JOÃO VICTOR CABRAL-COSTA

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

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Versão original.

São Paulo
2017

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 PTEN

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

Sua atividade mais bem caracterizada é a de fosfatase proteica e lipídica, apresentando como ação clássica a conversão de 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP₃) em 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), apesar de já existirem estudos indicando mecanismos fosfatase-independentes (5,6). Assim, a PTEN antagoniza a atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – enzima responsável pela ativação da AKT (Figura 1). Desta forma, a PTEN, atuando como regulador negativo das vias a jusante da AKT, apresenta um importante papel na modulação de diversos processos – como, por exemplo, o crescimento e a proliferação – podendo ser considerada um fator crítico durante o período de desenvolvimento, tendo em vista que, durante a embriogênese, reprime a proliferação e sobrevivência celulares (7).

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

A ativação de um receptor do tipo tirosina quinase, como o receptor de insulina, por exemplo, leva à sua autofosforilação, com posterior ativação do substrato do receptor de insulina (IRS) e da PI3K, que fosforila PIP₂ em PIP₃. A PDK pode, assim, ancorar-se na membrana, ativando-se e fosforilando a AKT, ativando assim sua via de sinalização. A PTEN, por sua vez, antagoniza esta ativação por meio da desfosforilação de PIP₃ em PIP₂. Adaptado de Hemmings e Restuccia, 2012.(8)

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

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

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

1.2 Sistema Cre-loxP

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS*

1. Sacks O. Gratitude. 1st ed. [Toronto]: Knopf Doubleday Publishing Group; 2015. 64 p.
2. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(22):1922–32.
3. Gray IC, Stewart LM, Phillips SM, Hamilton J a, Gray NE, Watson GJ, et al. Mutation and expression analysis of the putative prostate tumour-suppressor gene PTEN. *Br J Cancer.* 1998;78(10):1296–300.
4. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 1997;57(22):4997–5000.
5. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN Tumor Suppression. Vol. 133, *Cell.* 2008. p. 403–14.
6. Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, et al. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell.* 2011;144(2):187–99.
7. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13375–8.
8. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Sep 1;4(9):a011189–a011189.
9. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet.* 1998;19(4):348–55.
10. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1563–8.
11. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, et al. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol.* 1998;8(21):1169–78.
12. Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science.* 2004;303(5661):1179–81.
13. Stambolic V, Suzuki A, De la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 1998;95(1):29–39.
14. Perandones C, Costanzo RV, Kowaljow V, Pivetta OH, Carminatti H, Radrizzani M.

* De acordo com o Estilo Vancouver (98).

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

15. Backman SA, Stambolic V, Suzuki A, Haight J, Elia A, Pretorius J, et al. Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet*. 2001;29(4):396–403.
16. Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, et al. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* (80-). 2001;294(5549):2186–9.
17. Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Knoop LL, Tharp R, Smeyne RJ, et al. Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet*. 2001;29(december):404–11.
18. Marino S, Krimpenfort P, Leung C, van der Korput H a GM, Trapman J, Camenisch I, et al. PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumourigenesis in the cerebellum. *Development*. 2002;129:3513–22.
19. Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, Mitra P, Poluha W, Lambert S, et al. A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci*. 2000;20(4):1404–13.
20. Gu T, Zhang Z, Wang J, Guo J, Shen WH, Yin Y. CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res*. 2011;71(8):2821–5.
21. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. Vol. 11, *Current Opinion in Neurobiology*. 2001. p. 272–80.
22. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 1998;20(4):709–26.
23. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. Vol. 25, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014. p. 89–98.
24. Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, et al. Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. *Neuron*. 2006;50(3):377–88.
25. Fraser MM, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Baker SJ. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. *Neuroscience*. 2008;151(2):476–88.
26. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*. 2005;25(49):11300–12.
27. Sperow M, Berry RB, Bayazitov IT, Zhu G, Baker SJ, Zakharenko SS. Phosphatase and tensin homologue (PTEN) regulates synaptic plasticity independently of its effect on neuronal morphology and migration. *J Physiol*. 2012 Feb;590(4):777–92.

28. Wang Y, Cheng A, Mattson MP. The PTEN phosphatase is essential for long-term depression of hippocampal synapses. *Neuromolecular Med.* 2006 Jan;8(3):329–36.
29. Butler MG, Dasouki MJ, Zhou X-P, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, et al. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet.* 2005;42(4):318–21.
30. Lugo JN, Smith GD, Arbuckle EP, White J, Holley AJ, Floruta CM, et al. Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. *Front Mol Neurosci.* 2014;7(April):27.
31. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(14):5166–70.
32. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 1981;150(4):467–86.
33. Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem.* 1997;122(5):977–82.
34. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 2000 Mar;26(2):99–109.
35. Marangos PJ, Schmechel DE, Parma AM, Goodwin FK. Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res.* 1980;190(1):185–93.
36. Napoli E, Ross-Inta C, Wong S, Hung C, Fujisawa Y, Sakaguchi D, et al. Mitochondrial dysfunction in Pten Haplo-insufficient mice with social deficits and repetitive behavior: Interplay between Pten and p53. *PLoS One.* 2012;7(8).
37. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science.* 2009;325(5937):210–3.
38. Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. *PNAS.* 2010;107(5):2367–72.
39. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124(3):319–35.
40. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 1993;56(2):337–44.
41. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science (80-).* 1977;197(4308):1092–4.
42. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 1996;16(6):2027–33.

43. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3168–71.
44. Gould E, Daniels DC, Cameron HA, McEwen BS. Expression of adrenal steroid receptors by newly born cells and pyknotic cells in the dentate gyrus of the postnatal rat. *Mol Cell Neurosci*. 1992;3(1):44–8.
45. Brännvall K, Korhonen L, Lindholm D. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci*. 2002;21(3):512–20.
46. Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM. An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat. *Eur J Neurosci*. 2003;18(4):923–30.
47. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20(24):9104–10.
48. Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2001;411(1–2):67–70.
49. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*. 1998;11(4):234–45.
50. Aberg M a, Aberg ND, Hedbäck H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20(8):2896–903.
51. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(9):5263–7.
52. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Vol. 386, *Nature*. 1997. p. 493–5.
53. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):266–70.
54. Praag H Van, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(23):13427–31.
55. Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y, Akhavan MM, Semnanian S, Safari M. Voluntary exercise ameliorates cognitive deficits in morphine dependent rats: The role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Learn Mem*. 2011;96(3):479–91.
56. Hopkins ME, Bucci DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2010;94(2):278–84.

57. Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci.* 2000;20(8):2926–33.
58. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2003;18(10):2803–12.
59. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 2001;21(5):1628–34.
60. Redila VA, Christie BR. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience.* 2006;137(4):1299–307.
61. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming G-L, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci.* 2006;26(1):3–11.
62. Chen Y-W, Lin M-F, Chen Y-C, Hung C-H, Tzeng J-I, Wang J-J. Exercise training attenuates postoperative pain and expression of cytokines and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in rats. *Reg Anesth Pain Med.* 2013;38(4):282–8.
63. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jun;14(6):383–400.
64. Bruel-Jungerman E, Veyrac A, Dufour F, Horwood J, Laroche S, Davis S. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS One.* 2009;4(11).
65. van Praag H, Fleshner M, Schwartz MW, Mattson MP. Exercise, Energy Intake, Glucose Homeostasis, and the Brain. *J Neurosci.* 2014;34(46):15139–49.
66. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech Ageing Dev.* 1990;55(1):69–87.
67. Longo VD, Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 2014 Feb;19(2):181–92.
68. Fontán-Lozano A, Sáez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Domínguez SA, López-Lluch G, et al. Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurosci.* 2007;27(38):10185–95.
69. Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. Vol. 16, *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2005. p. 129–37.
70. Texel SJ, Camandola S, Ladenheim B, Rothman SM, Mughal MR, Unger EL, et al. Ceruloplasmin deficiency results in an anxiety phenotype involving deficits in hippocampal iron, serotonin, and BDNF. *J Neurochem.* 2012;120(1):125–34.

71. Kawamoto EM, Scavone C, Mattson MP, Camandola S. Curcumin requires tumor necrosis factor ?? signaling to alleviate cognitive impairment elicited by lipopolysaccharide. *NeuroSignals*. 2013;21(1–2):75–88.
72. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1306–11.
73. Ferguson D, Sapolsky R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci*. 2007;27(30):8046–52.
74. Shaw KN, Commins S, O’Mara SM. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav Brain Res*. 2001;124(1):47–54.
75. Okun E, Griffioen K, Barak B, Roberts NJ, Castro K, Pita M a, et al. Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(35):15625–30.
76. Vasconcelos AR, Yshii LM, Viel TA, Buck HS, Mattson MP, Scavone C, et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1):85.
77. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
78. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
79. Kawamoto EM, Munhoz CD, Glezer I, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R, et al. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 2005 Jun;26(6):857–64.
80. Masson GS, Costa TSR, Yshii L, Fernandes DC, Soares PPS, Laurindo FR, et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. Ulrich H, editor. *PLoS One*. 2014 May 1;9(5):e94927.
81. Furigo IC, Metzger M, Teixeira PDS, Soares CRJ, Donato J. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. *Brain Struct Funct*. 2017 Jan 12;222(1):341–63.
82. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. Vol. 13, *Cognitive Processing*. 2012. p. 93–110.
83. D’Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Vol. 36, *Brain research*. Brain research reviews. 2001. 60-90 p.
84. Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig K a. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci*. 2004;24(15):3826–36.

85. Fan X, Jin WY, Wang YT. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci.* 2014 Jun 10;8:160.
86. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):6216–20.
87. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jul;86(1):7–13.
88. Smith GD, White J, Lugo JN. Superimposing Status Epilepticus on Neuron Subset-Specific PTEN Haploinsufficient and Wild Type Mice Results in Long-term Changes in Behavior. *Sci Rep.* 2016 Nov 7;6:36559.
89. Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon C-H, Zhang W, Sinton C, et al. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *J Neurosci.* 2009;29(6):1773–83.
90. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002 Aug 21;134(1–2):49–57.
91. Anchan D, Clark S, Pollard K, Vasudevan N. GPR30 activation decreases anxiety in the open field test but not in the elevated plus maze test in female mice. *Brain Behav.* 2014 Jan;4(1):51–9.
92. Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Oct;29(10):493–8.
93. Okada R, Matsumoto K, Tsushima R, Fujiwara H, Tsuneyama K. Social isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neuro-signaling system and Egr-1 expression in the brain. *Neurochem Res.* 2014 May;39(5):875–82.
94. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell.* 2010 Oct;40(2):310–22.
95. Jurado S, Benoist M, Lario A, Knafo S, Petrok CN, Esteban JA. PTEN is recruited to the postsynaptic terminal for NMDA receptor-dependent long-term depression. *EMBO J.* 2010 Aug;29(16):2827–40.
96. Rubenstein JLR, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2003 Oct;2(5):255–67.
97. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. *Exp Neurol.* 2015 Jan;263:235–43.
98. Pestana MC, Dziabas MCC, Garcia EM, Santos MF dos, Nascimento MM, Cardoso SC. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver). 3ª ed. Funaro VMB de O, editor. São Paulo: Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas; 2016. 100 p.