalmente, com a amígdala e o hipocampo (Izquierdo et al, 1999). Na figura 11 estão expressos os resultados obtidos neste experimento. Pode-se inferir a partir da figura que apenas o grupo exercício HT lembrou-se do estímulo aversivo administrado no dia do treino

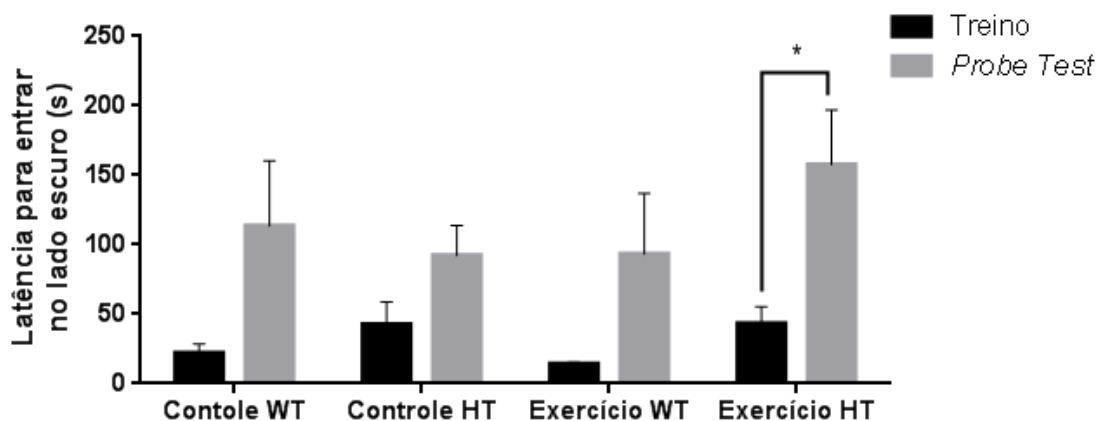
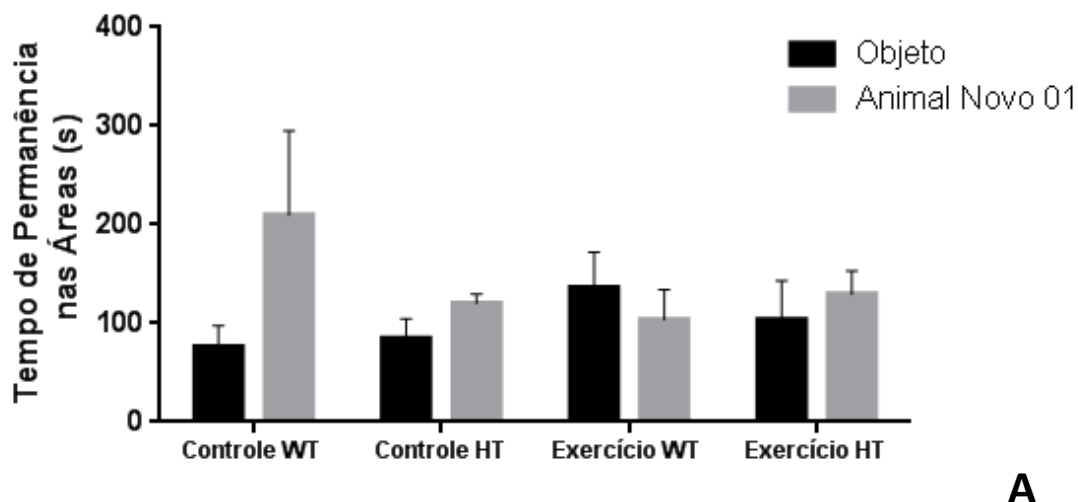


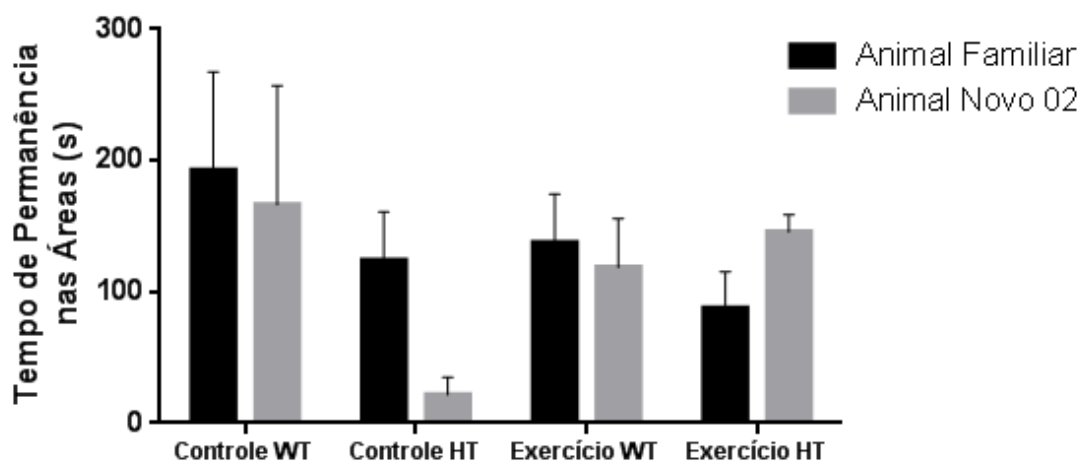
Figura 11. Comparação dos tempos de latência para entrada no lado escuro do aparato da Esquiva Inibitória no dia de treino (aplicação de choque de 0,4 mA por 2 s) e no dia do teste. Foram utilizadas fêmeas sedentárias (Sedentária WT e Sedentária HT) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 5; Sedentária HT, n= 4; Exercício WT, n= 6; Exercício HT, n=6. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.2.4. Comportamento Social

Como descrito na metodologia (item 4.4.3), o teste de comportamento social é dividido em duas etapas: na primeira etapa, o animal a ser testado é colocado em um aparato com três câmaras distintas, sendo que nas câmaras laterais são alocados um objeto e um animal desconhecido; na segunda parte do teste, o objeto é substituído por um animal desconhecido, e o animal utilizado na primeira fase do teste torna-se o animal familiar. Nas figuras a seguir, são ilustrados os resultados dos dois testes. No caso do presente estudo, não foi possível verificar nenhuma diferença no tempo de interação nos dois testes entre os grupos experimentais.



A



B

Figura 12. Comparação dos tempos de permanência nas câmaras contendo um objeto e um animal novo no primeiro teste do comportamento social (A). Tempo de permanência nas áreas com um animal familiar e um animal desconhecido (animal novo 2) (B). Foram utilizadas fêmeas sedentárias (Sedentária WT e Sedentária HT) ou submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 5; Sedentária HT, n= 4; Exercício WT, n= 7; Exercício HT, n=6. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.3. Ensaios Bioquímicos

5.2.3.1. Western Blotting

Foram realizados ensaios de Western Blotting no hipocampo para avaliar a expressão de proteínas envolvidas na sinalização da PTEN, tais como a própria PTEN, AKT total e fosforilada no resíduo treonina 308 (T308). Além disso, foi avaliada a expressão de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica, como sinaptofisina e PSD95, e ao processamento da formação de memória, como algumas proteínas associadas à sinalização glutamatérgica, tais como os receptores AMPA total e fosforilado no resíduo serina 897 (S897), NMDAR1 total e sua forma fosforilada na serina 547 (S547) e NR2B.

Após a análise da expressão das proteínas relacionadas à via da PTEN, não foi possível observar diferenças nos diferentes grupos experimentais. Nas figuras 13 e 14, estão ilustrados os resultados obtidos através desses experimentos.

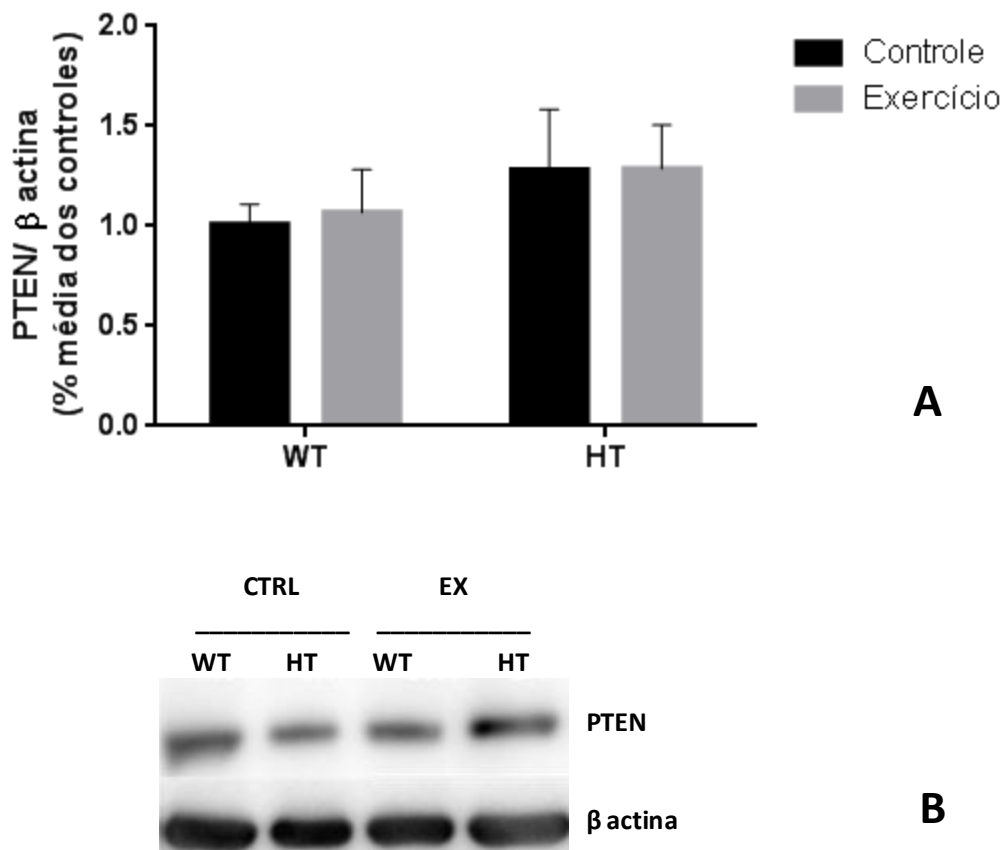


Figura 13. Expressão proteica da PTEN no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Sedentária WT,

n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=6; Exercício HT, n=5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

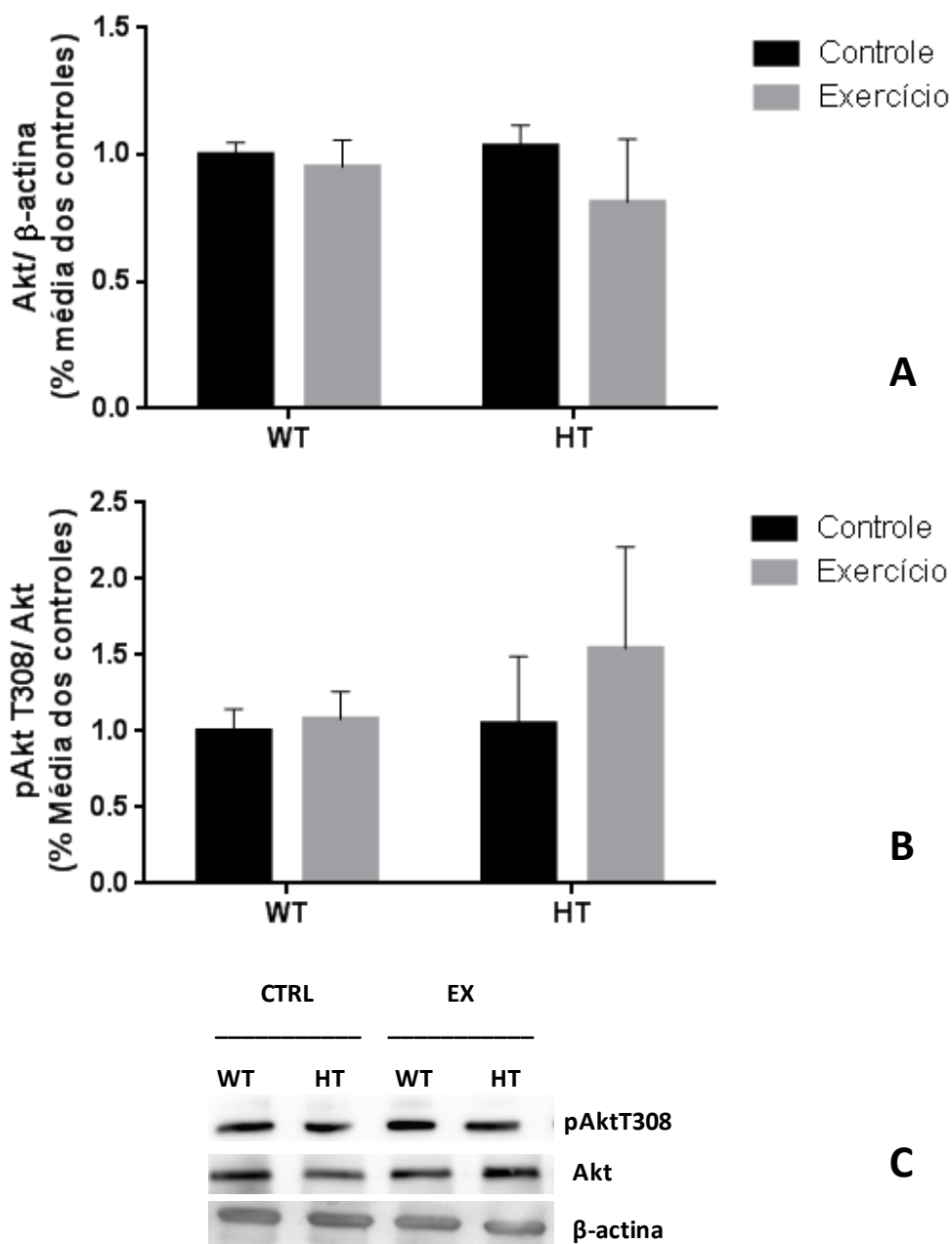


Figura 14. Expressão proteica da Akt (A) e sua forma fosforilada no resíduo Treonina 308 (pAktT308) (B) no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Em C, imagem representativa dos géis de *western blotting* quantificados. Sedentária WT, n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=5; Exercício HT, n=5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

Nas figuras de 15 a 19 são ilustrados dados sobre a expressão de marcadores moleculares relacionados ao fenômeno da plasticidade sináptica e

neurogênese, como receptores glutamatérgicos (NMDAR1, NMDAR2B e AMPAR) e proteínas relacionadas a vesículas sinápticas e de neurônios pós-sinápticos (Sinaptofisina e PSD95).

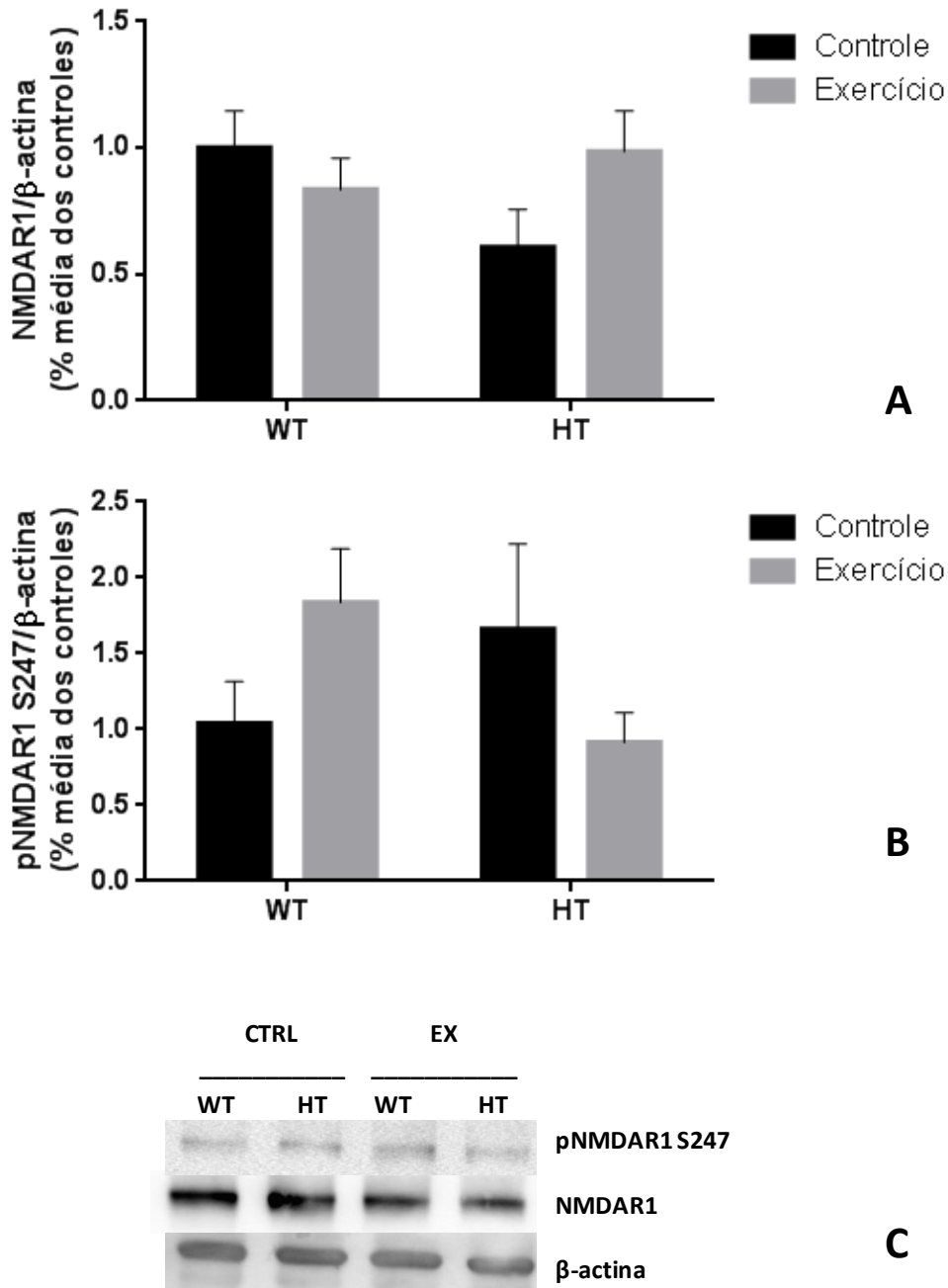
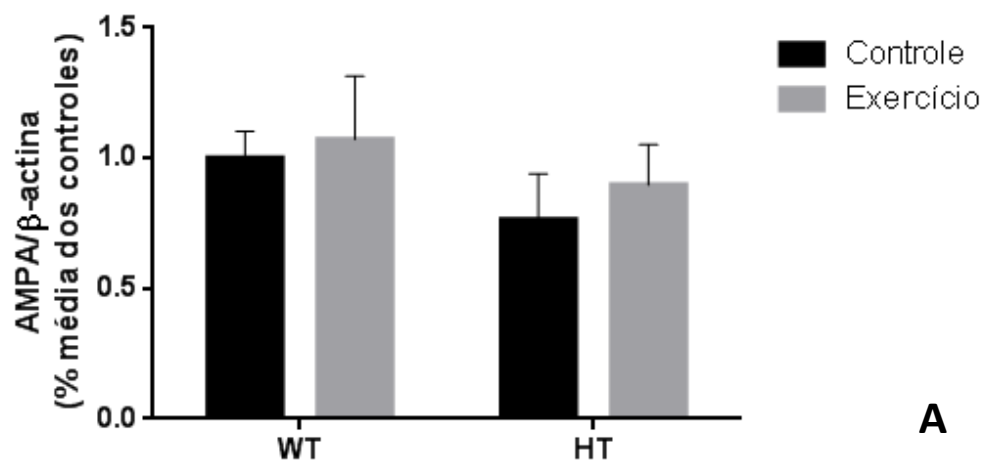
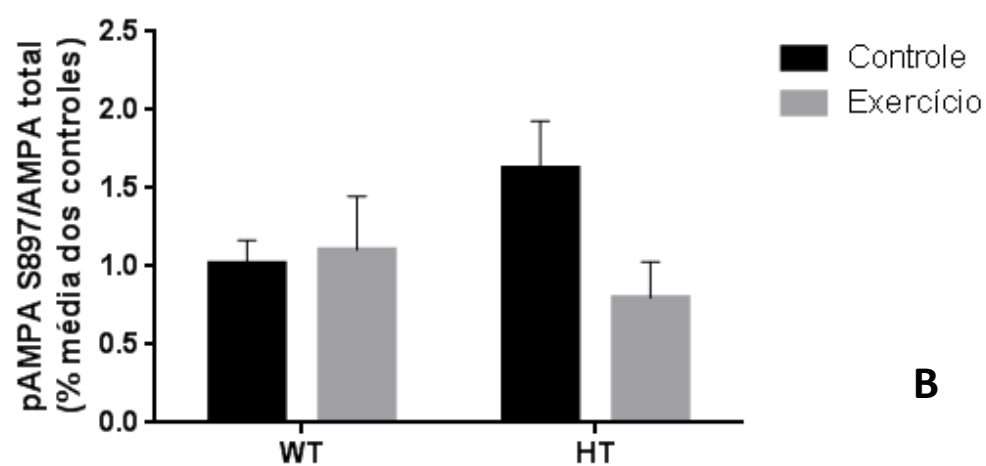


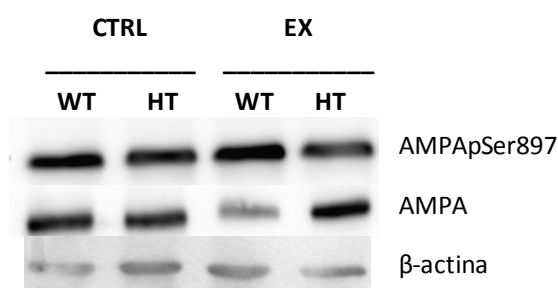
Figura 15. Expressão do receptor glutamatérgico do tipo NMDAR1 (A) e sua forma fosforilada no resíduo Serina 247 (pNMDAR1 S247) (B) no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Em C, imagem representativa dos géis de *western blotting*. Sedentária WT, n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=5; Exercício HT, n=5. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.



A

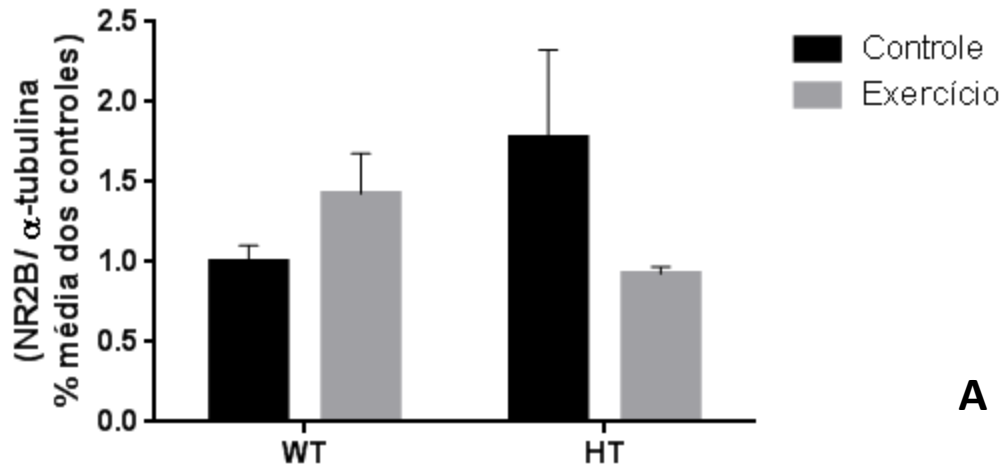


B

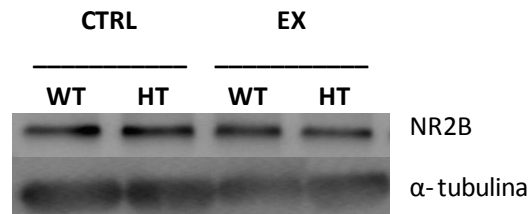


C

Figura 16. Expressão do receptor glutamatérgico do tipo AMPA e sua forma fosforilada no resíduo Serina 897 (pAMPA S897) no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Sedentária WT, n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=5; Exercício HT, n=5. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

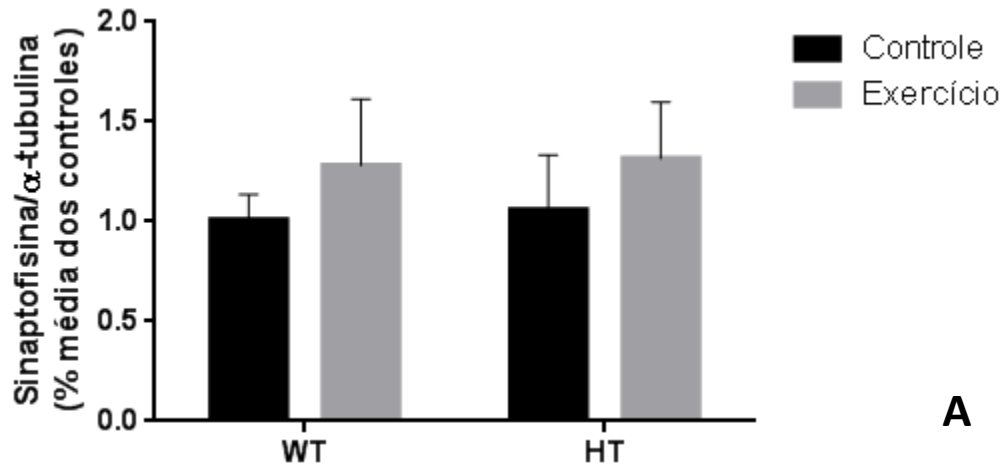


A

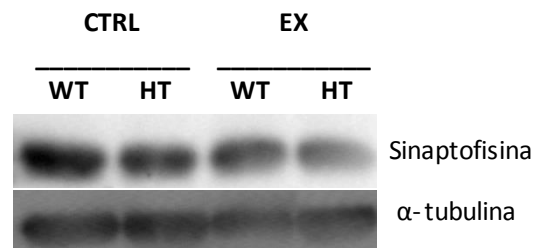


B

Figura 17. Expressão do receptor glutamatérgico do tipo NR2B no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Sedentária WT, n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=5; Exercício HT, n=5. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.



A



B

Figura 18. Expressão da proteína de vesícula sináptica sinaptofisina no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Sedentária WT, n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=5; Exercício HT, n=5. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey

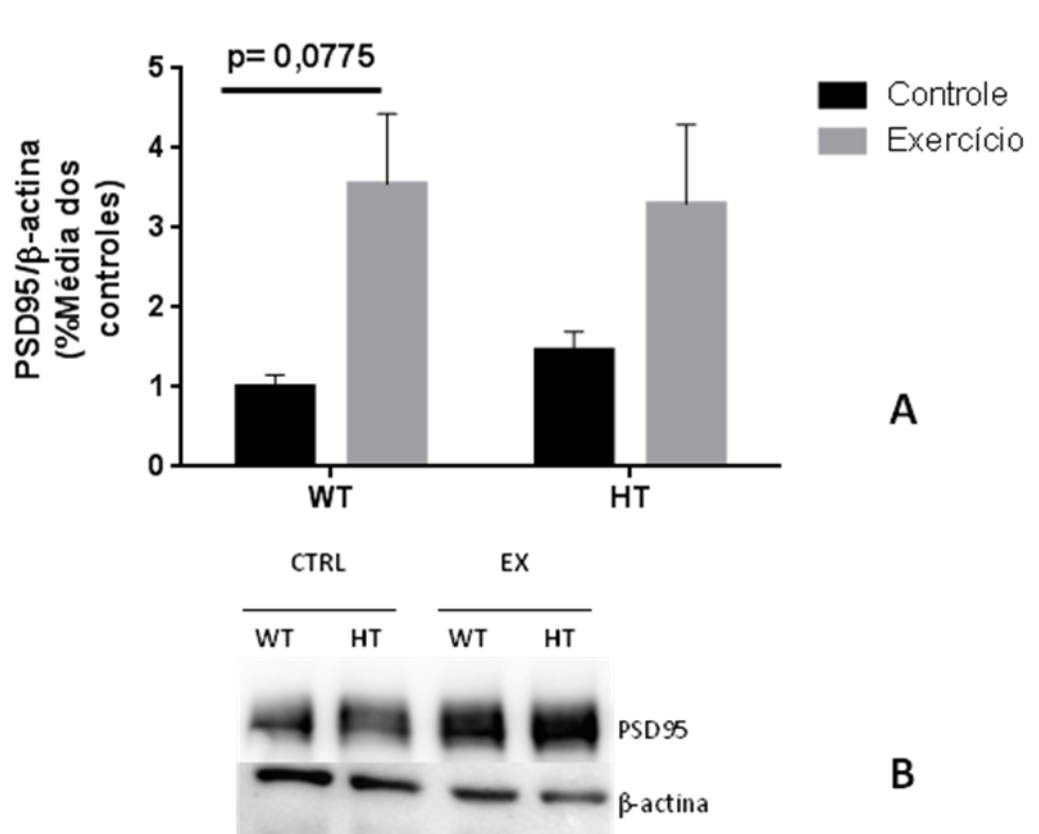


Figura 19. Expressão da proteína PSD95 no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Sedentária WT, n= 7; Sedentária HT, n= 6; Exercício WT, n=5; Exercício HT, n=5. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.3.2. Análise da expressão do CREB (cAMP response element-binding protein) via EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

O CREB (*cAMP response element-binding protein*) é um fator de transcrição que, ao ser ativado, pode influenciar diretamente na produção da neurotrofina BDNF (Maehania e Dixon, 1998; Barnes et al, 2014) e pode estar relacionado a um aumento na excitabilidade de neurônios e com isso, pode promover um aumento de fenômenos relacionados a plasticidade sináptica, como o LTP (*Long Term Potentiation*) (Caracciolo et al, 2018). Para dosar a atividade do CREB nos animais utilizados neste projeto, foram realizados ensaios de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA). Na figura 20 encontra-se ilustrado o resultado desse ensaio.

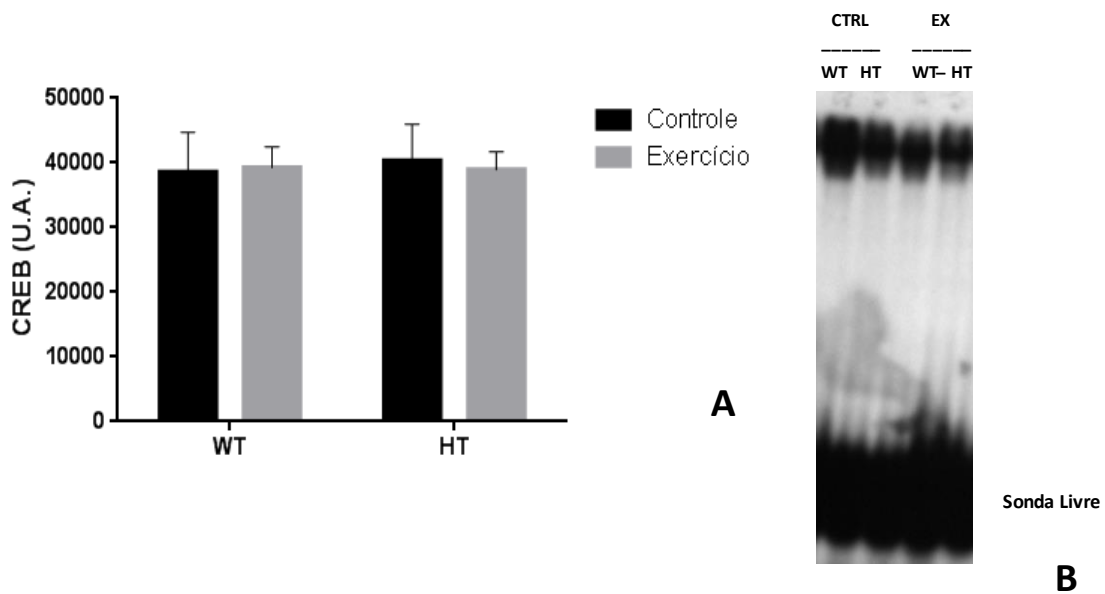


Figura 20. Expressão do fator de transcrição CREB no hipocampo (A) e autorradiografia de ensaio de EMSA (B) de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício); n=3-5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

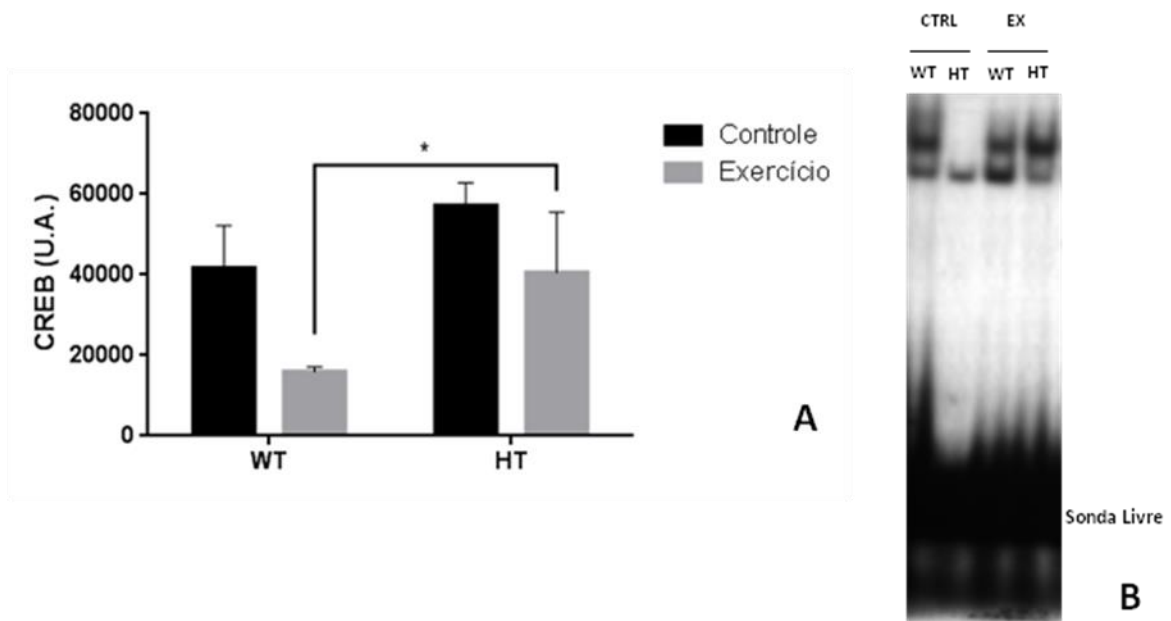


Figura 21. Expressão do fator de transcrição CREB no Córtex (A) e autorradiografia de ensaio de EMSA (B) de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Hipocampo: n de 3-5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.*p<0,05 exercício WT vs exercício HT.

De acordo com a figura 20 e 21, pode-se observar um aumento na expressão de CREB no grupo exercício HT quando comparado ao grupo WT submetido ao protocolo de exercício físico voluntário, porém essa diferença não fica evidenciada em comparação a animais sedentários do mesmo genótipo.

5.2.3.3. Quantificação do BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro).

A neurotrofina BDNF pode ter um papel fundamental na neuroproteção, na diferenciação e no crescimento de novos neurônios, bem como na formação de novas sinapses (Hyman et al, 1991). Assim como a PTEN, quando ligado ao seu receptor TrkB, o BDNF pode ainda modular a via da PI3K (Numakawa, 2010) Na figura 22 estão ilustradas as concentrações de BDNF nos diferentes grupos experimentais utilizados nesse projeto, porém não foram encontradas alterações na concentração de BDNF em animais com a mutação no gene da PTEN e submetidos ao exercício físico voluntário.

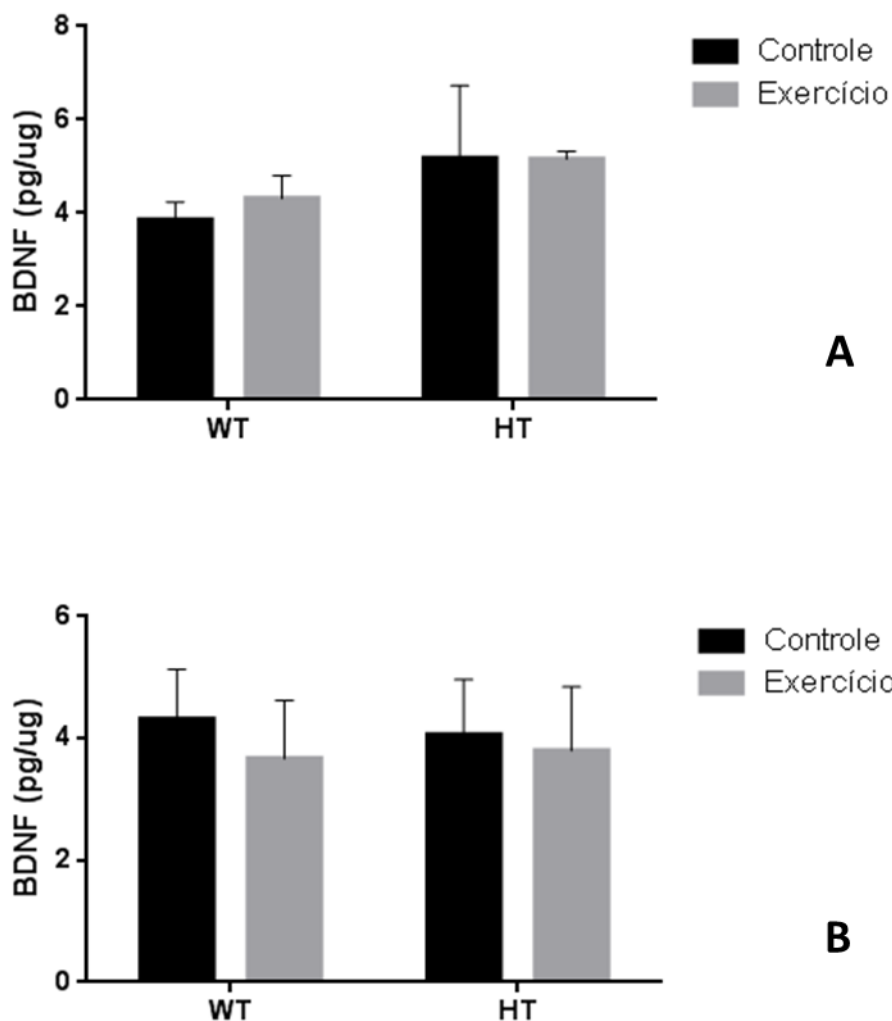


Figura 22. Concentração do BDNF no hipocampo (A) e no córtex (B) de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Hipocampo: n de 3-5; Córtex: n=4. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2.4. Resumo dos dados obtidos pelo protocolo de exercício voluntário nas fêmeas WT e HT

Baseado nos resultados descritos nos itens anteriores, após dez dias submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário, verificou-se um aumento na distância percorrida pelos animais ao longo dos dias de experimento, bem como o consumo de ração pelos mesmos, independentemente do genótipo desses animais. Em relação aos aspectos comportamentais, o único grupo que apresentou um aumento de latência significativa para adentrar na câmara

escura do aparato da esquia inibitória foi o grupo exercício HT, portanto o exercício voluntário pode ter influenciado positivamente o aprendizado e a formação de memória nesses animais, fato não observado em animais HT sedentários. Apesar da mutação presente no gene da PTEN, não foram observadas alterações na própria concentração da PTEN nos animais HT, tampouco alterações na expressão de outros elementos da via da PI3K/PTEN Akt. Os marcadores referentes ao fenômeno da plasticidade sináptica também não sofreram alterações independentemente do genótipo e do protocolo de exercício voluntário, o mesmo cenário se aplicou à neurotrofina BDNF. No caso do fator de transcrição CREB observou-se somente um aumento na sua atividade no grupo exercício HT em comparação ao grupo exercício WT, porém não foram acusadas diferenças na concentração do CREB quando comparou-se os grupos sedentários WT e HT com os respectivos grupos submetidos ao protocolo de exercício físico voluntário.

Quadro 1 – Resumo dos resultados Resumo dos dados obtidos pelo protocolo de exercício voluntário nas fêmeas WT e HT (- : sem alteração; + alteração observada).

Ensaio	Grupos Experimentais			
	Controle WT	Controle HT	Exercício WT	Exercício HT
Ensaio Comportamentais				
Campo Aberto	-	-	-	-
Labirinto em Cruz Elevado	-	-	-	-
Comportamento Social	-	-	-	-
Esquia Inibitória	-	-	-	+
Ensaio Bioquímicos				
PTEN	-	-	-	-
pAkt/Akt	-	-	-	-
pNMDAR1/NMDAR1	-	-	-	-
NMDAR2B	-	-	-	-
pAMPA/AMPA	-	-	-	-
PSD95	-	-	-	-
Sinaptofisina	-	-	-	-
BDNF	-	-	-	-
CREB	-	-	-	↑ vs Exercício WT

5.3. Dados referentes aos efeitos do exercício físico materno na prole.

5.3.1. Ensaio Bioquímicos realizados com o hipocampo das Progenitoras

Foram analisados por esse ensaio algumas proteínas que podem estar relacionadas aos fenômenos da plasticidade sináptica nas progenitoras submetidas a cerca de 60 dias de exercício voluntário, desde o início do protocolo, sendo 10 dias de exercício, 4 dias com o macho para acasalamento, 21 dias de prenhez e mais 21 dias de amamentação. As figuras 23, 24 e 25 ilustram os dados obtidos quanto a essas análises.

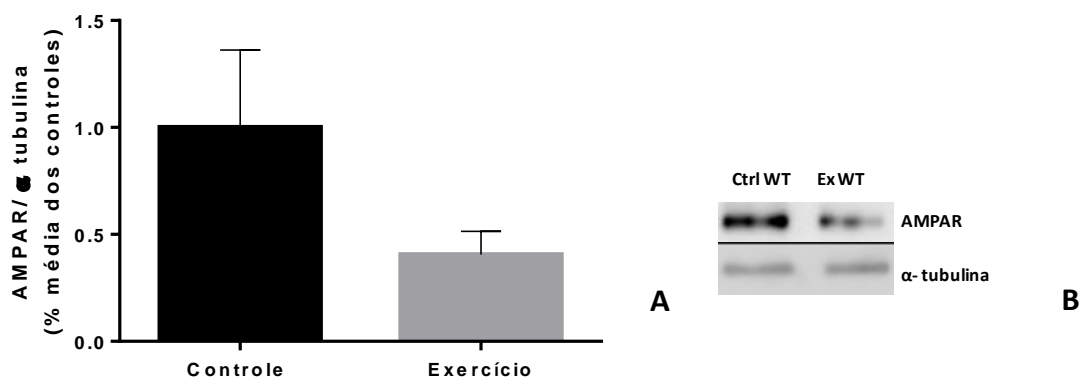


Figura 23. Expressão do receptor glutamatérgico do tipo NMDAR1 (A) no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Em B, imagem representativa dos géis de *western blotting*. Controle n=7; Exercício n=5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

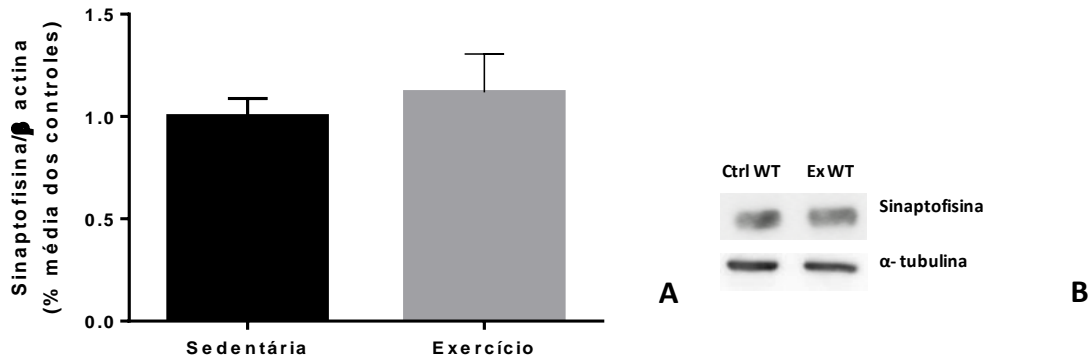


Figura 24. Expressão de sinaptofisina (A) no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Em B, imagem representativa dos géis de *western blotting*. Controle n= 7; Exercício n=5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

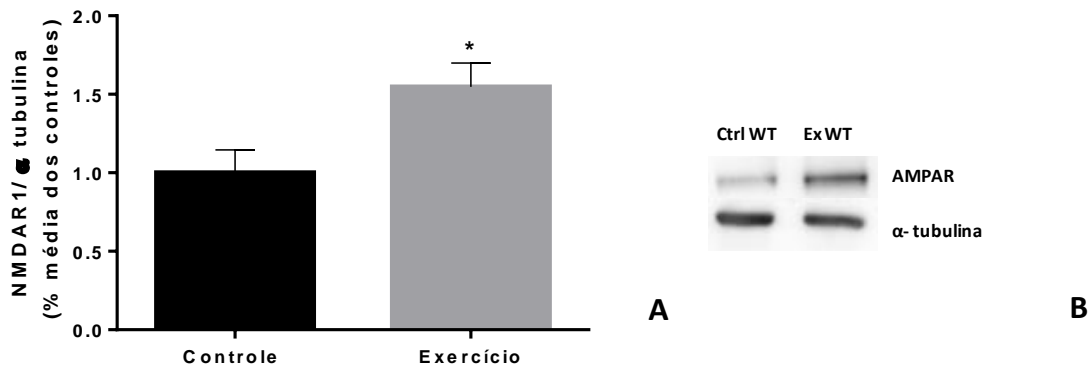


Figura 25. Expressão de do receptor glutamatérgico NMDAR1 (A) no hipocampo de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Em B, imagem representativa dos géis de *western blotting*. Controle n= 7; Exercício n=5. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

Observou-se somente um aumento da expressão do receptor de NMDAR1 nas progenitoras WT submetidas ao protocolo de exercício voluntário. A seguir, nas figuras 26 e 27 mostram o resultado obtido quanto à atividade do CREB e a concentração do BDNF nessas progenitoras após o período de exercício voluntário.

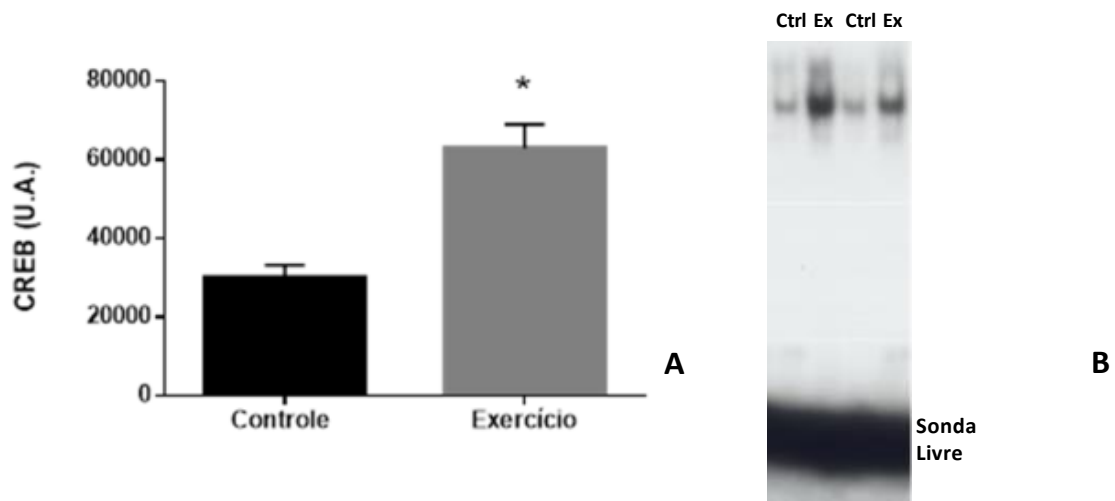


Figura 26. Atividade do fator de transcrição CREB no hipocampo (A) e autorradiografia de ensaio de EMSA (B) de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). $n=5$. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p<0,05$ exercício WT vs exercício HT.

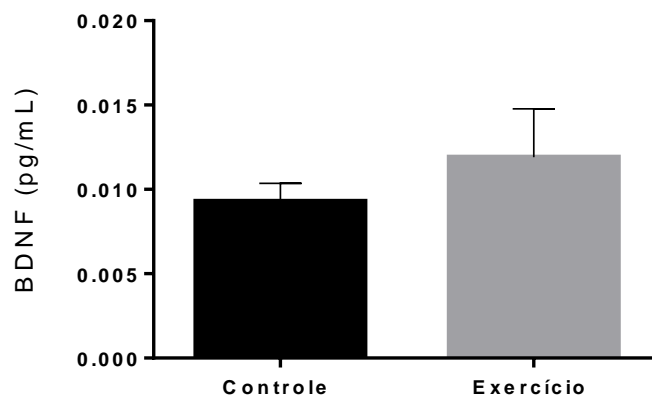


Figura 27. Concentração do BDNF no hipocampo (de camundongos fêmeas sedentárias (Controle) e submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício). Hipocampo: $n=8$. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e seguido pelo pós-teste de Tukey.

No caso do fator de transcrição CREB, foi observado um aumento da sua atividade nas fêmeas exercitadas, em comparação às fêmeas controle, porém quanto a expressão do BDNF não foi observada nenhuma alteração significativa.

5.3.2. Avaliação do perfil comportamental da prole após o protocolo do exercício físico voluntário materno.

Nas seções anteriores, foram apresentados os resultados acerca das fêmeas submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário. A partir desta seção, são descritos os resultados obtidos dos filhotes machos provenientes dessas fêmeas que passaram pelo protocolo de exercício físico. Esses camundongos foram divididos em quatro grupos: machos WT provenientes de progenitora sedentária (Controle WT); machos WT provenientes de progenitoras que realizaram o protocolo de exercício voluntário (Exercício WT); machos HT provenientes de progenitora sedentária (Controle HT) e machos WT provenientes de progenitoras que realizaram o protocolo de exercício voluntário (Exercício HT).

5.3.2.1. Campo Aberto

De acordo com o descrito nos métodos, seguem os resultados relacionados ao tempo de permanência e a distância percorrida pelos animais na periferia e no centro do aparato.

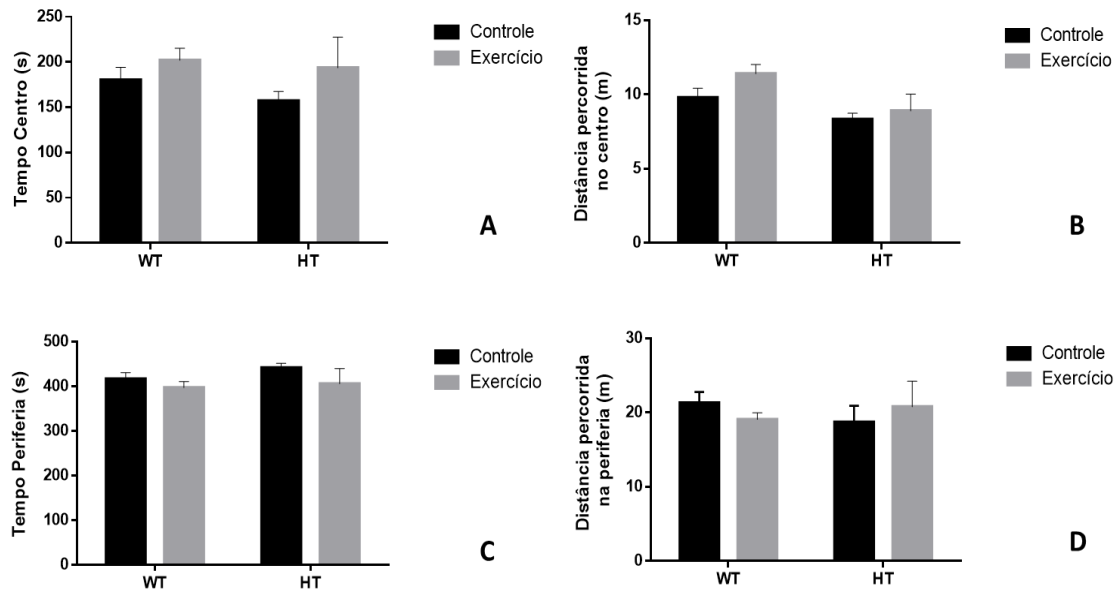


Figura 28. Tempo e distância no centro (A e B) e na periferia (C e D) do aparato durante o teste do Campo Aberto por machos cujas progenitoras eram sedentárias (Controle WT e Controle HT) ou cujas progenitoras foram submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

Assim como avaliado nas fêmeas, os resultados ilustrados pela figura 28 sugerem que os animais do nosso modelo com a deleção condicionada (HT) não apresentam diferenças em sua atividade locomotora e no comportamento ansioso mensurado pelo teste do campo aberto.

5.3.2.2. Labirinto em Cruz Elevado

O experimento foi realizado de acordo com o descrito nos métodos e foram obtidos os resultados ilustrados na figura 29.

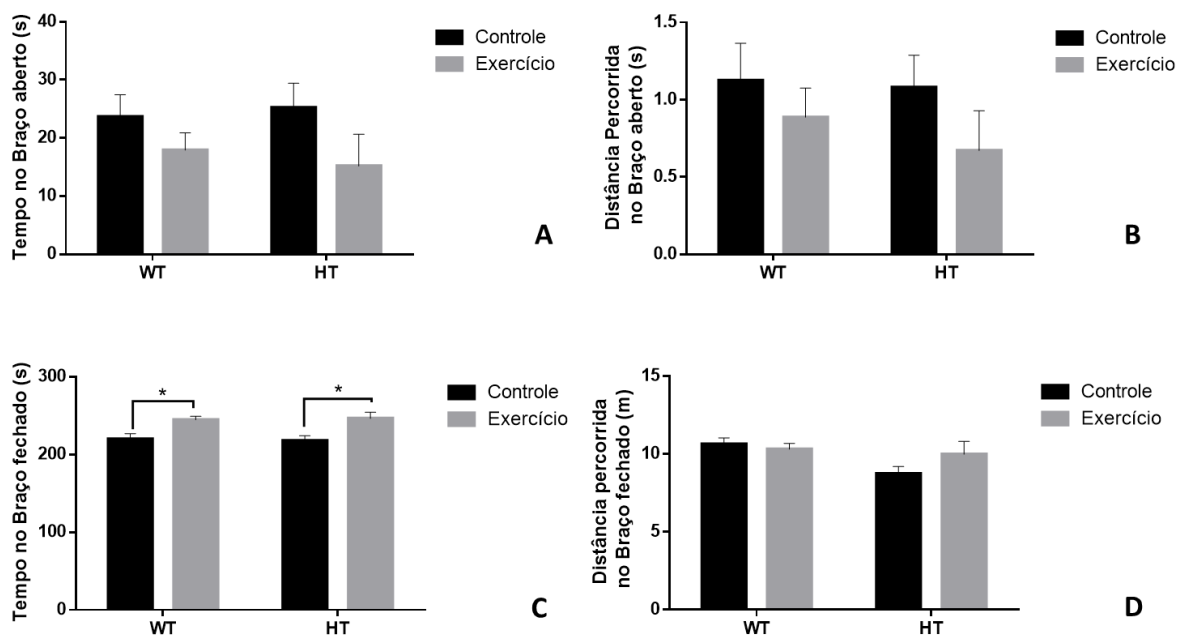


Figura 29. Tempo e distância nos braços abertos (A e B) e nos braços fechados (C e D) do aparato durante o teste do Labirinto em Cruz Elevado por machos cujas progenitoras eram sedentárias (Controle WT e Controle HT) ou cujas progenitoras foram submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ para Controle WT vs Exercício WT e para Controle HT vs Exercício HT.

Os dados obtidos através do teste do Labirinto em Cruz Elevado, mostra que camundongos, cuja progenitora foi submetida ao exercício físico voluntário, podem apresentar comportamento ansioso, independente do genótipo do animal. Esse dado é revelado através da diferença no tempo de permanência no braço fechado do aparato, animais que tiveram a influência do exercício materno passaram menos tempo no braço fechado em comparação à prole cujas progenitoras não tiveram acesso a roda de exercício físico voluntário.

5.3.2.3. Comportamento Social

As proles WT e HT provenientes de fêmeas sedentárias e submetidas ao protocolo do exercício físico voluntário passaram pelo teste de comportamento social. Na figura abaixo, são ilustrados os resultados obtidos do conjunto de testes de comportamento social.

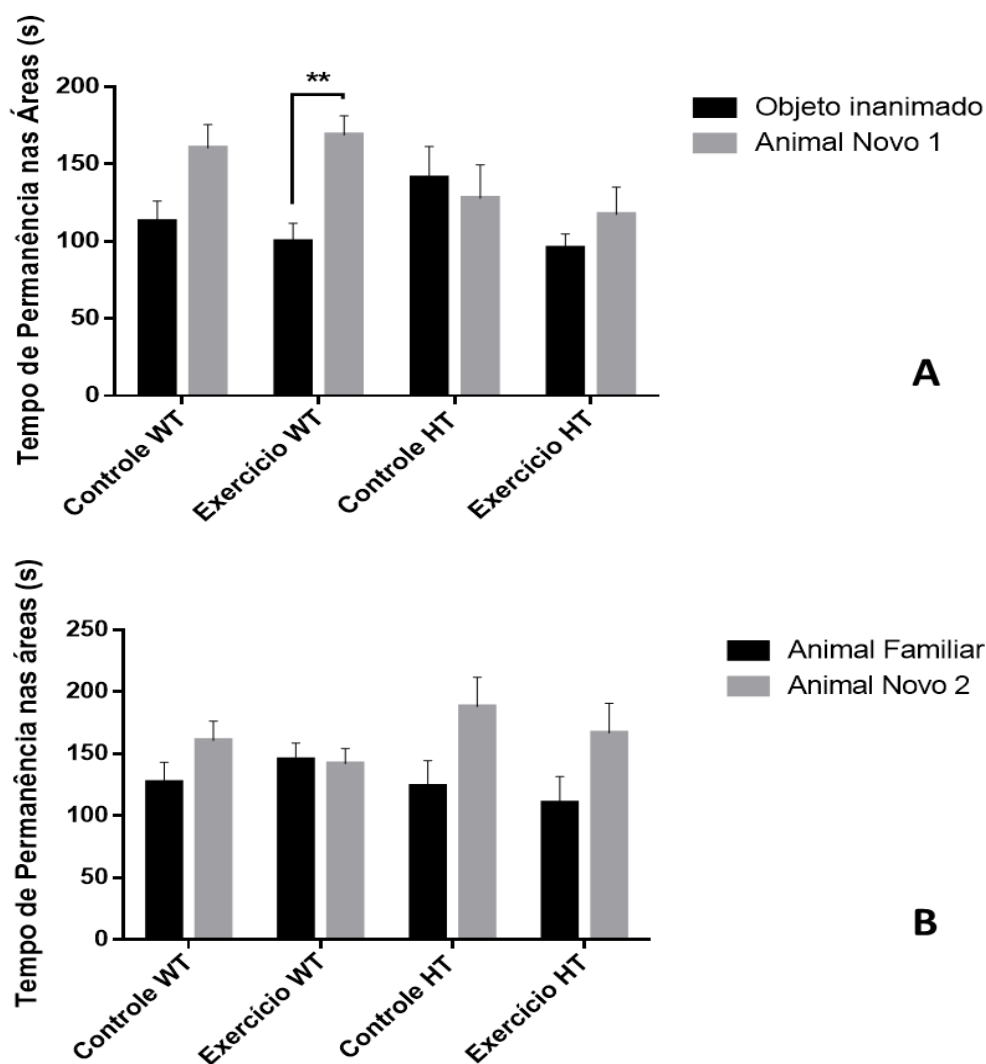


Figura 30. Tempo de permanência nas diferentes câmaras do aparato do teste de Interação Social (A) e do teste de Novidade Social (B) por machos cujas progenitoras eram sedentárias (Controle WT e Controle HT) ou cujas progenitoras foram submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. **p<0,01 para Exercício WT Objeto Inanimado vs Animal Novo 1.

Na figura 30 é possível observar que os animais do grupo Exercício WT apresentaram uma maior preferência pelo animal estranho em detrimento ao objeto que foi alocado no mesmo aparato. Os animais dos outros grupos não apresentaram essa mesma preferência. No segundo teste (Fig. 25B) observa-se também que nenhum grupo apresentou preferência de contato entre o animal familiar e o outro animal novo.

5.3.2.4. Labirinto Aquático de Morris

De acordo com o protocolo descrito nos métodos, o labirinto aquático de Morris pode avaliar memória espacial nos animais. Porém, antes do teste de memória de longa duração os animais foram treinados por 5 dias consecutivos, com 4 tentativas por dia. Diferentemente dos demais testes, o Labirinto Aquático foi realizado somente na prole. A seguir, foi verificado o tempo médio de latência para atingir a plataforma, de todos os grupos experimentais durante os dias de treinamento, procurando verificar se houve alguma dificuldade no aprendizado desses animais.

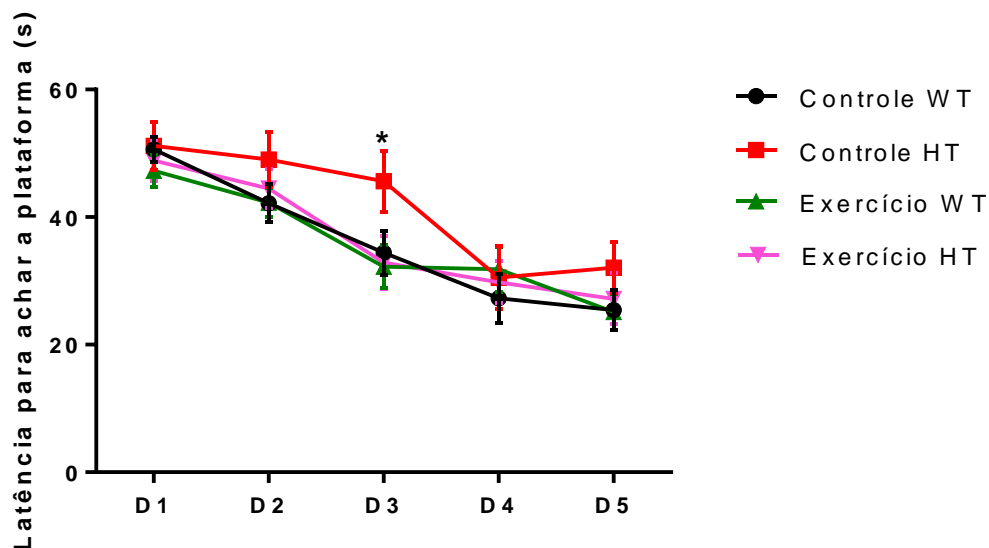


Figura 31. Tempo de latência para achar a plataforma submersa, durante os 5 dias de treinamento no teste do Labirinto Aquático de Morris, por machos cuja progenitoras eram sedentárias (Controle WT e Controle HT) ou cujas progenitoras foram submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ para Controle HT vs Controle WT, Exercício WT e Exercício HT.

Pode-se observar pela figura 31 que os animais do grupo controle HT apresentaram uma latência maior para atingir a plataforma no terceiro dia de treinamento, enquanto os demais grupos experimentais já apresentavam uma melhor eficiência. Neste ponto, o exercício materno parece ser capaz de melhorar a capacidade de aprendizado do animal, uma vez que o grupo HT filhos de mães corredoras (Exercício HT) apresentaram capacidade de encontrar a plataforma submersa em menor tempo comparado ao grupo

controle HT. Nos dias seguintes do treinamento, os animais do grupo controle HT conseguiram se igualar aos demais grupos quanto a capacidade de localizar a plataforma submersa.

Para verificar a retenção da memória de referência da plataforma submersa, foram avaliações de memória (*probe tests*) 4 h e 24 h após o último treinamento, conforme descrito nos métodos, sendo que a plataforma submersa é retirada. Isso é verificado através da medida do tempo de permanência no quadrante onde se encontrava a plataforma submersa. Os resultados são representados nas figuras a seguir. Não foi possível observar, comparando-se os grupos experimentais, nenhuma preferência pela região da plataforma ou pelo quadrante alvo após 4h ou 24h do último treinamento dos camundongos testados (Fig. 32).

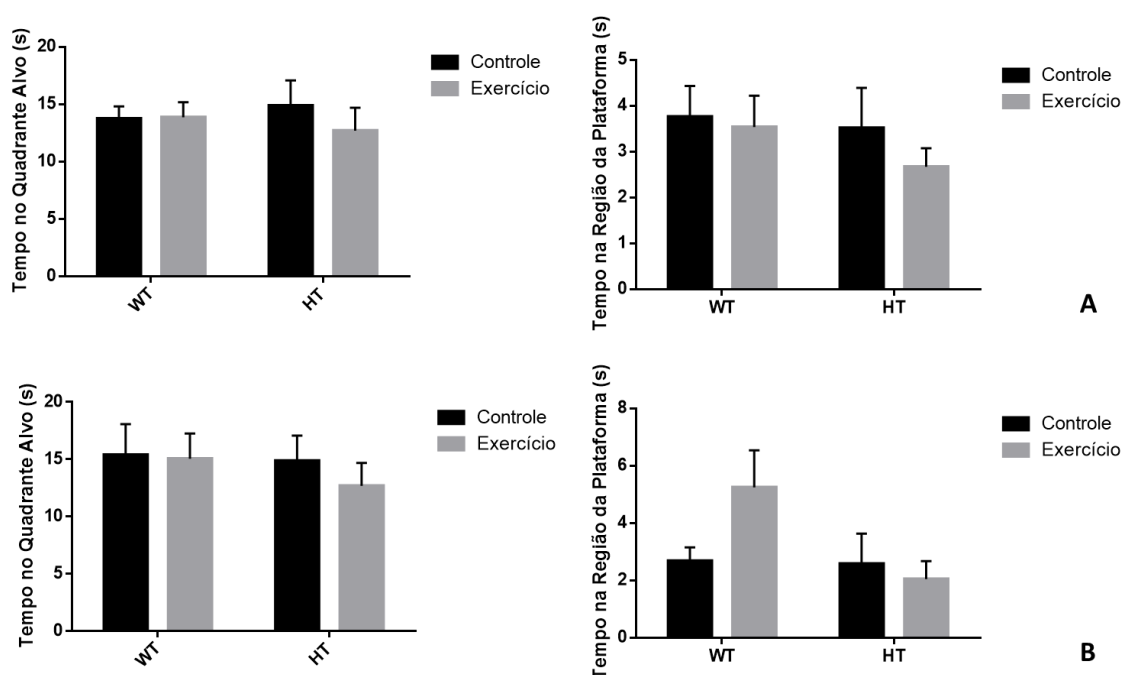


Figura 32. Tempo de permanência dos animais no quadrante alvo e na área da plataforma submersa 4h após o último treinamento (A) e 24h depois do último treinamento (B) no teste do Labirinto Aquático de Morris, por machos cuja progenitoras eram sedentárias (Controle WT e Controle HT) ou cujas progenitoras foram submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.3.2.5. Esquiva Inibitória

A esquiva inibitória é considerada um teste de memória relacionada ao medo, associada a um estímulo intenso, sendo sua formação associada principalmente com amígdala e o hipocampo (Izquierdo et al, 1999; Vasconcelos, 2014). Nos gráficos abaixo são ilustrados os resultados obtidos a partir deste teste comportamental.

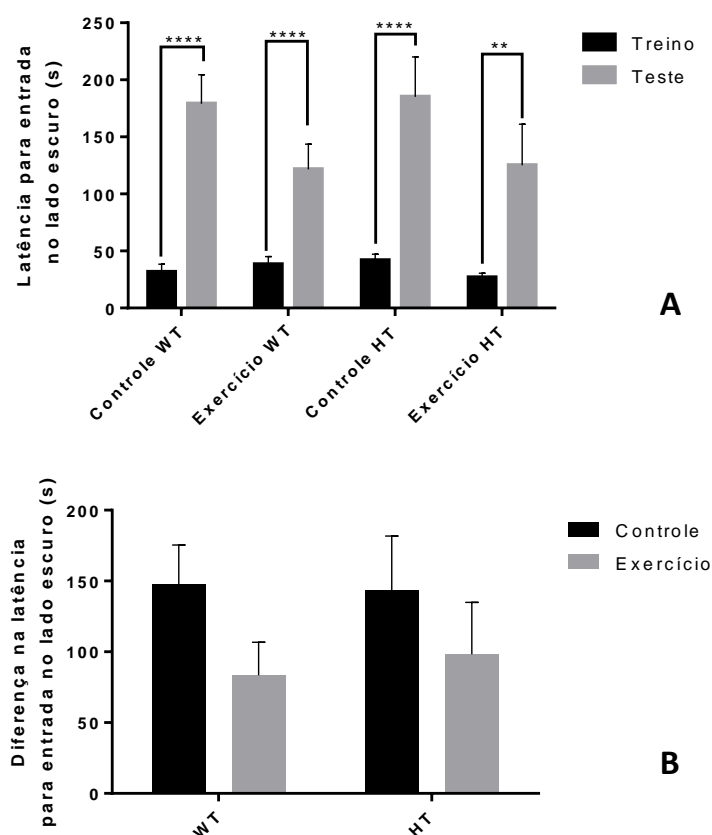


Figura 32 .Latência de tempo para a entrada dos animais no lado escuro do aparato (A) e a diferença entre a latência para entrada no lado escuro do aparato entre o dia de treinamento e o do teste (B), por machos cuja progenitoras eram sedentárias (Controle WT e Controle HT) ou cujas progenitoras foram submetidas ao protocolo de exercício físico voluntário (Exercício WT e Exercício HT). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ Exercício HT treino vs teste; **** $p < 0,0001$ Controle WT treino vs teste, Controle HT treino vs teste e Exercício WT treino vs teste.

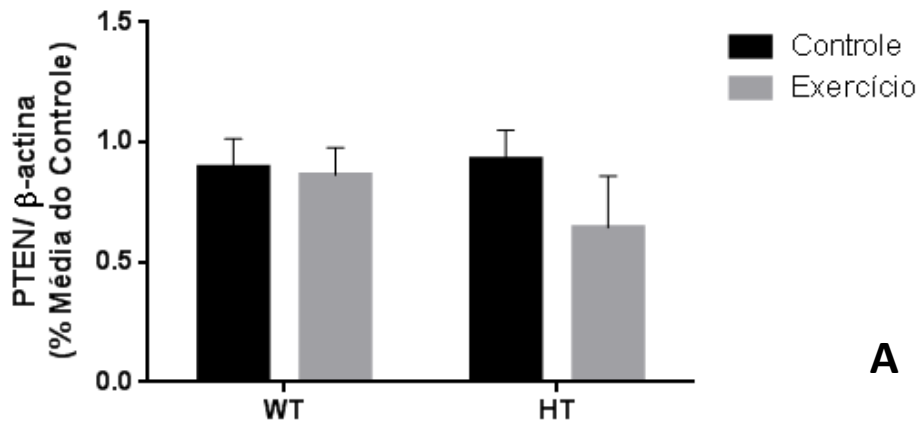
A partir da figura 32 foi possível observar que todos os grupos responderam ao estímulo aversivo (choque) aplicado no primeiro dia do teste (treino). Isso é demonstrado pelo aumento significativo do tempo de latência

para adentrar no compartimento escuro do aparato, observado no segundo dia do teste. Observando-se também a figura 32 B, especificamente, nota-se que, ao calcular a diferença entre as latências para a entrada no compartimento escuro do equipamento, não houve diferença entre os grupos, ou seja, nem a mutação do gene da PTEN, nem o exercício físico materno, foram capazes de alterar a memória e o aprendizado desses animais em um contexto aversivo para os mesmos.

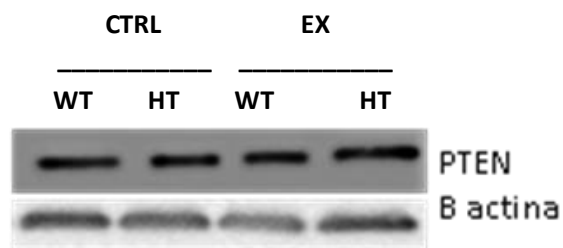
5.3.3. Ensaio Bioquímicos

5.3.3.1. *Western Blotting* do homogenato de tecido hipocampal

Foram realizadas análises da expressão de receptores e proteínas relacionadas à via da PTEN e plasticidade sináptica. O primeiro bloco de figuras ilustra a quantificação de proteínas relacionadas a via da PTEN no extrato citosólico de hipocampo dos camundongos estudados nesse projeto.

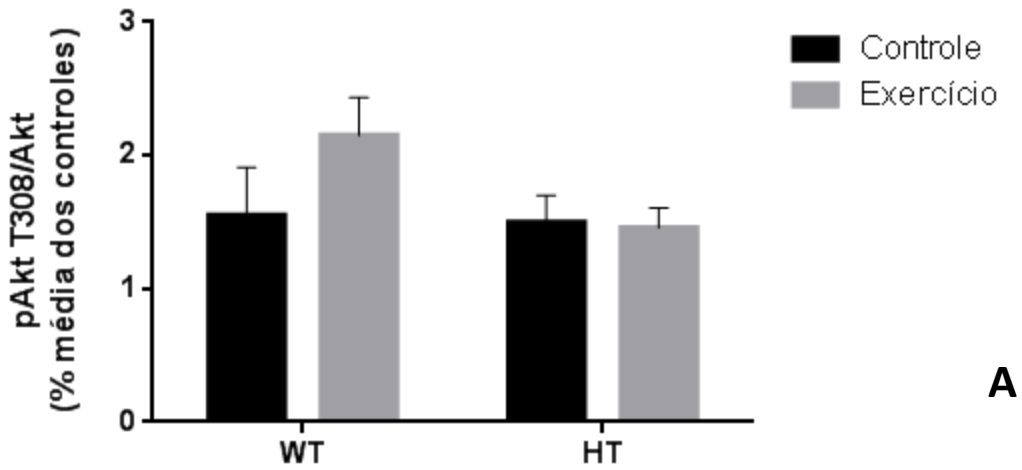


A

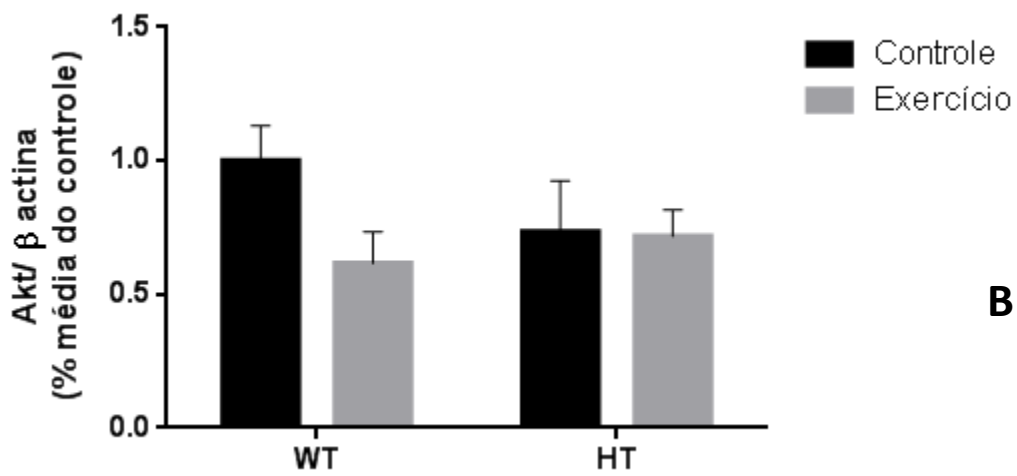


B

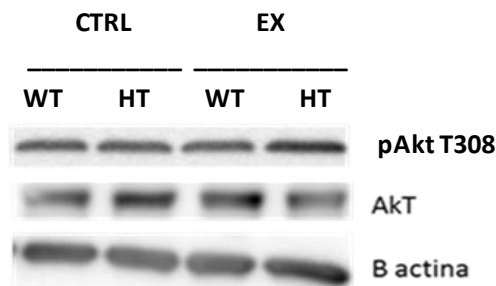
Figura 33. Análise da expressão da PTEN em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles (A). Em B, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.



A



B



C

Figura 34. Análise da expressão da Akt fosforilada (A) e Akt total em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício voluntário e seus respectivos controles (A). Em C, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

Assim como foi visualizado nas progenitoras, a expressão de proteínas relacionadas à via PTEN, ilustradas nas figuras 33 e 34, permaneceu inalterada independentemente do fator genótipo ou do fator exercício físico materno.

A seguir, são mensuradas as expressões de proteínas relacionadas ao fenômeno da plasticidade sináptica.

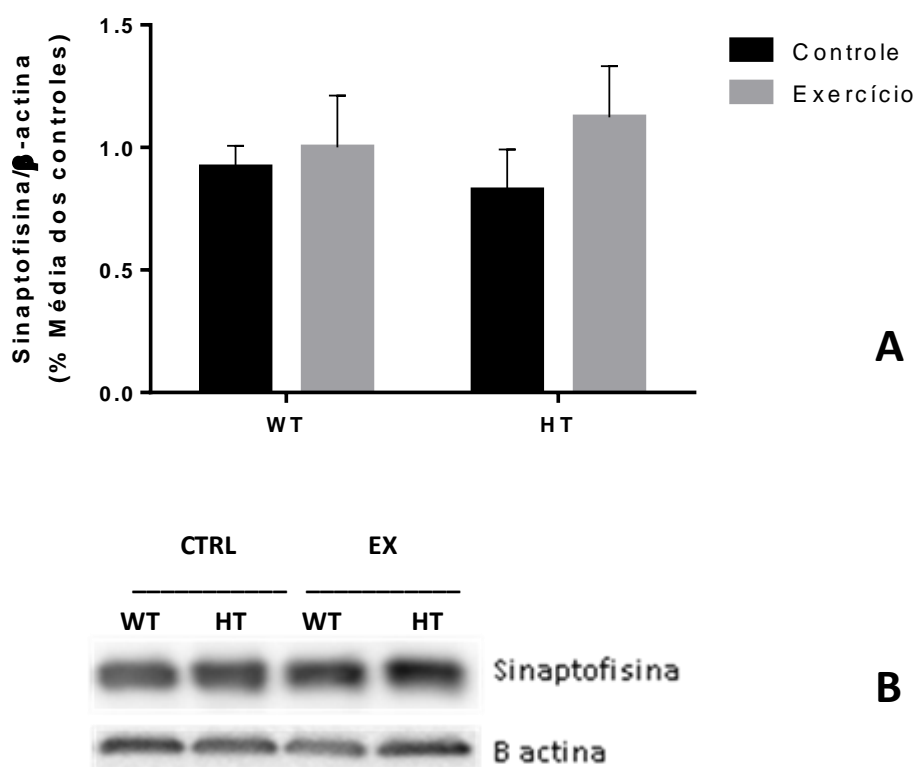


Figura 35. Análise da expressão da sinaptofisina (A) em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles. Em B, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

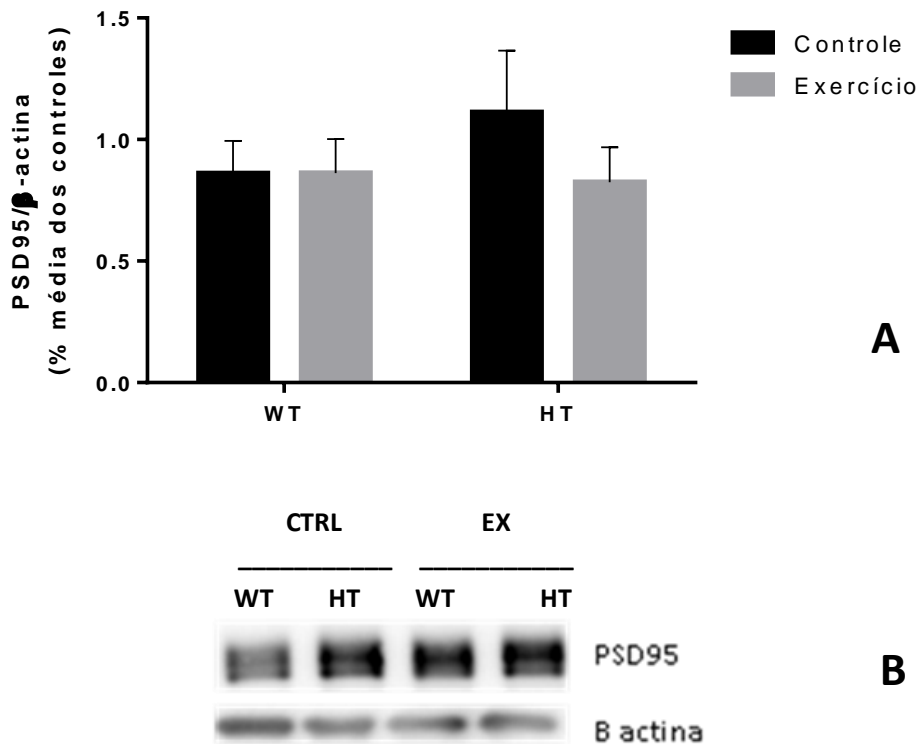


Figura 36. Análise da expressão da PSD95 (A) em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles (A). Em B, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

A Sinaptofisina e a PSD95 são proteínas ligadas à formação de sinapses e possuem diferentes funções dentro da mesma. A PSD95 é uma proteína ligada à membrana pós-sináptica de sinapses glutamatérgicas. Suas funções ainda não foram muito bem estabelecidas, mas acredita-se que ela possa estar envolvida na maturação e na organização dos receptores pós-sinápticos, como os receptores de NMDA (Mallinou e Malenka, 2002; Mahmood et al, 2017). A sinaptofisina, por sua vez, é uma proteína de vesículas pré-sinápticas, cuja função ainda não é totalmente elucidada, embora acredita-se que ela desempenhe funções na endocitose e reciclagem dessas vesículas (Yang et al, 2014). Tanto nas progenitoras como na prole, ilustrado nas figuras 35 e 36, não foi possível observar um aumento ou diminuição da expressão da sinaptofisina e da PSD95 em relação tanto ao tratamento quanto ao genótipo.

Nas figuras de 37 a 40, estão apresentadas a expressão de receptores glutamatérgicos que podem estar relacionados ao fenômeno da plasticidade sináptica.

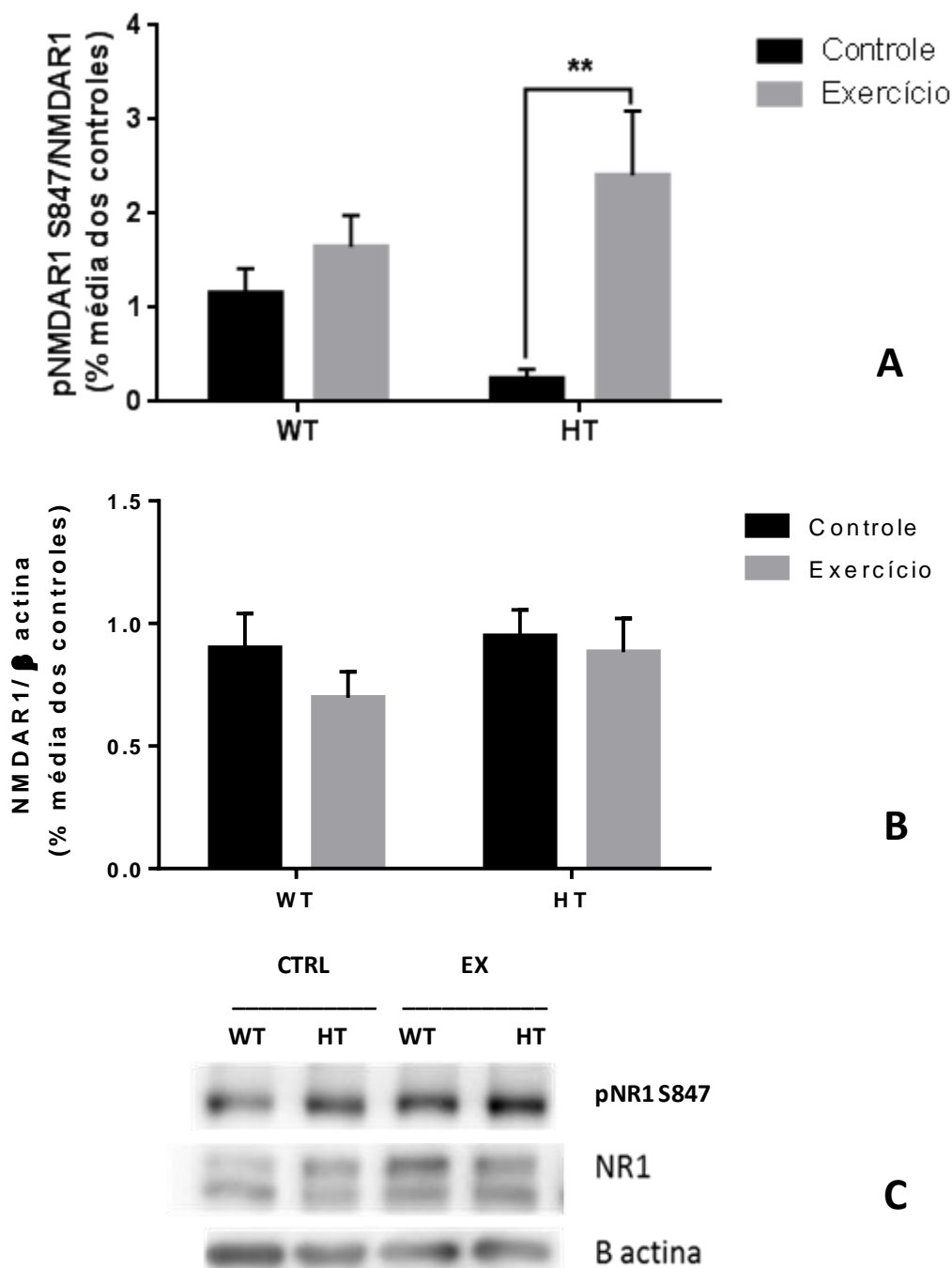


Figura 37. Análise da expressão do receptor glutamatérgico NMDAR1 fosforilado (A) e NMDAR1 total em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício voluntário e seus respectivos controles (A). Em C, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média ± E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

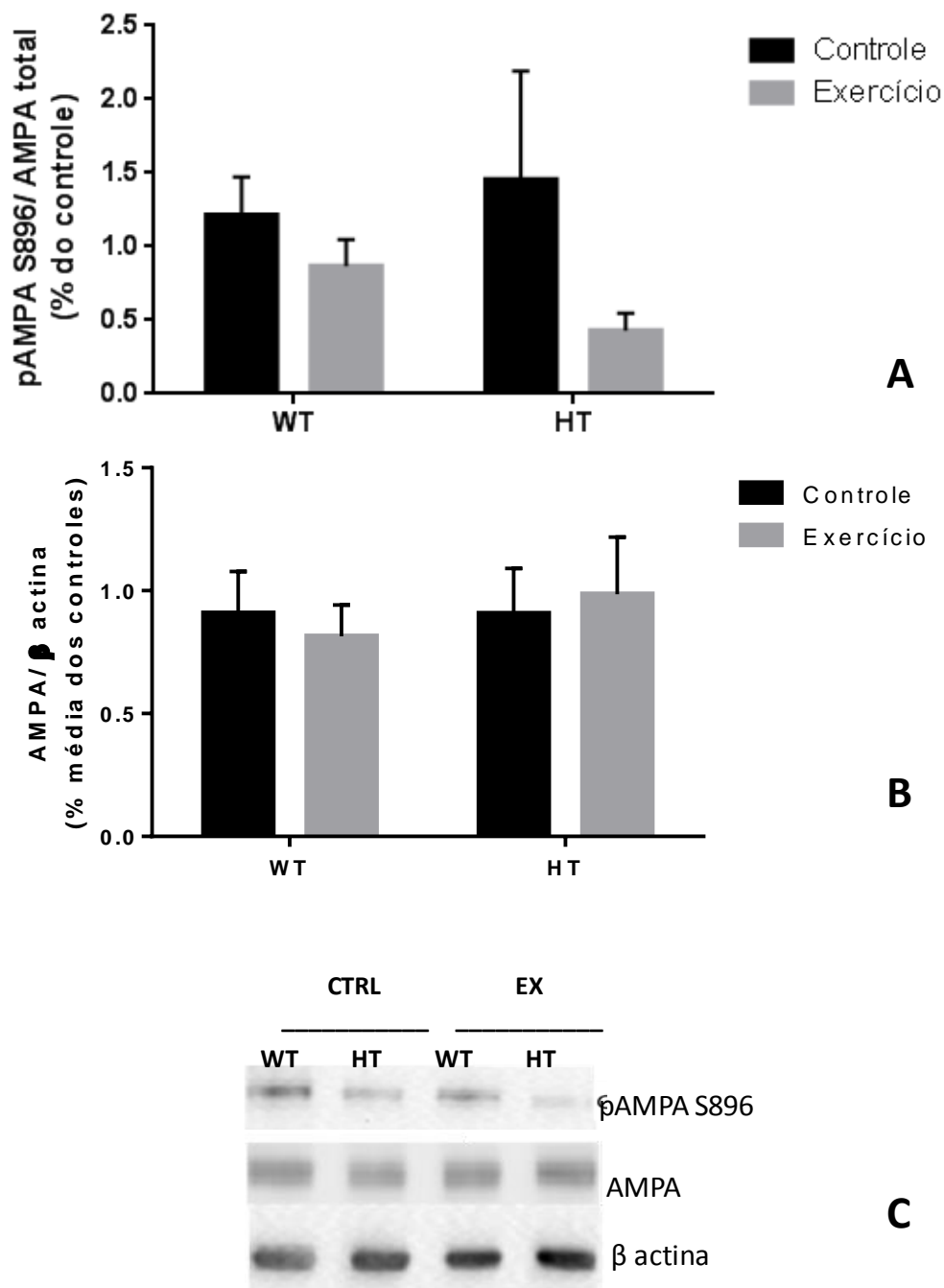
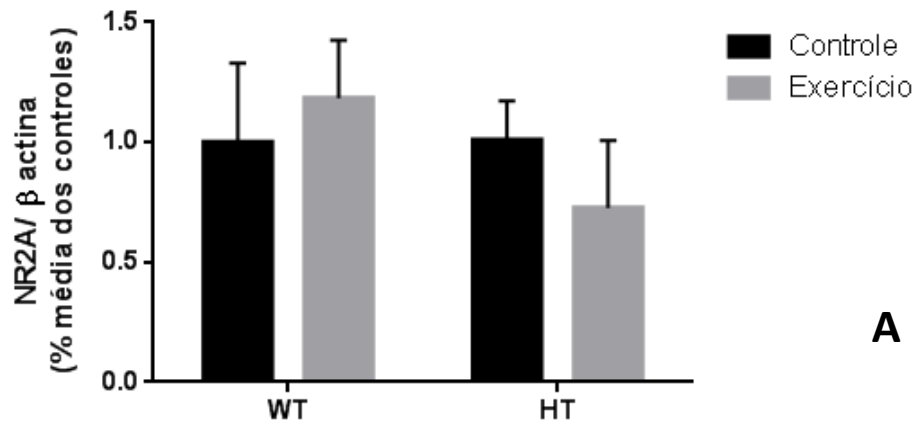
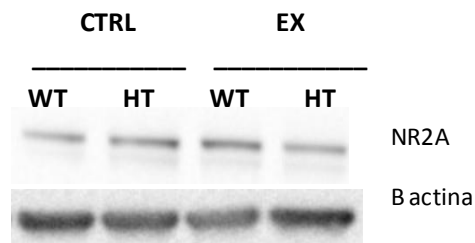


Figura 38. Análise da expressão do receptor glutamatérgico AMPA fosforilado (A) e AMPA total em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício voluntário e seus respectivos controles (A). Em C, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

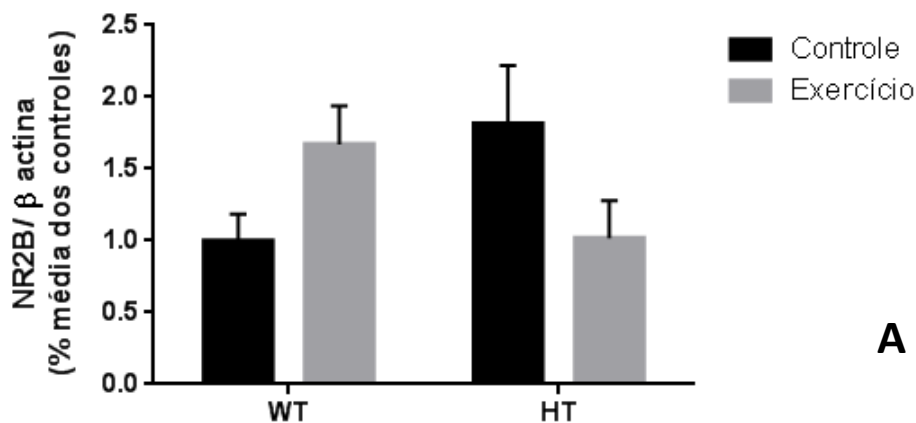


A

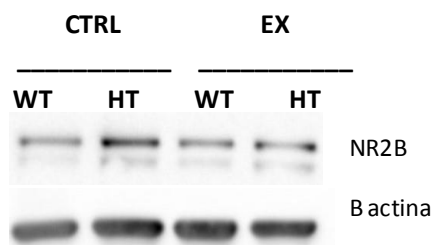


B

Figura 39. Análise da expressão do receptor glutamatérgico NMDAR2A (A) em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício voluntário e seus respectivos controles. Em B, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.



A



B

Figura 40. Análise da expressão do receptor glutamatérgico NMDAR2B (A) em extrato citosólico de hipocampo de camundongos cuja progenitora foi submetida ao exercício voluntário e seus respectivos controles. Em B, imagem com as bandas dos géis de *western blotting* (controle WT n=11; controle HT n=6; exercício WT n=12; exercício HT n=8). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

Nessa batelada de experimentos, podemos observar somente uma maior expressão da subunidade NR1 nos animais HT cuja progenitora foi submetida ao protocolo de exercício voluntário, não havendo alterações na expressão de outros receptores glutamatérgicos.

5.3.3.2. Determinação dos níveis de BDNF no córtex e no hipocampo.

O BDNF é uma neurotrofina produzida nos neurônios de mamíferos e desempenha papéis na sinalização de sobrevivência celular e na plasticidade

sináptica (Yang et al, 2014). Na figura 41 são ilustradas as concentrações desta neurotrofina no hipocampo e no córtex dos diferentes grupos experimentais.

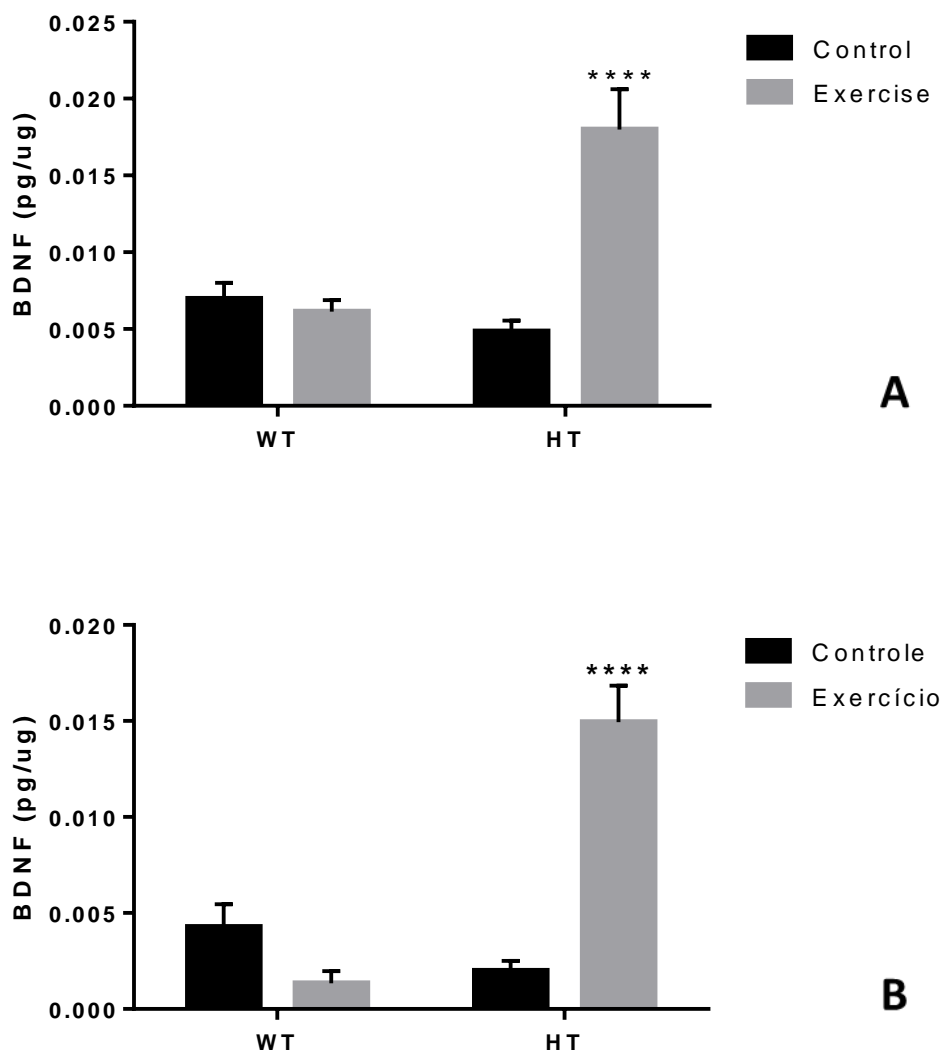


Figura 41.Concentração de BDNF (pg/ug) em hipocampo (A) e Córtex (B) de camundongos proveniente de matrizes submetidas ao exercício voluntário e seus respectivos controles (controle WT n=8; controle HT n=7; exercício WT n=8; exercício HT n=7). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.**** p<0,001 para Exercício HT vs Controle HT, Controle WT e Exercício WT em A e B.

O grupo de animais HT cujas progenitoras praticaram o exercício físico voluntário apresentaram um aumento significativo quando comparado aos demais grupos experimentais. Por esse motivo, optamos por verificar a

expressão do receptor de BDNF, o TrkB nesses mesmos animais. Os gráficos que ilustram a expressão do receptor TrkB encontram-se na figura 42.

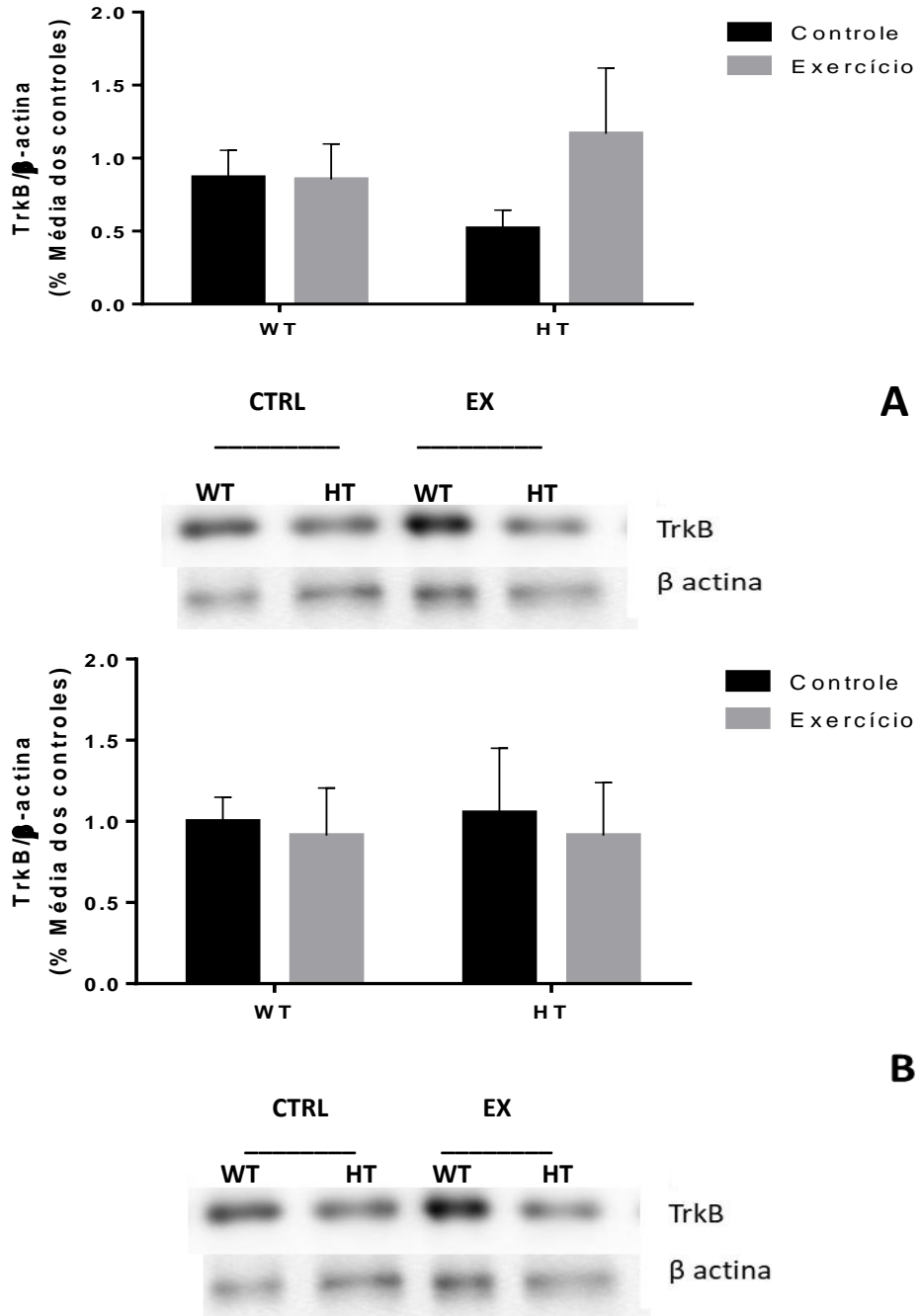


Figura 42. Análise da expressão do receptor TrkB em hipocampo (A) e Córtex (B), bem como as imagem com as bandas dos géis de *western blotting*, de camundongos proveniente de matrizes submetidas ao exercício voluntário e seus respectivos controles (controle WT n=8; controle HT n=7; exercício WT n=8; exercício HT n=7). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

Apesar do aumento significativo da expressão do BDNF no córtex e hipocampo de animais HT submetidos ao protocolo de exercício físico materno, não foram observadas alterações da expressão do receptor TrkB nesses animais, bem como nos demais grupos.

5.3.3.3. Determinação da atividade do CREB no córtex e no hipocampo.

O ensaio do EMSA foi realizado afim de verificar a possível ativação do fator de transcrição CREB na prole após a realização do exercício voluntário materno.

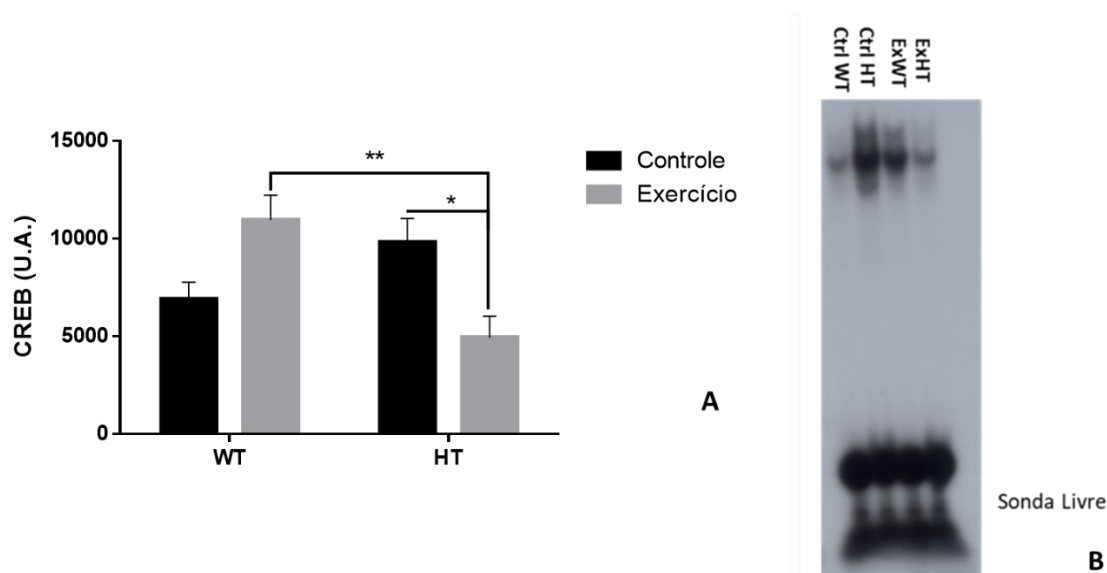


Figura 43. Determinação da atividade do CREB (U.A.) em hipocampo de camundongos provenientes de matrizes submetidas ao exercício voluntário e seus respectivos controles (A). Em B, a autorradiografia do gel de EMSA (controle WT n=6; controle HT n=6; exercício WT n=6; exercício HT n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ para Controle HT vs Exercício HT; ** $p < 0,01$ para Exercício WT vs Exercício HT.

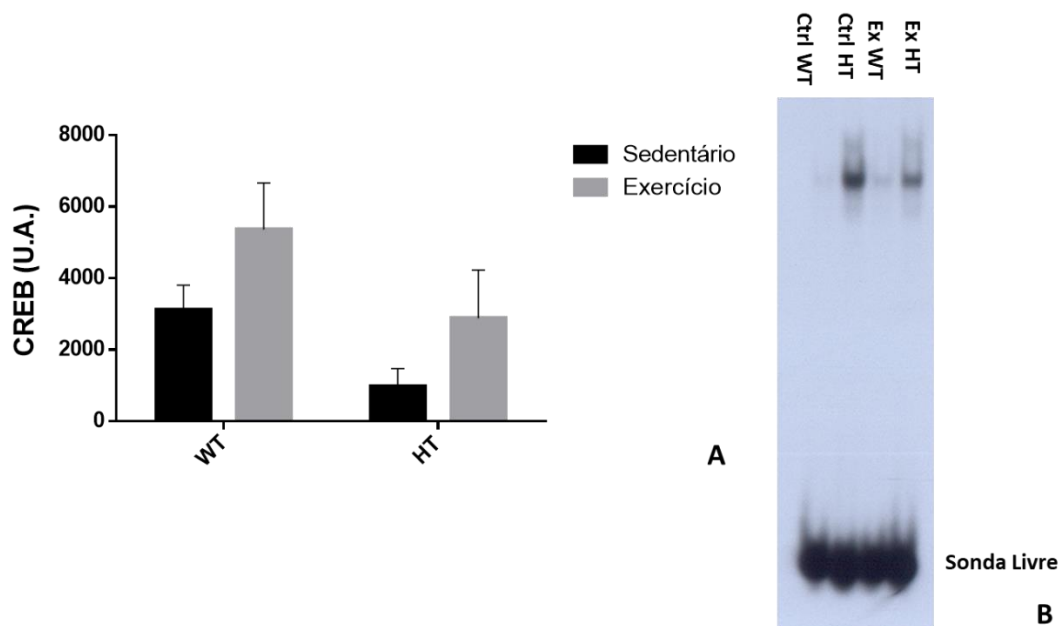


Figura 44. Determinação da atividade do CREB (U.A.) em Cortex de camundongos provenientes de matrizes submetidas ao exercício voluntário e seus respectivos controles. Em B, a autorradiografia do gel de EMSA (controle WT n=6; controle HT n=6; exercício WT n=6; exercício HT n=6). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

Diferentemente do observado na determinação da concentração do BDNF, animais do grupo Exercício HT apresentaram uma menor atividade de fator de transcrição CREB, quando comparado ao grupo Controle de mesmo genótipo, somente no hipocampo. Quando se observa o tecido cortical, não foi possível constatar diferença de atividade de CREB entre os grupos experimentais abordados neste trabalho.

5.3.4. Avaliação da Proliferação de Células Neurais por injeção de BrdU e imunofluorescência

Para a realização deste teste, foram injetadas doses de BrdU em todos os grupos experimentais. O BrdU age durante a fase S da mitose celular, sendo incorporado pelo DNA no lugar da Timidina. Os cortes histológicos desses animais foram marcados com anticorpos anti-BrdU e anti-NeuN (marcador de neurônios). As células BrdU+ foram contabilizadas separadamente e as células que apresentavam dupla marcação (BrdU+ e

NeuN+) foram contabilizadas como porcentagem das células proliferativas totais.

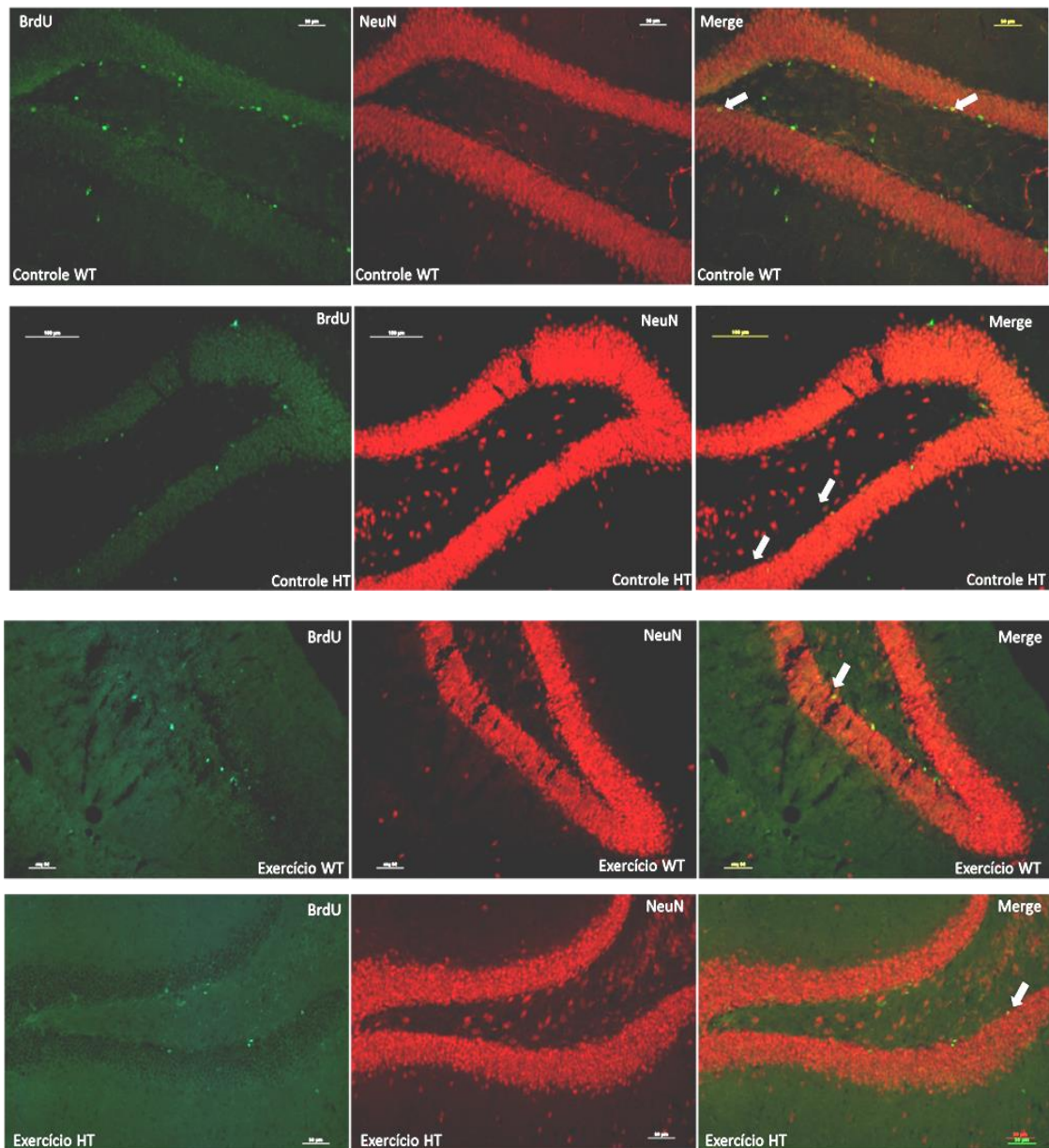


Figura 45. Imagem ilustrativa do ensaio de imunofluorescência com marcação de células BrdU+ e NeuN+ no giro dentado de camundongos proveniente de matrizes sedentárias (Controle WT e HT) ou submetidas ao exercício físico voluntário (Exercício WT e HT). As setas brancas correspondem as células que apresentaram dupla marcação BrdU+ e NeuN+. (controle WT n=13; controle HT n=3; exercício WT n=6; exercício HT n=5). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. Aumento de 20X.

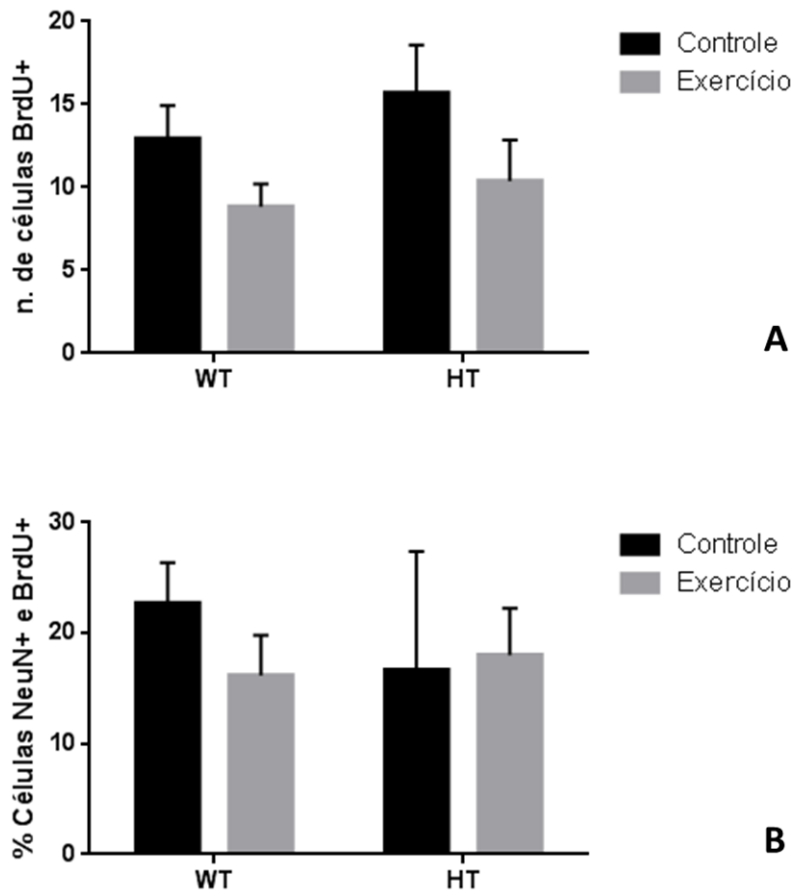


Figura 46. Número de células BrdU positivas (BrdU+ em A) e porcentagem de células com dupla marcação BrdU positiva e NeuN positiva (BrdU+ e NeuN+ em B) no giro dentado de camundongos proveniente de matrizes submetidas ao exercício voluntário e seus respectivos controles (controle WT n=13; controle HT n=3; exercício WT n=6; exercício HT n=5).

Muitos trabalhos mostram comprovadamente que os maiores sítios de neurogênese no adulto estão localizados na zona subventricular e no giro dentado do hipocampo (Kempermann e Gage, 2000; Gage e van Praag, 2002; Tashiro et al, 2007). Por esse motivo e pela localização das células que possuem a deleção da PTEN, as células BrdU+ e NeuN+ foram contabilizadas no giro dentado do hipocampo. As células que apresentaram dupla marcação são as que representam o número de neurônios maduros que sobreviveram 7 dias após as injeções de BrdU. No modelo estudado neste projeto, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos quanto à quantidade de células proliferativas durante o protocolo de exercício físico voluntário materno.

5.3.5. Resumo dos resultados da prole após o protocolo do exercício voluntário materno.

Primeiramente foram realizados experimentos comportamentais em camundongos machos obtidos pelo protocolo de exercício materno descrito na metodologia. Foram observadas modificações comportamentais nesses animais quanto ao perfil relacionado à ansiedade, visto pelo Labirinto em Cruz Elevado. No Labirinto aquático de Morris pode-se inferir que animais do grupo Exercício HT apresentaram uma melhor performance para localizar a localização da plataforma submersa no terceiro dia de treinamento, porém essa performance igualou-se aos demais grupos experimentais nos dias posteriores de treinamento. Quanto aos marcadores moleculares, o grupo Exercício HT teve um significativo aumento na expressão da forma fosforilada do receptor da NMDAR1 no hipocampo e na concentração de BDNF no Hipocampo e no Córtex, fato que pode corroborar com melhora da performance desses animais durante o treinamento do Labirinto Aquático de Morris. Interessantemente, a atividade do fator de transcrição CREB foi diminuída nesse grupo de animais, especificamente no tecido cortical. Quanto ao estudo da neurogênese, através do uso de BrdU, não foi revelado nenhum dado significativo do número de células proliferativas nesses animais.

Quadro 2: Resumo dos resultados da prole submetidas ao protocolo de exercício físico materno (- : sem alteração; + : alteração observada)

Ensaio	Grupos Experimentais			
	Controle WT	Controle HT	Exercício WT	Exercício HT
Ensaio Comportamentais				
Campo Aberto	-	-	-	-
Labirinto em Cruz Elevado	-	-	+	+
Comportamento Social	-	-	+	-
Esquiva Inibitória	-	-	-	+
Ensaio Bioquímicos				
PTEN	-	-	-	-
pAkt/Akt	-	-	-	-
pNMDAR1/NMDAR1	-	-	-	+
NMDAR2B	-	-	-	-
pAMPA/AMPA	-	-	-	-
PSD95	-	-	-	-
Sinaptofisina	-	-	-	-
BDNF	-	-	-	+
CREB	-	-	-	+
Proliferação Neuronal	-	-	-	-

5.4.1. Avaliação do perfil comportamental da prole após alteração do protocolo de exercício físico voluntário materno

Devido aos resultados obtidos na sessão anterior, que demonstraram um perfil ansiogênico da prole proveniente de progenitoras que passaram pelo protocolo de exercício físico voluntário (Labirinto em Cruz Elevado, item 5.3.1.2), foi realizada a seguinte alteração nesse protocolo: ao invés da fêmea e sua prole permanecerem na caixa contendo a roda de atividades até o desmame, a roda foi retirada da caixa assim que os filhotes nasceram. A seguir seguem os resultados de forma comparativa entre os grupos controle, exercício (com a presença da roda de exercício até o desmame) e roda retirada (a roda de exercício foi retirada logo após o nascimento dos filhotes).

5.4.1.1. Campo Aberto

De acordo com as condições descritas nos métodos e as alterações feitas no protocolo do exercício voluntário materno, seguem os resultados relacionados ao tempo de permanência e a distância percorrida pelos animais na periferia e no centro do aparato.

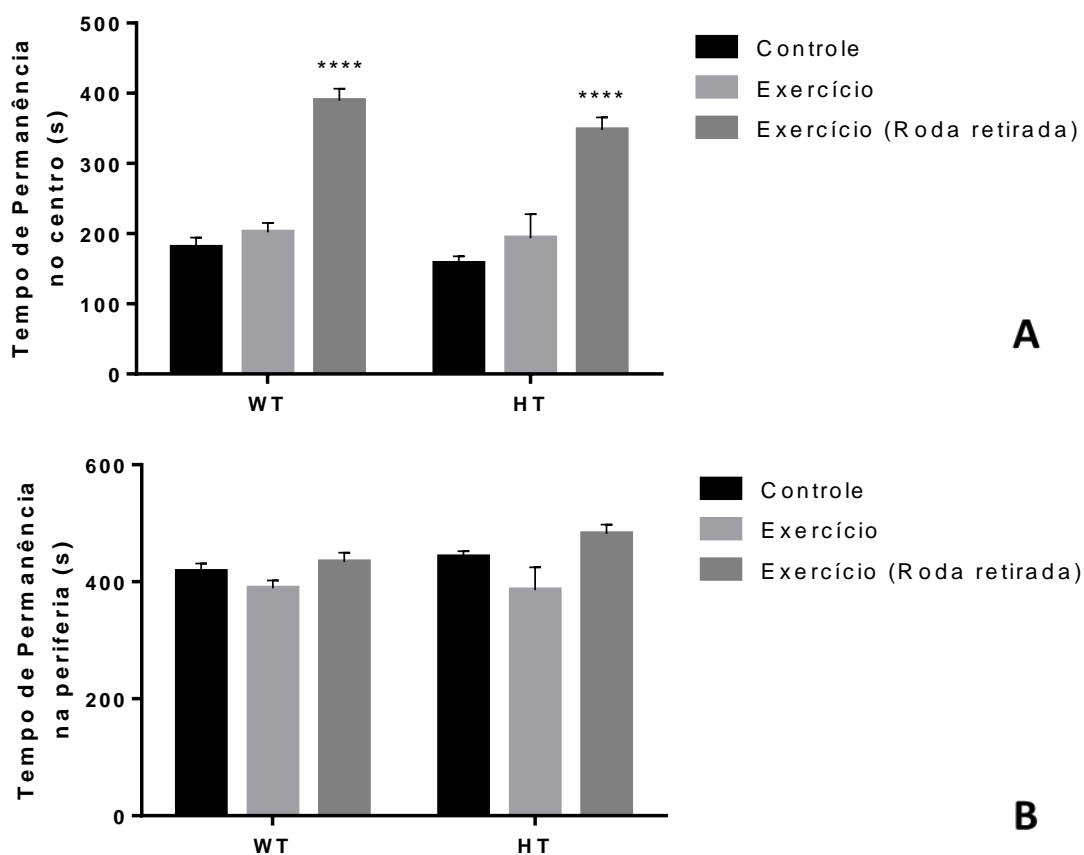


Figura 47. Tempo de permanência na área central (A) e na área periférica (B) do aparato do campo aberto por camundongos cujas progenitoras foram submetidas ao exercício físico voluntário, sendo a roda de exercício retirada após o nascimento da prole em comparação as respectivas progenitoras sedentárias (Controle e Roda Retirada) ou que seguiram com a roda de exercício até o desmame (Exercício). Controle WT, n= 17; Controle HT, n= 10; Controle WT, n= 20; Exercício HT, n=10; Roda Retirada WT, n=10 e Roda Retirada, n=7. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. **p<0,01 Exercício HT treino vs teste; ****p< 0,0001 Controle WT treino vs teste, Controle HT treino vs teste e Exercício WT treino vs teste.

Como mencionado anteriormente, através da arena do campo aberto pode-se avaliar a atividade locomotora do animal e ansiedade. Os resultados acima mostram que animais cuja progenitora foi submetida ao protocolo adaptado do exercício físico voluntário, com a roda giratória retirada após o nascimento dos filhotes (Roda Retirada WT e HT), mostrou uma possível melhora na atividade exploratória, também proposta pelo teste, ao passar maior parte do tempo na área central do aparato, em comparação aos outros grupos experimentais.

5.4.1.2. Labirinto em Cruz Elevado

O procedimento do teste seguiu o descrito nos métodos, assim como os testes no Labirinto em Cruz Elevado mostrado anteriormente. As figuras a seguir mostram os resultados obtidos com a realização desse ensaio comportamental.

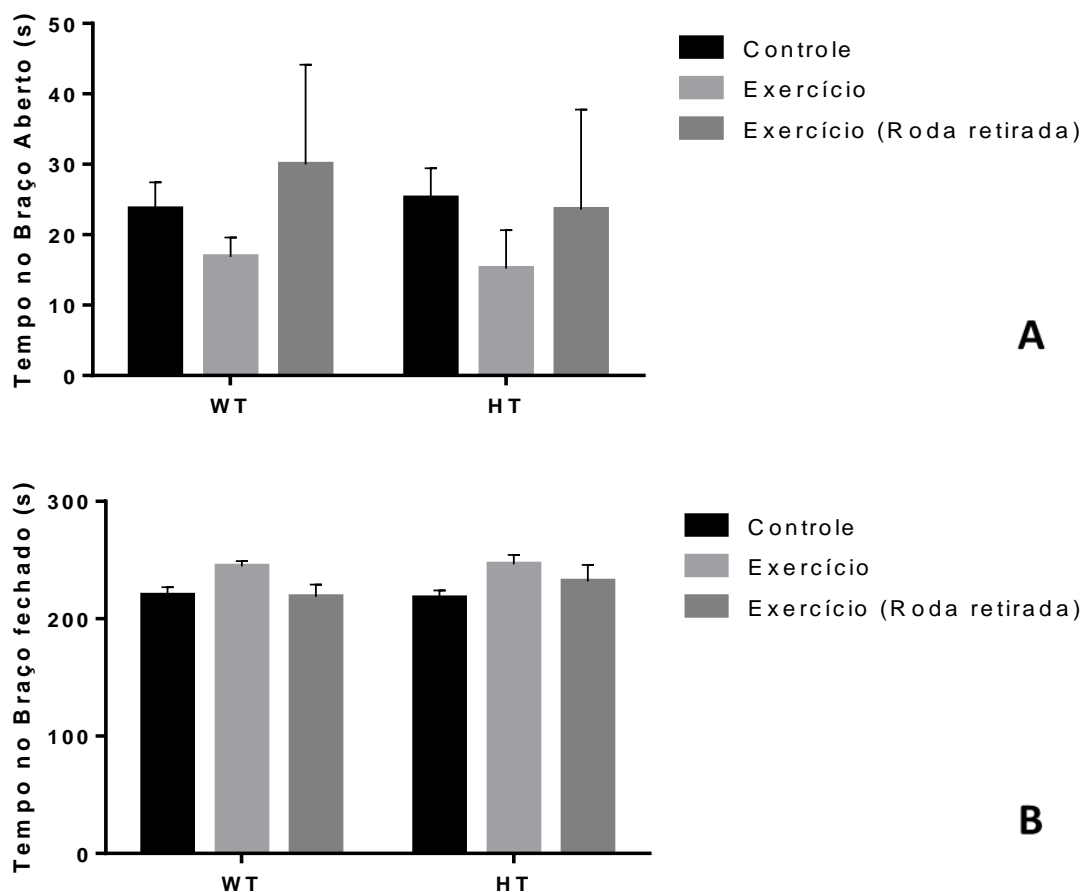


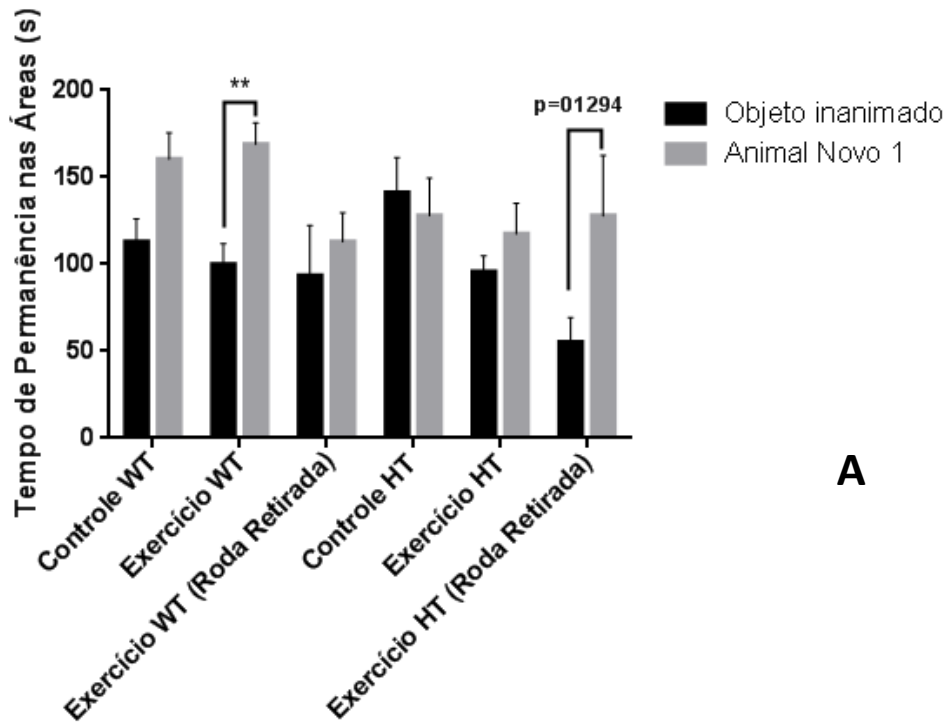
Figura 48. Tempo de permanência (s) nos braços abertos (A) e fechados (B) no aparato do Labirinto em Cruz Elevado, por camundongos cujas progenitoras foram submetidas ao exercício físico voluntário, sendo a roda de exercício retirada após o nascimento da prole em comparação as respectivas progenitoras sedentárias (Controle e Roda Retirada) ou que seguiram com a roda de exercício até o desmame (Exercício). Controle WT, n= 17; Controle HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10; Roda Retirada WT, n=10 e Roda Retirada, n=7. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

O teste do labirinto em cruz elevado pode avaliar o grau de ansiedade nos animais, medido pela proporção de tempo em que permanecem nos braços abertos e fechados do aparato (Texel et al, 2012). No protocolo utilizado originalmente nos nossos estudos, os animais provenientes de mães submetidas ao exercício físico voluntário permaneceram de forma significativa mais tempo nos braços fechados do aparato, independentemente do genótipo. Seguindo o protocolo com a retirada da roda de exercício da caixa-moradia logo após o nascimento dos filhotes, não foi observado um comportamento ansioso da prole em relação ao grupo submetido ao protocolo original, o que

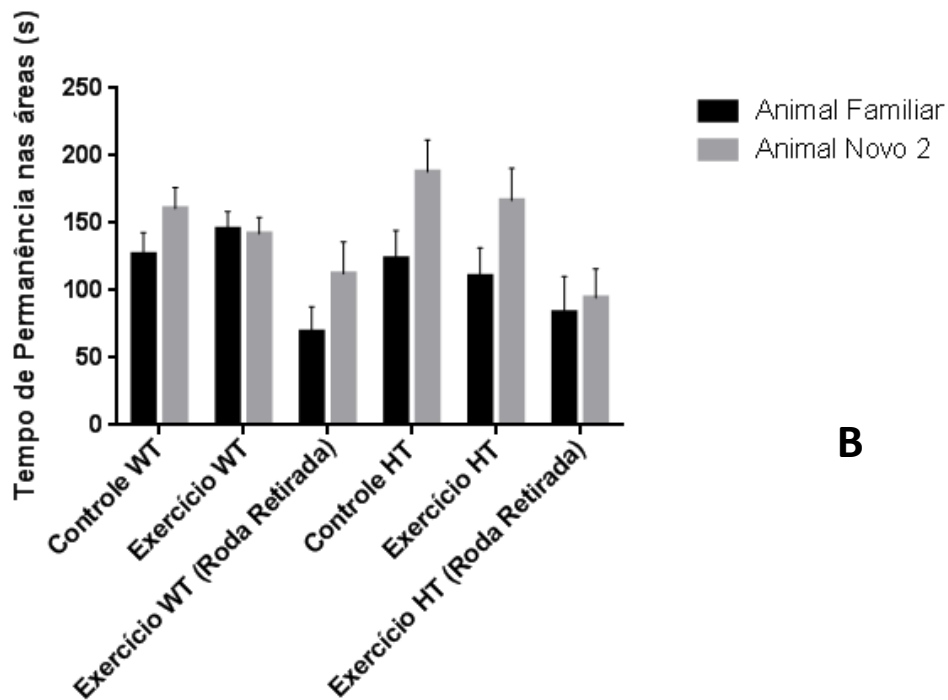
pode reforçar que o cuidado materno com a prole pode ficar comprometido com a presença da roda utilizada para a prática do exercício físico.

5.4.1.3. Comportamento Social

De acordo com o procedimento descrito na metodologia, seguem os resultados obtidos por este teste comportamental.



A



B

Figura 49. Tempo de permanência (s) nas câmaras com um objeto e um animal Novo (A) e um animal familiar e um segundo animal novo (animal novo 2; B) dentro do aparato do teste de comportamento social, por camundongos cujas progenitoras foram submetidas ao exercício físico voluntário, sendo a roda de exercício retirada após o nascimento da prole em comparação as respectivas progenitoras sedentárias (Controle, Exercício e Roda Retirada). Sedentária WT, n= 17; Sedentária HT, n= 10; Roda Retirada WT, n=10 e Roda Retirada, n=7. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. **p<0,01 Exercício WT animal familiar vs animal novo 2;

De acordo com o ilustrado na figura 49, somente animais exercício WT apresentaram uma preferência a permanecer um maior período de tempo na câmara que continha o animal desconhecido (Animal Novo 1). Os animais submetidos ao protocolo do exercício físico materno com a retirada da roda, não apresentaram preferência por nenhuma das situações propostas no teste, portanto esse protocolo parece não influenciar no comportamento social desses animais.

5.4.1.4. Labirinto Aquático de Morris

De acordo com a metodologia descrita e os resultados anteriores apresentados, o labirinto aquático de Morris pode avaliar memória espacial nos animais ao longo dos dias de experimento. A seguir, foi verificado o tempo médio de latência para atingir a plataforma, de todos os grupos experimentais durante os dias de treinamento, procurando verificar se houve alguma dificuldade no aprendizado desses animais.

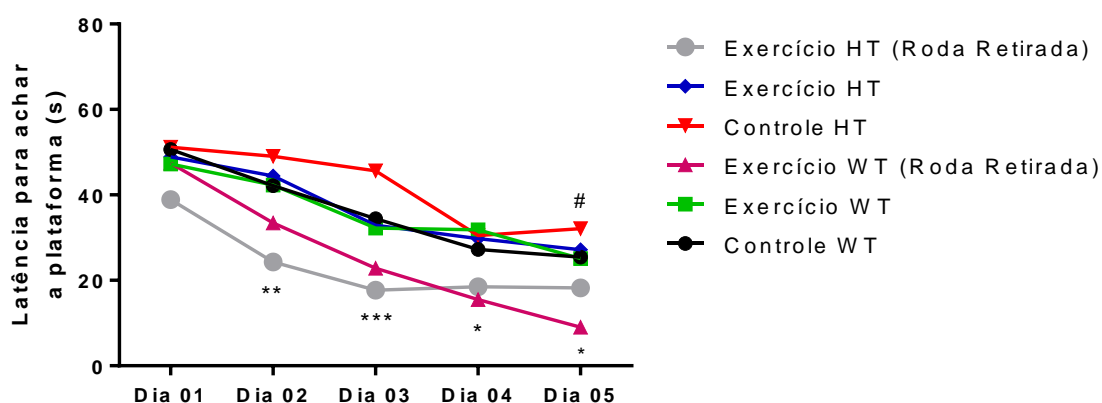
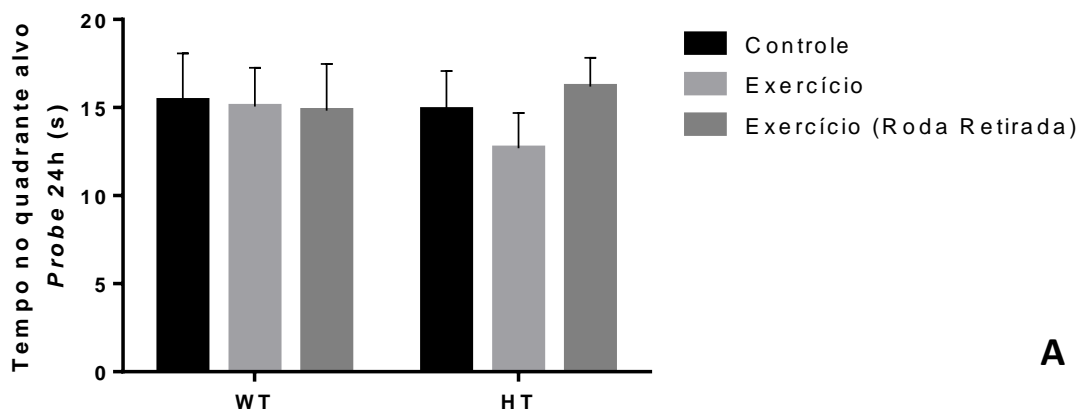


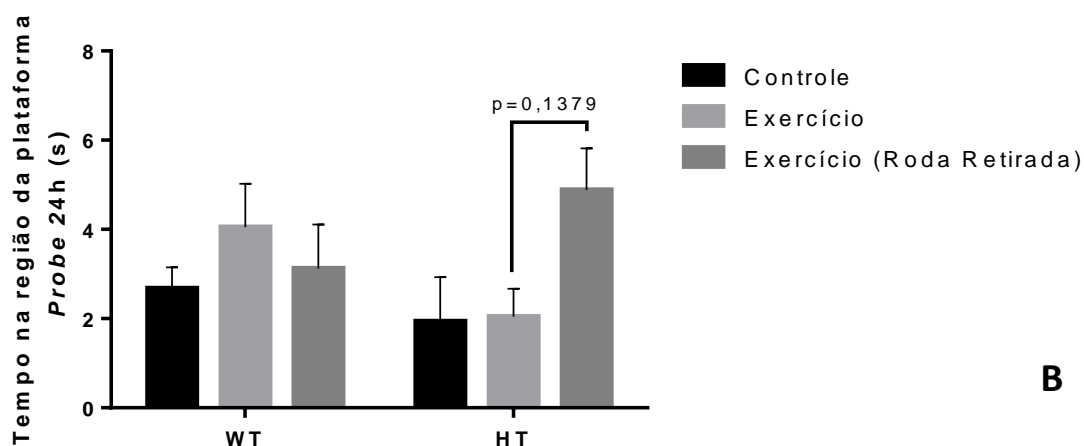
Figura 50. Tempo de latência para achar a plataforma submersa, durante os 5 dias de treinamento no teste do Labirinto Aquático de Morris, por camundongos cujas progenitoras foram submetidas ao exercício físico voluntário, sendo a roda de exercício retirada após o nascimento da prole em comparação as respectivas progenitoras sedentárias ou que seguiram com a roda de exercício até o desmame (Controle, Exercício e Exercício (Roda Retirada)). Controle WT, n= 17; Controle HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10; Roda Retirada WT, n=10 e Roda Retirada HT, n=7. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ Controle HT vs Roda Retirada HT no dia 02; *** $p < 0,001$ Controle HT vs Roda Retirada HT no dia 03; * $p < 0,05$ Exercício WT vs Roda Retirada WT no dia 4; * $p < 0,05$ Exercício HT vs Roda Retirada WT e # $p < 0,05$ Controle WT vs Roda Retirada WT.

Pela curva de aprendizado ilustrada pela figura 50, nota-se que os filhotes cujas mães foram submetidas ao exercício voluntário, porém com a roda de exercício retirada da caixa-moradia após o nascimento dessa prole, tiveram um melhor desempenho para encontrar a plataforma submersa utilizada no teste do Labirinto Aquático durante os 5 dias de treinamento. Essa diferença pôde ser notada quando se comparou esses animais aos grupos Controle e Exercício, tanto para animais WT quanto animais HT, o que pode mostrar a influência na cognição desses animais quando há alteração do comportamento materno.

Na figura 51 é comparado o comportamento desses mesmos grupos durante os testes de avaliação de memória (*probe tests*) realizados dentro do protocolo do Labirinto Aquático. Nesse caso, não foram observadas diferenças de permanência no quadrante alvo e na região próxima onde estava localizada a plataforma submersa.



A



B

Figura 51. Tempo de permanência dos animais no quadrante alvo (A) e na região da plataforma submersa (B) 24h após o último treinamento no teste do Labirinto Aquático de Morris, por camundongos cujas progenitoras foram submetidas ao exercício físico voluntário, sendo a roda de exercício retirada após o nascimento da prole em comparação as respectivas progenitoras sedentárias ou que seguiram com a roda de exercício até o desmame (Controle, Exercício e Exercício (Roda Retirada)). Controle WT, n= 17; Controle HT, n= 10; Exercício WT, n= 20; Exercício HT, n=10; Roda Retirada WT, n=10 e Roda Retirada, n=70. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.4.1.5. Esquiva Inibitória

O teste foi feito de acordo com o descrito na metodologia e os resultados são ilustrados nas figuras abaixo.

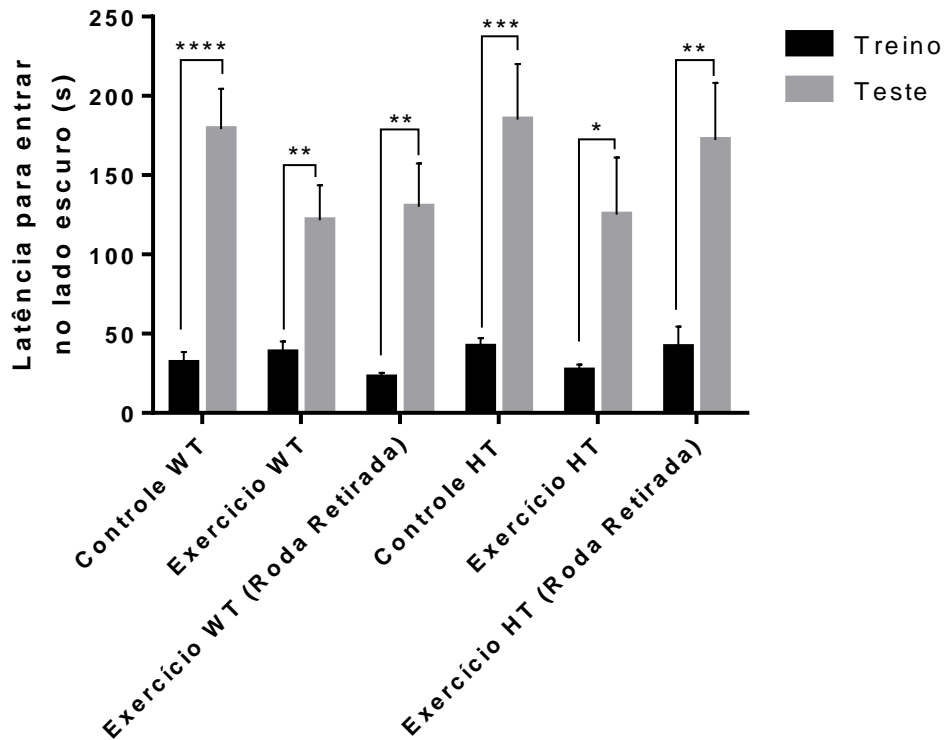


Figura 52. Latência para que os indivíduos passem para o lado escuro do aparato da Esquiva Inibitória, sendo a roda de exercício retirada após o nascimento da prole em comparada às respectivas progenitoras sedentárias ou que seguiram com a roda de exercício até o desmame; controle WT n= 17; controle HT n=10; exercício WT n=20; exercício HT n=10, Roda Retirada WT n=10 Roda Retirada HT n=07. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ Roda Retirada WT treino vs teste; Roda Retirada HT treino vs teste. *** $p < 0,001$; Controle WT treino vs teste; Controle HT treino vs teste. * $p < 0,05$ Exercício WT treino vs teste; Roda Retirada WT treino vs teste; Roda Retirada HT treino vs teste.

A esquiva inibitória é considerada um teste de memória relacionada ao medo, associada a um estímulo intenso, sendo sua formação associada principalmente com amígdala e o hipocampo (Vasconcelos et al, 2014; Zhou et al, 2016). Todos os grupos analisados lembraram-se do estímulo aversivo (choque) no dia do teste na comparação entre os grupos controle e roda retirada (Fig. 52).

5.4.1.6. Resumo dos resultados comportamentais na prole submetida ao protocolo alterado do exercício materno.

Devido o resultado encontrado no Labirinto em Cruz Elevado na sessão 5.3.2.2 (fig. 29), ou seja, onde a prole cuja progenitora passou pelo protocolo de exercício voluntário apresentou um comportamento ansioso, foi feita uma adaptação desse protocolo, retirando-se a roda de exercício logo após o nascimento dos filhotes. Com isso, não foi mais observado o mesmo perfil ansioso desses animais em relação aos controles, independente do genótipo (WT e HT) no teste do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 48). Foram observadas melhoras nos animais submetidos a esse Exercício (Roda Retirada) em relação ao grupo submetido ao protocolo original (Exercício) e ao Controle, no teste do Campo Aberto, em relação a melhora da atividade exploratória, com uma maior permanência na área central da arena (Fig. 47). Além disso, a alteração do protocolo do exercício materno contribuiu para uma melhora no aprendizado no contexto do Labirinto Aquático de Morris, em animais HT, nos primeiros dias de treinamento, e em animais WT, nos últimos dias de treinamento (Fig. 50 e 51). Perfis comportamentais relacionados à sociabilidade e à memória associada a um estímulo aversivo (esquiva inibitória) não apresentaram alterações em relação à mudança de protocolo do exercício voluntário materno (Fig. 49 e Fig. 52).

Quadro 2: Resumo dos ensaios comportamentais na prole submetida ao protocolo de exercício físico materno adaptado (- : sem alterações; + alterações observadas)

Ensaio Comportamental	Grupos Experimentais					
	Controle WT	Controle HT	Exercício WT	Exercício HT	Roda Retirada WT	Roda Retirada HT
Campo Aberto	-	-	-	-	+	+
Labirinto em Cruz Elevado	-	-	-	-	-	-
Labirinto Aquático de Morris	-	-	+	+	+	+
Comportamento Social	-	-	+	-	-	-
Esquiva Inibitória	+	+	+	+	+	+

6. Discussão

O presente projeto teve como objetivo caracterizar os efeitos mediados pelo exercício físico voluntário em camundongos fêmeas e na interação materno-fetal sob condições de alteração da via de sinalização da PTEN. Também foram avaliados alguns aspectos relativos às próprias progenitoras que diretamente receberam os efeitos provenientes do exercício voluntário.

6.1. Nas progenitoras

Nas fêmeas, observou-se um aumento no consumo de ração pelo grupo que praticou o exercício físico voluntário na roda de exercício. Este consumo, porém, não refletiu em aumento ou perda de massa corpórea, que se manteve durante todo o protocolo, independentemente do grupo experimental (Fig.6). Além disso, com o passar dos dias de experimento, as fêmeas corredoras aumentaram a distância percorrida, independente do seu genótipo (Fig.7).

Foram estudados alguns aspectos comportamentais nas fêmeas submetidas ao exercício físico voluntário. No campo aberto, é possível avaliar se os animais apresentaram alguma alteração da capacidade locomotora, bem como alguma alteração no perfil do comportamento ansioso dos mesmos (Kawamoto et al, 2013). As fêmeas avaliadas, independentemente do genótipo, não apresentaram diferença na capacidade exploratória do espaço do aparato, e não manifestaram preferência pela periferia ou pelo centro da arena do Campo Aberto (Fig. 8). Utilizamos também o aparato do labirinto em Cruz elevado (Fig. 9) para novamente verificar se o exercício voluntário ou a própria mutação no gene da PTEN poderia ser um estímulo ansiogênico para essas fêmeas, e novamente não foram observadas diferenças nesse perfil comportamental entre os diferentes grupos experimentais. Alguns dados da literatura como o trabalho de Kwon e colaboradores (2006), apontaram que animais nocautes para o gene da PTEN em homozigose, podem apresentar um comportamento ansioso, percorrendo maiores distâncias e permanecendo por um menor período no centro do aparato e, no caso do labirinto em cruz elevado, os animais tiveram uma maior preferência pelo braço aberto do

aparato em comparação aos animais WT. Foi publicado recentemente um trabalho do nosso grupo em que os animais HT da mesma linhagem *Pten*^{loxp/+} *Nse-Cre*⁺, passaram pelo protocolo de dieta intermitente durante 30 dias (Cabral-Costa et al, 2018) e não apresentaram diferença no tempo de permanência nos braços abertos e fechados do aparato. Notou-se apenas que animais HT submetidos à dieta intermitente entraram por mais vezes no braço aberto do aparato, fato semelhante tem sido observado com trabalhos da literatura que demonstram um perfil ansiolítico do exercício físico (Duman et al, 2018; Morgan et al, 2018). Animais com a deleção condicionada do gene da PTEN podem apresentar características alteradas no comportamento social (Kwon, 2006; Silverman et al, 2010; Bey e Jiang, 2014), ou seja, quando em experimentação, esses animais evitam o contato com o animal considerado como "novidade social", preferindo o objeto ou o animal que já lhe era é familiar. O teste mais utilizado para verificar a sociabilidade desses animais é o chamado *Three Chamber Test*, semelhante ao utilizado no presente projeto (Nadler et al, 2004, Aujnarain et al, 2018.). Nesse teste, que é dividido em duas etapas, não foi possível verificar nenhuma diferença no tempo de interação com o objeto e com os dois animais estranhos apresentados aos camundongos utilizados nesse estudo (Fig. 12). Por último, foi realizado o teste da esQUIVA inibitória, cuja formação de memória está relacionada a um estímulo aversivo (choque elétrico), portanto envolve estruturas como o hipocampo, a amígdala e o estriado (González-Salinas et al, 2018). Kwon e colaboradores utilizaram o teste do condicionamento de medo em animais com a mutação para o gene da PTEN, que consiste também na consolidação de uma memória contextual, ou seja, relacionada a um ambiente em que se recebe um estímulo aversivo. Nesses animais, porém não foram observadas alterações em relação a formação e extinção de memória. Interessantemente em nosso estudo foi possível observar uma alteração no grupo Exercício HT, onde os animais demoraram um maior tempo para adentrar o lado escuro do aparato, após 24h da aplicação do choque (figura 11). No trabalho recém-publicado por nosso grupo, foi demonstrado que camundongos machos com a deleção condicionada da PTEN não recordaram do estímulo aversivo aplicado no treinamento. Essa característica foi resgatada após o protocolo de dieta intermitente (Cabral-Costa et al, 2018). Com isso, pode-se observar a

importância de intervenções não farmacológicas como o exercício físico e dietas, tanto a dieta intermitente quanto a dieta de restrição calórica.

Kwon e colaboradores (2006) e Cabral-Costa e colaboradores (2018), demonstraram que animais nocautes para o gene da PTEN pode apresentar uma maior concentração de proteínas relacionadas à sinalização *downstream* da PTEN, como as formas fosforiladas da proteína ribossomal S6 e da Akt, além da diminuição da própria expressão da PTEN, fato também encontrado no trabalho de Fricano-Krugler e colaboradores (Fricano-Kluger et al, 2018.). Em relação a cascata de sinalização da PTEN, bem como a própria expressão da PTEN, não foi possível observar alterações quando se compara animais WT e HT (Fig. 13 e 14). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que a técnica de *western blotting* trabalha-se com um homogenato de tecido, ou seja, misturam-se células que possuem a deleção no gene da PTEN e células sem a deleção Smith e colaboradores, utilizando o mesmo modelo de deleção da PTEN (*LoxP/Nse-Cre*), também não apontou diferença na expressão dessa proteína após análise via *western blotting*. Em relação aos marcadores moleculares associados ao fenômeno da plasticidade sináptica e à expressão de receptores e subunidades de receptores glutamatérgicos, também não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de Sinaptofisina, PSD95, receptores AMPA, NMDAR1 e NR2B (figuras 15, 16, 17, 18 e 19). Diferentemente dos dados obtidos neste trabalho até o presente momento, o trabalho de Lugo e colaboradores mostrou que animais com a deleção da PTEN apresentaram uma diminuição da proteína PSD95 e do receptor metabotrópico de glutamato (mGluR). A PSD95 é uma proteína ligada à membrana pós-sináptica de sinapses glutamatérgicas (Jordan et al, 2004; Tan et al, 2016). Suas funções ainda não foram muito bem estabelecidas, mas por estar ligada a esse tipo de sinapse, acredita-se que ela possa estar envolvida na sua maturação e na organização dos receptores pós-sinápticos, como os receptores de NMDA (Jordan et al, 2004; Tan et al, 2016).

6.2. Na prole

Além de análises bioquímicas realizadas nas fêmeas após dez dias de exercício físico voluntário, também foram feitas análises nas progenitoras WT (exercício WT) em comparação ao controle do mesmo genótipo (controle WT) após o desmame da prole (cerca de 60 dias desde o início do protocolo, sendo 10 dias de exercício, 4 dias com o macho para acasalamento, 21 dias de prenhez e mais 21 dias de amamentação). Utilizamos somente fêmeas WT como progenitoras em função da baixa taxa de reprodução de fêmeas HT e para gerar filhotes somente de mães que não possuem deleção no gene da PTEN. No caso dessas fêmeas, foi possível observar um aumento na expressão do receptor de NMDAR1 e na atividade do CREB, quando se compara fêmeas sedentárias com fêmeas que praticaram o exercício físico voluntário, fato que já é descrito na literatura (Dietrich et al, 2005; Real et al, 2010; Vivar et al, 2012). Também foram realizadas análises quanto à expressão de sinaptofisina e receptor AMPA, que não mostraram alterações em relação às fêmeas sedentárias. Esse fato pode ser explicado por um padrão diferente de modulação desses receptores pelo exercício físico, variando com o tipo, a duração a intensidade do exercício aplicado e com o gênero (Schmitt et al, 2009, Real et al, 2010).

Com relação aos resultados obtidos na prole, foram realizados protocolos de exercício físico voluntário como descrito na metodologia, porém, com o resultado obtido com o Labirinto em Cruz elevado, em que os animais pareciam ter desenvolvido um perfil ansioso (Fig. 29), o protocolo de exercício físico voluntário materno teve a seguinte alteração: ao invés da fêmea e sua prole permanecerem na caixa contendo a roda giratória até o desmame, a mesma foi retirada da caixa assim que os filhotes nasceram. O fato de deixar o ninho e os filhotes por certo tempo para uso da roda giratória pode ter gerado estresse na prole (Patel et al, 2013; Bohacek et al, 2015). Isso é descrito na literatura como um dos modelos de animais de estresse pós-traumático, levando ao aparecimento de certas características nos filhotes, como comportamento ansioso e depressivo, além de prejuízos cognitivos (Sheleg et al, 2017). Animais cuja progenitora foi submetida ao protocolo do exercício

físico voluntário com a retirada da roda mostrou uma possível melhora na atividade exploratória, também proposta pelo teste, ao passar maior parte do tempo na área central do aparato (Fig. 47), em comparação aos outros grupos experimentais (Controle e Exercício). Já no labirinto em cruz elevado, a prole submetida a essa adaptação no protocolo do exercício físico voluntário, não apresenta mais o mesmo comportamento de permanecer por mais tempo no braço fechado do aparato, observado quando foi utilizado o protocolo original (Fig. 48). Assim, corroborando com o trabalho de Welberg e colaboradores (2006), concluímos que a retirada da roda de exercício das progenitoras logo após o nascimento dos filhotes permite que o comportamento materno de cuidados com a prole, como a construção do ninho e o incentivo para a micção dos filhotes (Alsina-Ilanes et al, 2015), seja preservado.

Seguindo este novo protocolo, não foi observado um possível comportamento ansioso da prole em comparação ao grupo controle e ao grupo submetido ao protocolo original, o que reforça a idéia exposta na hipótese descrita no parágrafo anterior. Essa mudança no protocolo também pode ter ocasionado um melhor desempenho desses animais nos outros testes realizados na vigência desse estudo. No caso do Labirinto Aquático de Morris nota-se uma possível melhora do aprendizado da tarefa proposta no teste (localizar a plataforma submersa após várias sessões de treinamento) pelos animais cuja progenitora foi submetida ao protocolo adaptado de exercício voluntário (Roda Retirada – figura 33). Comparando-se os animais HT deste grupo em relação aos demais animais, é possível observar a melhora do tempo para localizar a plataforma submersa apenas no segundo e terceiro dia de treinamento, em comparação ao grupo controle, e somente no segundo dia em comparação ao grupo exercício. Já os animais WT apresentaram uma melhora nos dois últimos dias da sessão de treinamento, comparado ao grupo submetido ao protocolo de exercício original. Esses resultados reforçam que, independentemente do genótipo, que a presença da roda de exercício físico após o nascimento dos filhotes pode influenciar no comportamento materno das progenitoras e conseqüentemente em aspectos cognitivos da prole durante seu desenvolvimento e na fase adulta (Welberg et al, 2006). Alguns trabalhos da literatura corroboram com o resultado apresentado, como o trabalho de Parnpiansil e colaboradores (2003). Ratos de 40 dias cujas mães fizeram

exercício físico também apresentaram uma melhora na sua memória espacial, relacionada ao teste no labirinto T múltiplo, porém a atividade física foi realizada somente durante o período de prenhez. No trabalho de Silva e colaboradores (da Silva et al, 2016.) foi observado que ratos cuja progenitora praticou exercício físico voluntário apresentaram uma melhora no aprendizado da tarefa proposta pelo teste do Labirinto Aquático, semelhante ao resultado proposto por esse projeto. Animais que são haploinsuficientes para a PTEN, ou seja, que possuem a deleção parcial desse gene, apresentam prejuízo em relação ao seu comportamento social (Arendt et al, 2010; Kazdoba et al, 2016), aspecto pode ser revertido por intervenções não farmacológicas, como o exercício físico. Nos testes relacionados ao comportamento social, porém, não foram observadas diferenças entre os grupos (figura 31 e 32). Os animais submetidos ao protocolo adaptado do exercício físico materno, não apresentaram preferência por nenhuma das situações propostas no teste, portanto esse protocolo parece não influenciar no comportamento social desses animais. No trabalho descrito por Smith e colaboradores (2016), são utilizados animais heterozigotos para a PTEN em um estudo que relaciona epilepsia e autismo. Smith verificou que esses camundongos não apresentaram déficit social quando comparado aos seus *littermates* WT, somente na indução de epilepsia nesses indivíduos. Lugo e colaboradores (2014), assim como Kwon e colaboradores (2006) observaram esse déficit comportamental em animais nocautes para a PTEN, comparando-se com animais WT. Por fim, a esquiva inibitória é considerada um teste de memória relacionada ao medo, associada a um estímulo intenso, sendo sua formação associada principalmente com amígdala e o hipocampo (Dietrich et al, 2005). Todos os grupos analisados lembraram-se do estímulo aversivo (choque) no dia do teste na comparação entre os grupos controle e roda retirada, porém apenas os animais exercício HT não se lembraram do estímulo aversivo, fenômeno retomado entre os animais que foram submetidos ao protocolo adaptado do exercício físico materno, reforçando mais uma vez a importância de retirar a roda de exercício do ambiente assim que a prole nasce (figura 35). Kwon e colaboradores (2006) utilizaram o teste do condicionamento de medo em animais com a mutação para o gene da PTEN, porém não foram observadas alterações relacionadas ao teste nesses animais. O trabalho

recém-publicado por nosso grupo mostrou que camundongos machos com a deleção condicionada da PTEN não recordaram o estímulo aversivo aplicado no treinamento. Essa característica foi resgatada após o protocolo de dieta intermitente (Cabral-Costa et al, 2018), ou seja, reforçando os possíveis benefícios que intervenções não farmacológicas podem trazer para animais com mutações para o gene da PTEN.

Foram realizadas análises da expressão de receptores e proteínas relacionadas a via da PTEN (PTEN, Akt e pAkt T308) e ao fenômeno da plasticidade sináptica (NMDAR1, AMPAR, NR2B, PSD95, Sinaptofisina, TrkB) e, sendo utilizados apenas animais da prole de fêmeas submetidas ao protocolo de exercício voluntário original, cuja roda de exercício é mantida até o final da amamentação dos filhotes, sem sofrer adaptações. O primeiro bloco de figuras ilustra a quantificação de proteínas relacionadas a via da PTEN no extrato citosólico de hipocampo dos camundongos estudados nesse projeto. De acordo com a figura 36, não foram observadas diferenças na expressão da PTEN entre os grupos WT e HT. Vale lembrar que no modelo de deleção condicionada no gene da PTEN utilizado nesse projeto, o gene é deletado em neurônios em toda a estrutura cerebral e, como o ensaio de *western blotting* é realizado com um homogenato de tecido, portanto possíveis diferenças na expressão da PTEN em diferentes grupos podem ser mascaradas. Para tanto, um método histológico, como imunofluorescência ou até mesmo uma separação de tipos celulares através do processo de *sorting*, poderia ser mais adequado para avaliação da expressão da PTEN nos diferentes grupos experimentais. Animais com diminuição na expressão da PTEN podem apresentar uma maior ativação da via da PI3K/ Akt, já que a PTEN deixa de inibi-la, além disso, a atividade física aeróbia também pode modular essa via, devido a uma maior produção de neurotrofinas (Chen et al, 2005). Os dois sítios de fosforilação da Akt, a Serina 438 e a Treonina 308, podem estar relacionadas ao aumento da atividade da Akt pelo exercício físico (Chen et al, 2005), apesar de algumas evidências mostrarem alteração da via da Akt na prole somente quando ocorre algum tipo de dieta materna, seja uma dieta restritiva (Martin-Gronert et al, 2008) ou hipercalórica (Benesh et al, 2013). Não foram encontradas diferenças na expressão total ou na forma fosforilada da Akt entre os grupos (figura 37), porém um dos trabalhos publicados pelo nosso

grupo com animais haploinsuficientes da PTEN mostrou um aumento da fosforilação da Akt no resíduo T308, fato que foi revertido pelo protocolo da dieta intermitente (Cabral-Costa et al, 2018).

Quanto aos marcadores dos fenômenos de plasticidade sináptica e de neurogênese foram realizados mais alguns ensaios de *western blotting* a fim de verificar sua expressão nos diferentes grupos experimentais. A PSD95 é uma proteína ligada à membrana pós-sináptica de sinapses glutamatérgicas. Suas funções ainda não foram muito bem estabelecidas, mas por estar ligada a esse tipo de sinapse, acredita-se que ela possa estar envolvida na sua maturação e na organização dos receptores pós-sinápticos, como os receptores de NMDA (Jordan et al, 2004; Smith et al, 2015). Tan e colaboradores (2016) diminuíram a expressão do gene da PTEN utilizando um inibidor específico, o BPV(pic). Com isso pode-se observar que a expressão da PSD95 aumentou com a inibição da PTEN em neonatos com sinapses comprometidas pelo tratamento com excesso do anestésico gasoso isoflurano. Adicionado a esse fenômeno, trabalhos da literatura mostram que o enriquecimento ambiental e o exercício físico também podem modular a expressão dessa proteína (Daly e Ziff, 2002). Porém no presente trabalho, não foi evidenciada diferença de expressão da PSD95 entre os grupos (figura 39), talvez pelo fato do exercício não ser aplicado diretamente nos animais e pelo fato da PTEN não ser deletada em todas as células, podendo assim, ativar outras vias compensatórias como uma estratégia do organismo para manter a homeostase. A sinaptofisina também é uma proteína relacionada às sinapses, mais especificamente encontrada em vesículas pré-sinápticas, cuja função ainda não é totalmente elucidada, embora acredita-se que ela desempenhe funções na endocitose e reciclagem dessas vesículas (Patel et al, 2013). Sua deleção pode causar alterações cognitivas, prejudicando a aprendizagem e a memória e provocando alterações na plasticidade sináptica (Patel et al, 2013; Bohacek et al, 2015). Portanto, é possível que os déficits observados nos camundongos com a deleção condicionada da PTEN ocorram em parte devido à diminuição da sinaptofisina. Existem evidências de que o exercício físico materno é capaz de aumentar a expressão de sinaptofisina na prole (Bohacek et al, 2015), no entanto não foi detectada nenhuma diferença entre a prole dos grupos do exercício físico materno e seu respectivo controle (figura 38).

Os receptores de NMDA são constituídos de canais permeáveis ao cálcio, portanto, além da simples sinalização elétrica, têm suma importância na plasticidade sináptica, no aprendizado e na formação de memória (Zhu et al, 2016). A PTEN que é expressa nos dendritos e nos espinhos dendríticos de neurônios, pode estar relacionada ao receptor de NMDA através do seu ancoramento, juntamente com a PSD95, nas vesículas pós-sinápticas, processo importante para o fenômeno relacionados a consolidação de memória (Jurado et al, 2010). Os receptores de NMDA variam nas subunidades NR1, NR2 (A-D) e NR3 (subunidade de menor expressão em neurônios) (Zhu et al, 2016). A atividade física também pode alterar positivamente a expressão dessas subunidades, proporcionando um aumento na expressão desses receptores e de sua forma fosforilada (Jurado et al, 2010). No presente estudo, observa-se pela figura 40 um aumento da expressão da forma fosforilada do NMDAR1 em animais HT cuja progenitora foi submetida ao exercício físico voluntário em relação ao mesmo genótipo de mães sedentárias. Alguns trabalhos com modelos de autismo descritos em Wang, Kery e Xiong (2017) mostram que pode ocorrer tanto aumento quanto a diminuição da fosforilação do NMDAR1. Em modelos de autismo induzidos por administração de ácido valpróico (Rinaldi et al, 2015) ocorre um aumento na expressão desse receptor, salientando que uma das vias de ação do ácido valpróico é a diminuição na expressão do gene da PTEN (Mahmood et al, 2017). Portanto, um aumento da expressão da forma ativa do receptor NMDAR1 pode ocorrer por efeito tanto da deleção condicionada do gene da PTEN, quanto pelo exercício físico materno, o que inclusive pode corroborar com o fato destes animais (Exercício HT) apresentarem uma melhora no aprendizado da localização da plataforma durante o teste do Labirinto Aquático de Morris. Alterações na expressão do receptor AMPA, assim como os receptores de NMDA, podem influenciar eventos relacionados a plasticidade sináptica, como o LTP e o LTD (Mahmood et al, 2017, Arendt et al, 2010), através de alterações nos subtipos GluR1 e GluR2 (Calhoun et al, 1996). O exercício físico pode modular o sistema glutamatérgico, incluindo os subtipos do receptor AMPA, porém esse fato não foi evidenciado nos resultados apresentados por esse trabalho (figura 41). Além disso, Arendt e colaboradores (2010) estabeleceram uma relação entre o PIP3, o receptor AMPA pós-sináptico e o acúmulo de PSD95 nos espinhos

dendríticos. Pesquisadores sugerem que o PIP3 é necessário para a presença do GluR1 nas sinapses, o que explicaria uma maior expressão do subtipo GluR1 nos animais haploinsuficientes da PTEN. (Arendt et al, 2010; Jordán-Álvarez et al, 2012).

O BDNF é uma neurotrofina produzida nos neurônios de mamíferos e desempenha papéis na sinalização de sobrevivência celular e na plasticidade sináptica. Sua produção pode ser estimulada através da prática da atividade física (Yang et al, 2014) e pode ser responsável pelo transporte da proteína vesicular PSD95 para os dendritos através da ativação da via da PI3K/Akt que é modulada pela expressão da PTEN (Yoshi e Constantine, 2007). Assim o exercício físico voluntário e a deleção condicionada da PTEN podem ter contribuído para o aumento da concentração do BDNF no grupo exercício HT (figura 41). Vale a pena frisar a importância da participação do receptor do BDNF, o TrkB, na plasticidade sináptica juntamente com os receptores de NMDA através da formação de LTP (Yoshi e Constantine, 2007). Apesar do aumento da concentração do BDNF no hipocampo dos animais submetidos ao protocolo do exercício físico materno, não foi possível observar modificações na expressão do receptor de TrkB entre os grupos experimentais (figuras 42 e 43).

A via da PTEN/Akt juntamente com o CREB podem estar envolvidos com a manutenção da função normal do sistema nervoso central, modulando o crescimento e proliferação de neurônios, podendo também modular a plasticidade sináptica e a memória de longa duração (Qu et al, 2016). Gu e colaboradores (122) mostram uma relação de enzima-substrato entre a PTEN nuclear e o fator de transcrição CREB, justamente pela PTEN possuir a função de fosfatase e com isso modular a fosforilação do CREB, além disso o CREB é um substrato que encontra-se a jusante da Akt, que com a inibição da PTEN se encontra ativada (Qu et al, 2016). Neste mesmo trabalho, quando ocorre a diminuição na expressão da PTEN, foi demonstrado que a fosforilação do CREB também diminui e a expressão de sua forma total aumenta. Da mesma forma, o exercício físico materno também pode modular esse fator de transcrição através de fatores epigenéticos (Fernandes et al, 2017). Não foi observado um aumento da atividade do CREB nos animais que foram submetidos ao protocolo de exercício materno, talvez pelo fato do exercício ser

uma forma de compensação no aumento do CREB provocado pela deleção da PTEN (figuras 46 e 47).

7. Conclusão

De forma geral o exercício físico materno foi capaz de aumentar alguns marcadores relacionados ao fenômeno da plasticidade sináptica, envolvido diretamente na formação de memória e da capacidade de aprendizado, corroborado com uma melhor performance em alguns testes comportamentais. Portanto, os resultados sugerem que o exercício físico materno, desde que respeitada as condições do cuidado materno durante o puerpério e a amamentação, pode ser benéfico para a prole *wild type*, e HT para o gene da PTEN. Quanto as progenitoras, concluímos que o exercício voluntário com uma duração mais prolongada pode apresentar benefícios diretos nessas fêmeas, como o aumento da expressão de marcadores relacionados à plasticidade sináptica.

8. Referências Bibliográficas

Alessi, D.R. et al, **Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1**, *Embo J.*, v.15, p.6541-6551; 1996.

Alkadhi, Karim A. **Exercise as a positive modulator of brain function**. *Molecular neurobiology*, v. 55, n. 4, p. 3112-3130, 2018.

Allen, D.M. et al; **Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis**, *Genes & develop*, v.15, p. 554-566, 2001.

Alsina-Ilanes, M; De brun, V; Olazábal, D. E. **Development and expression of maternal behavior in naive female C57BL/6 mice**. *Developmental psychobiology*, v. 57, n. 2, p. 189-200, 2015.

Araki, K. et al; **Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters**, *J Biochem*, v.122, p.977-982, 1997.

Arendt, K. L. et al; **PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane**. *Nature neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 36-44, 2010.

Asku, I. et al; **Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF e BDNF levels of rat pups in early and late periods of life**, *Neurosc Letter*, v.516, p.221-225, 2012.

Aujnarain, A B. et al. **Effects of exercise and enrichment on behaviour in CD-1 mice**. *Behavioural brain research*, v. 342, p. 43-50, 2018

Backman S.A. et al. **Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease**. *Nat Genet*, v. 29, p. 396–403, 2001

Barnes, A.P. e Veleza-Rotse, B.O.; **Brain patterning perturbations following PTEN loss**; *Frontiers in Molec Neurosc*; v.7, article 35, 2014.

Benesh, E. C. et al. **Maternal high-fat diet induces hyperproliferation and alters Pten/Akt signaling in prostates of offspring**. *Scientific reports*, v. 3, 2013.

Bey, A L.; JIANG, Y. **Overview of mouse models of autism spectrum disorders.** *Current protocols in pharmacology*, v. 66, n. 1, p. 5.66. 1-5.66. 26, 2014.

Bohacek, J. et al. **Pathological brain plasticity and cognition in the offspring of males subjected to postnatal traumatic stress.** *Molecular psychiatry*, v. 20, n. 5, p. 621-631, 2015.

Bradford, M.M.; **A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,** *Anal Bioch*, v.72, p. 248-254, 1976.

Brännvall, K. et al; **Strogen-receptor dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation;** *Mol Cell Neurosc*, v.21, p.512-520, 2002.

Brezun, J.M. e Daszuta, A.; **Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and subventricular zone of adult rats;** *Neurosc*, v.89, p. 2186-2189, 1999.

Butler, M.G. et al; **Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumor suppressor gene mutations,** *J Med Gerut*, v.42, p.318-321, 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, 2018.

Cairn, P. et al; **Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate-cancer;** *Cancer Res*, v.57, p. 4997-5000, 1997.

Calhoun, M.E. et al; **Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses.;** *Journal of Neurob*, v.25, p.821-828, 1996.

Caracciolo, L. et al. **CREB controls cortical circuit plasticity and functional recovery after stroke.** *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 2250, 2018.

Carracedo, A. e Pandolfi, P.P.; **The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks;** *Oncogene*, v.27, p.5527-5541, 2008.

Carro, E. et al; **Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain,** *J Neurosci*, v.20, p. 2926-2933, 2000.

Chen, Z. et al; **Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN-deficit tumorigenesis**, *Nature*, v.436, p.725-730, 2005.

Clelland, C.D. et al; **A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation**; *Science*, v.325, p.210-213, 2009.

Creer, D.J. et al; **Running enhances spatial pattern separation in mice**, *Proc Academ Sci*, v.107, p. 2367-2372, 2010.

D'antoni, Simona et al. **Dysregulation of group-I metabotropic glutamate (mGlu) receptor mediated signalling in disorders associated with Intellectual Disability and Autism**. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 46, p. 228-241, 2014.

Da Silva, S G et al.; **Maternal exercise during pregnancy increases BDNF levels and cell numbers in the hippocampal formation but not in the cerebral cortex of adult rat offspring**. *PLoS one*, v. 11, n. 1, p. e0147200, 2016.

Daly, C. e Ziff E.B. **Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis**. *J Biol Chem.*; v. 277, 9010–9015, 2002.

Dashtiyani, Amin Allah et al. **The effect of endurance training with and without vitamin E on expression of p53 and PTEN tumor suppressing genes in prostate glands of male rats**. *Biochimie open*, v. 4, p. 112-118, 2017

Dayi, A.et al; **Maternal aerobic exercise during pregnancy can increase spatial learning by affecting leptin expression on offspring's early and late period of life depending on gender**, *Sci World J*, 2012.

De Almeida, Alexandre Aparecido et al. **Physical exercise alters the activation of downstream proteins related to BDNF-TrkB signaling in male Wistar rats with epilepsy**. *Journal of neuroscience research*, v. 96, n. 5, p. 911-920, 2018.

Di Cristofano, A. et al; **PTEN is essential for embryonic development and tumor suppression**; *Nature Genetics*, v.19, p. 348-354, 1998.

Dietrich, M. O. et al; **Exercises affects glutamate receptors in postsynaptic densities from cortical brain mice**; *Brain Research*, v.1065, p.20-25, 2005.

Duman, C. H. et al. **Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice.** *Brain research*, v. 1199, p. 148-158, 2008.

Eriksson, Peter S. et al. **Neurogenesis in the adult human hippocampus.** *Nature medicine*, v. 4, n. 11, p. 1313, 1998.

Fabel, K. et al; **VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis;** *Eur J Neurisc*, v.18, p. 2803-2812, 2003.

Fernandes, J. et al; **Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and Cognition;** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; n.80, p. 443-456, 2017.

Fraser, M.M. et al; **Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities;** *Neurosc*, v.151, p.476-488, 2008.

Fricano-Kugler, Catherine J. et al. **Nuclear Excluded Autism-Associated Phosphatase and Tensin Homolog Mutations Dysregulate Neuronal Growth.** *Biological psychiatry*, v. 84, n. 4, p. 265-277, 2018.

Gage, F.H. e van Praag, H.; **Neurogenesis in Adult Brain;** *In: Neuropsychopharmacology - 5th generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*; Ed. Philadelphia, USA, 2002.

Garcia-Junco-Clemente, P. e Golshani, P. **PTEN, a master regulator of neuronal structure, function, and plasticity,** *Com & Integr Biol*, v.7, e.28358, 2014.

Gee, S. et al; **A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neuron of the adult brain,** *Neuron*, v.54, p. 559-566, 2007.

Glicoroska, J.P. e Manchievska, S.; **The effect oh Physical activity on cognition – Physical mechanisms,** *Mat Soc Med*, v.3, p.198-202, 2010.

González-salinas, S et al. **Retrieval of Inhibitory Avoidance Memory Induces Differential Transcription of arc in Striatum, Hippocampus, and Amygdala.** *Neuroscience*, v. 382, p. 48-58, 2018.

Gould, E. et al; **Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.95, p.3168-3171, 1998.

Gray, I.C. et al; **Mutation and expression analysis of the putative prostate tumor-suppressor gene PTEN**; *Br J Cancer*, v.78, p.1296-1300, 1998.

Gregorian, C. et al; **PTEN deletion in adult neural stem/progenitor cell enhances constitutive neurogenesis**; *J Neurosci*, v.29, p. 1874-1886, 2009.

Groszer, M. et al; **Negative regulation of neural stem/progenitor cells proliferation by PTEN tumor suppressor gene in vivo**; *Science*, v.294, p.2186-2189, 2001.

Gu, T. et al; **CREB Is a Novel Nuclear Target of PTEN Phosphatase**; *Cancer Research*; n.71, v.8, p. 2821-2825, 2011.

Hafsi, S. et al; **Gene alterations in PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug resistance (review)**; *Int J Oncology*, v.40, p.639-644, 2012.

Hobert, J A.; Eng, C. **PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview**. *Genetics in Medicine*, v. 11, n. 10, p. 687, 2009.

Hopkins, M.E. e Bucci, D.J.; **BDNF expression in perihinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory**; *Neurobiol. Learn Mem*, v.94, p.278-284, 2010.

Hyman, C. et al. **BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra**. *Nature*, v. 350, n. 6315, p. 230, 1991.

Izquierdo, I. et al. **Separate mechanisms for short-and long-term memory**. *Behavioural brain research*, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999.

Jessberger, S. e Gage, F.H.; **Adult Neurogenesis: bridging the gap between mice and humans**, *Cell Press*, p.1-6, 2014.

Jordan, B. A. et al; **Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins**; *Molecular & cellular proteomics*, v. 3, n. 9, p. 857-871, 2004.

Jordan, B. A. et al; **Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins**; *Molecular & cellular proteomics*, v. 3, n. 9, p. 857-871, 2004.

Jordán-Álvarez, S et al. **Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of Drosophila**. *J Cell Sci*, p. jcs. 102806, 2012.

Jurado, S. et al.; **PTEN is recruited to the postsynaptic terminal for NMDA receptor-dependent long-term depression.** *The EMBO journal*, v.29.16; 2827-2840, 2010.

Kawamoto E. M. et al; **Curcumin requires tumor necrosis factor α signaling to alleviate cognitive impairment elicited by lipopolysaccharide;** *Neuro-Signals*; v.21, p.75-88, 2013.

Kazdoba, T. M.; Leach, P. T.; Crawley, J. N. **Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism.** *Genes, Brain and Behavior*, v. 15, n. 1, p. 7-26, 2016.

Kemperman, G. e Gage, F. H.; **Neurogenesis in the adult hippocampus.** *Neural Transplantation in Neurodegenerative Disease: Current Status and New Directions: Novartis Foundation Symposium 231.* John Wiley & Sons, Ltd, p. 220-241, 2000.

Kempermann, G. et al; **More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment;** *Nature*, v.386, p. 493-495, 1997.

Kempermann, G. **The neurogenic reserve hypothesis: What in adult hippocampal neurogenesis is good for?,** *Trends Neurosc*, v.31, p.163-169, 2008.

Kempermann, Gerd et al. **Human adult neurogenesis: evidence and remaining questions.** *Cell Stem Cell*, 2018.

Kenpermann, G. et al; **Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity;** *Frontiers in Neurosc*, v.4, art 189, 2010.

Khun, H.G., et al; **Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation,** *J Neurosc*, v.16, p. 2027-2033, 1997.

Kim et al; **The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups;** *Int J Dev Neurosc*, v.25, p.243-249, 2003.

Knafo, Shira; ESTEBAN, José A. **PTEN: local and global modulation of neuronal function in health and disease.** *Trends in neurosciences*, v. 40, n. 2, p. 83-91, 2017.

Kwon, C.H. et al; **PTEN regulates neuronal arborization and social interaction in mice;** *Neuron*, v.50, p. 377-388, 2006.

Lachyankar, M.B. et al; **A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation**, *J Neurosci*, v.20, p. 1404-1413, 2000.

Laemmli, V.K.; **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**, *Nature*, v.22, p.680-685, 1970.

Lee J. et al. **Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats**. *J Mol Neurosci*, v. 15, p. 99–108, 2000.

Lee, H.H. et al; **Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rats pups**, *Brain and Dev*, v.28, p. 147-154, 2006.

Lehman, J.A. et al; **Induction of apoptotic genes by a p73-phosphatase and tensin homolog (p73-PTEN) protein complex in response to genotoxic stress**, *J Biol Chem*, v.286, p.36631-36640, 2011.

Li, J. et al; **PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer**; *Science*, v.275, p. 1943-1947, 1997.

Li, L. et al; **Profiling of genes expressed by PTEN haploinsufficient neural precursor cel**, *Mol Cell Neurosci*, v.24, p. 1051 -1061, 2003.

Li, L. et al; **PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis and proliferation**, *Mol Cell Neurosci*, v.20, p. 21-29, 2002.

Lie, D.C. et al; **Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases**, *Annual Rev Pharmac Toxicol*, v.16, p.399-421, 2004.

Lugo J.N. et al; **Deletion of PTEN produces autism like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins**, *Front Mol Neurosci*, v.7, p.27, 2014.

Lv, J.W. et al; **Role oh the PTEN signaling pathway in autism spectrum disorder**; *Neurosc Bull*, v.29, p.773-778, 2013.

Lyu, Jingwen et al. **The protein phosphatase activity of PTEN is essential for regulating neural stem cell differentiation**. *Molecular brain*, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.

Maciel, R.S.; **Estudo do tratamento com PCPA sobre o desenvolvimento e plasticidade das projeções retinotectais de roedores**, Dissertação de mestrado, p.29, 2007.

Maehania, T. e Dixon, J.E.; **The tumor suppressor PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate**; *J Bio Chem*, v.273, p.13375-13378, 1998.

Mahmood, U. et al; **Dendritic Spine anomalies and PTEN alterations in a mouse model of VPA-induced autism spectrum disorder**; *Pharmacological Research*, p.1-12, 2017.

Malberg, J.E. et al; **Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus**; *J Neurosc*, v.20, p. 9104-9110, 2000.

Mallinow, R. e Malenka, R. C; **AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity**; *Annual review of neuroscience*, v. 25, n. 1, p. 103-126, 2002.

Manev, H. et al; **Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro**; *Eur J Pharmac*, v.411, p.67-70, 2001.

Manning, B.D. e Cantley, L.C.; **AKT/PKB signaling navigating downstream**; *Cell*, v.129, p.1261-1274, 2007.

Marino S. et al. **PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumorigenesis in the cerebellum**. *Development*, v. 129, p. 3513-22, 2002.

Martin-Gronert, M. S. et al; **Maternal protein restriction leads to early life alterations in the expression of key molecules involved in the aging process in rat offspring**. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 294, n. 2, p. R494-R500, 2008.

Masson, G.S. et al; **Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity**, *PLoS One*, v.9, e94927, 2014.

Molteni, R. et al; **Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray**; *Eur J Neurosc*, v.16, p.1107-1116, 2002.

Morgan, J. A. et al. **The effects of aerobic exercise on depression-like, anxiety-like, and cognition-like behaviours over the healthy adult lifespan of C57BL/6 mice**. *Behavioural brain research*, v. 337, p. 193-203, 2018.

- Nadler, J.J. et al; **Automated apparatus for quantification of social approach behaviors in mice**, *Genes Brain Behav*, v.3, p.303-314, 2004.
- Nagy, A. et al; **Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring**, *Genesis*, v.26, p.99-109, 2000.
- Napoli, E. et al; **Mitochondrial dysfunction in PTEN haplo-insufficient mice with social deficits and repetitive behavior: interplay between PTEN and p53**; *PLoSOne*, v.7, e42504, 2012.
- Numakawa, T. et al. **BDNF function and intracellular signaling in neurons**. *Histology and histopathology*, v. 25, n. 2, p. 237-258, 2010.
- Ogawa, S. et al; **A seizure-prone phenotype is associated with altered free running rhythm in PTEN mutant mice**; *Brain Res*, v.1168, p. 112-123, 2007.
- Paenpiansil, P. et al; **Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup**. *Neuroscience letters*, v. 352, n. 1, p. 45-48, 2003.
- Patel, P D. **Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in c57bl/6 mice**. *Hormones and behavior*, v. 63, n. 3, p. 411-417, 2013.
- Perez-Martin, M. et al; **An antagonist of strogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female**; *Eur J Science*, v. 18, p. 923-930, 2003.
- Podsypanina, K. et al; **Mutation of PTEN/MMAC1 in mice causes neoplasia in multiple organ system**, *Proc Natl Acad Scienc USA*, v.96, p. 1563-1568; 1999.
- Qu, L et al. **Role of PTEN-Akt-CREB signaling pathway in nervous system impairment of rats with chronic arsenite exposure**. *Biological trace element research*, v. 170, n. 2, p. 366-372, 2016.
- Raftopoulos M. et al; **Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN**; *Science*, v. 303, p.1179-1181, 2004.
- Real, C. C. et al; **Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain**; *Brain research*, v. 1363, p. 63-71, 2010.

Rinaldi, T. et al; **Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.104, p.13501–13506, 2007.

Robinson, A.M. e Bucci, J.; **Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring,** *Neurosc*, v.256, p.53-60, 2014.

Salmena, L. et al; **Tenets of PTEN tumor suppression,** *Cell*, v.133, p. 403-414, 2008.

Schmitt, U. et al; **Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin;** *Behav Neurosc*, v.162, p.234-243, 2009.

Shaw, K.N. et al; **Lyopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus,** *Behav Brain Res*, v.124, p.47-54, 2001.

Sheleg, MI et al. **Decreased maternal behavior and anxiety in ephrin-A5^{-/-} mice.** *Genes, Brain and Behavior*, v. 16, n. 2, p. 271-284, 2017.

Shen, W.H. et al; **Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity,** *Cell*, v.128, p.157-170, 2007.

Silverman, J. L. et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 490, 2010.

Smith, G.D.; White, J.; LUGO, J.N.; **Superimposing Status Epilepticus on Neuron Subset-Specific PTEN Haploinsufficient and Wild Type Mice Results in Long-term Changes in Behavior.** *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

Song, Zhiwen et al. **PTEN silencing enhances neuronal proliferation and differentiation by activating PI3K/Akt/GSK3 β pathway in vitro.** *Experimental cell research*, v. 363, n. 2, p. 179-187, 2018.

Sperow M. et al; **Phosphatase and tensin homologue (PTEN) regulates synaptic plasticity independently of its effects on neuronal morphology and migration,** *J Physiol*, v.590, p.777-792, 2012.

Stambolic, V. at al; **Negative Regulation of PKB/AKT-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN,** *Cell*, v.95, p.29-39, 1998.

Steck P.A. et al. **Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers.** *Nat Genet*, v. 15, p. 356-362, 1997

Sternberg, N. e Hamilton, D.; **Bacteriophage P1 site specific recombination I recombination between loxP site**, *J Mol Biolog*, v.150, p.467-486, 1981.

Suzuki, A. et al; **High cancer susceptibility and embryonic lethality associated ith mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice**, *Curr Biol*, v.8, p.1168-1178, 1998.

Tait, I.S. et al, **PTEN, longevity and age-related disease**, *Biomed*, v.1, p.17-48, 2013.

Tamura, M. et al; **Inhibition of cell migration, spreading and local cohesions by tumor suppressor PTEN**; *Science*, v.280, p. 1614-1617, 1998.

Tan, L. et al; **Pharmacological inhibition of PTEN attenuates cognitive deficits caused by neonatal repeated exposures to isoflurane via inhibition of NR2B-mediated tau phosphorylation in rats**. *Neuropharmacology*, 2016.

Tang, S.J. et al; **A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus**; *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.99, p. 467-472, 2002.

Tashiro, A. et al; **Experience specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage**, *J Neurosc*, v.27, p.3252 – 3259, 2007.

Texel et al; **Ceruloplasmin deficiency results in anxiety phenotype involving deficits in hippocampal iron, serotonin and BDNF**; *J Neurochem.*; v.120, p. 125-134, 2012.

Trejo, J. et al; **Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus**, *J Neurosc*, v.21, p. 1628-1634, 2001.

van der Borght, K. et al; **Hippocampal cell proliferation across the day: increase by running wheel activity, but no effect of sleep and wakefulness**, *Beh Brain Res*, v.167, p.36-41, 2006.

van Praag, H. et al; **Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus**; *Nat Neurosc*, v.2, p.266-270, 1999.

van Praag, H.; **Exercise and the brain: something to chew on**; *Cell Press*, v.32, p.283-290, 2009.

van Praag, H; **Neurogenesis and exercise: past and future directions**; *Neuromol Med*, v.10, p.128-140, 2008.

Varga, E.A. et al; **The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric with autism spectrum disorder, developmental delay and macrocephaly**; *Genet Med*, v.11, p.111-117, 2002.

Vasconcelos, A.R. et al; **Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide – induced neuroinflammation and memory impairment**; *J Neuroinflam*, v.11, p.85, 2014.

Vaynman, S. et al; **Interplay between brain derived neurotrophic factor and signal transduction modulates in the regulation of the effects of exercise on synaptic plasticity**; *Neurosc*, v.122, p.647-657, 2003.

Vivar, C.; Potter, M. C.; Van Praag, H. **All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis**. *In: Neurogenesis and Neural Plasticity. Springer Berlin Heidelberg*, p. 189-210, 2012.

Wang, X., Kery, R., & Xiong, Q.; **Synaptopathology in autism spectrum disorders: Complex effects of synaptic genes on neural circuits**. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2017

Wang, Y. et al; **The PTEN phosphatase is essential for long term depression of hippocampal synapses**, *Neuronal Med*, v.8, p.329-336, 2006.

Welberg, L. et al; **Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats**; *Psychoneuroendocrinology*; v.31, n.5, p.553-564, 2006.

Weston, M.C. et al; **Multiple Roles for mammalian target of rapamycin signaling in both glutamatergic and GABAergic synaptic transmission**, *J Neurosc*, v.32, p. 11441-11452, 2012.

Yang, Jeng-Lin, et al. **BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1**. *Neuromolecular medicine*, v.16.1, p.161-174, 2014.

Yoshii, A. e Constantine-Paton, M.; **BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation**. *Nature neuroscience*, v.10.6, p.702-711, 2007

Zhou, J. e Parada, L.F.; **PTEN signaling in autism spectrum disorder**, *Curr Opin Neurobio*, v.22, p. 873-879, 2012.

Zhu, S. et al; **Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation.**, *Cell*, v.165.3, p.704-714, 2016.

Zigova, I. et al; **Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb**, *Mol Cell Neurosc*, v.11, p.234-245, 1998.