

**FÁBIO RODRIGO MESQUITA BORGES**

**EFEITO DA VAGOTOMIA E DA ADMINISTRAÇÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE 2-DESOXI-D-GLICOSE E  
ESTREPTOZOTOCINA NA AQUISIÇÃO DE ESQUIVA EM RATOS  
SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)**

**FLORIANÓPOLIS, SC**

**2007**

**FÁBIO RODRIGO MESQUITA BORGES**

**EFEITO DA VAGOTOMIA E DA ADMINISTRAÇÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE 2-DESOXI-D-GLICOSE E  
ESTREPTOZOTOCINA NA AQUISIÇÃO DE ESQUIVA DE RATOS  
NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.**

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria**

**Florianópolis, SC**

**2007**

Se meus joelhos não doessem mais  
Diante de um bom motivo  
Que me traga fé, que me traga fé

Se por alguns segundos eu observar  
E só observar  
A isca e o anzol, a isca e o anzol  
A isca e o anzol, a isca e o anzol  
Ainda assim estarei pronto pra comemorar  
Se eu me tornar menos faminto  
Que curioso, que curioso  
O mar escuro trará o medo lado a lado  
Com os corais mais coloridos  
Valeu a pena, eh eh  
Valeu a pena, eh eh  
Sou pescador de ilusões  
Sou pescador de ilusões

(O Rappa)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, quer Ele seja entendido ou não pela ciência.

À minha mãe, pelo apoio, pelas palavras de coragem, pela compreensão e pela minha vida, sem ela eu não seria nada e nada seria possível.

Ao meu pai, pelos seus ensinamentos, pelos seus valores, pelo seu caráter. Sei que onde ele está torce por mim e espero ser merecedor de tudo o que me ensinou.

Aos meus irmãos e sobrinhos, na certeza de que a família é a base de tudo.

Aos meus amigos, que mesmo estando longe motivaram-me na busca por esta conquista.

Ao meu amigo Ed, por despertar em mim a paixão pela ciência.

Aos meus colegas de mestrado que no decorrer desta jornada tornaram-se meus amigos, em especial ao Eduardo, César, Ana Paula Luiz, Bruno, Murilo, Francisney e Samuel.

Aos meus colegas de laboratório Marcos, Luana, Isabel e Márcia por compartilharem comigo seus conhecimentos, colaborando com o meu crescimento.

Aos alunos de iniciação científica e monitoria, Rúbia, Fernanda, Ana Isabel, Diana e Ana Paula, pela amizade e desejo de fazer pesquisa.

Ao seu Carlos, seu Nivaldo, D. Vilma e Ana Cláudia pela amizade, paciência e interesse na resolução de qualquer problema.

Ao Nivaldo por zelar pela pós-graduação em Neurociências, pela disponibilidade, pelo empenho e pelo auxílio aos alunos deste programa.

Aos verdadeiros mestres que dedicaram seu tempo e empenho na tarefa de transmitir conhecimentos e fazer ciência em um país tão carente de recursos, muito obrigado pelo seu despreendimento.

Aos professores, não mestres, por possibilitar-me diferenciá-los.

Ao meu orientador, professor e mestre Moacir por acreditar no meu potencial, disponibilizar o seu laboratório, estimular-me à pesquisa e ensinar-me, meu mais sincero agradecimento.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SIGLAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	v
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Glicose e SNC.....	12
1.2. Aprendizado, Memória e o LCE.....	25
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Animais.....	30
3.2. Drogas.....	30
3.3. Canulação.....	31
3.4. Vagotomia.....	32
3.5. Labirinto em cruz elevado (LCE).....	33
<b>3.6. PROCEDIMENTOS.....</b>	<b>34</b>
3.6.1. Procedimento 1: Administração Intracerebroventricular (ICV) das drogas em estudo.....	34
3.6.2. Procedimento 2: Vagotomia bilateral.....	34
3.7. Coleta, transcrição e organização dos dados.....	35
3.8. Análise estatística.....	35
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura Química da 2-Desoxi-D-Glicose (2-DG)

Figura 2 – Inibição da enzima fosfoglicoisomerase pela 2-DG durante a glicólise

Figura 3 – Estrutura química da Estreptozotocina (STZ)

Figura 4 – Ligação da insulina ao transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) – transdução de sinal

Figura 5A – Gráfico da porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após injeção ICV das drogas em estudo.

Figura 5B– Gráfico da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após injeção ICV das drogas em estudo

Figura 6A – Gráfico do número total de entradas nos braços abertos (EA) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após injeção ICV das drogas em estudo.

Figura 6B – Gráfico do número total de entradas nos braços fechados (EF) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após injeção ICV das drogas em estudo.

Figura 7A – Gráfico da porcentagem de entrada nos braços abertos (%EA) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após realização de vagotomia bilateral subdiafragmática e ratos sham-operados.

Figura 7B – Gráfico da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após realização de vagotomia bilateral subdiafragmática e ratos sham-operados.

Figura 7C – Gráfico da porcentagem de encurtamento ( $\Delta$  shortening), considerando-se as variáveis porcentagem de entrada nos braços abertos e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após realização de vagotomia bilateral subdiafragmática e sham-operados.

Figura 8A - Gráfico do número total de entradas nos braços abertos (EA) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após realização de vagotomia bilateral subdiafragmática e sham-operados.

Figura 8B – Gráfico do número total de entradas nos braços fechados (EF) de ratos submetidos ao LCE no paradigma primeira e segunda exposição, após realização de vagotomia bilateral subdiafragmática e sham-operados.

Figura 9 – Gráfico do ganho de peso corporal de ratos submetidos à vagotomia subdiafragmática bilateral e de ratos sham-operados acompanhados por um período de quatro semanas pós cirurgia.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Aquisição de esquiva no LCE. Resultados do teste ANOVA de duas vias da análise do tempo total de exposição ao LCE (5 min.) indicando os principais efeitos e interações entre os grupos de animais submetidos à injeção ICV das drogas em estudo.....36
- Tabela 2 – Aquisição de esquiva dos braços abertos no LCE. Resultados do teste ANOVA de duas vias da análise do tempo total de exposição ao LCE (5 min.), indicando os principais efeitos e interações entre os grupos de animais submetidos à vagotomia e animais sham-operados.....37
- Tabela 3 – Avaliação da perda de peso corporal dos animais submetidos à vagotomia e sham-operados, decorridas 4 semanas após cirurgia. Resultados do teste ANOVA de duas vias, indicando os principais efeitos e interações.....38



## LISTA DE SIGLAS

**% EA:** Porcentagem de entrada nos braços abertos

**% TA:** Porcentagem de tempo nos braços abertos

**EF:** Número de entradas nos braços fechados

**EA:** Número de entradas nos braços abertos

**GLUT:** Transportador de glicose

**LCE:** Labirinto em cruz elevado

**2-DG:** 2- Desoxi -D- Glicose

**STZ:** Estreptozotocina

**ANOVA:** Análise de variância

**ICV:** Intracerebroventricular

**IP:** Intraperitonal

**E1:** Primeira exposição ao LCE

**E2:** Segunda exposição ao LCE

**SAD:** Doença de Alzheimer esporádica

**TGI:** Trato gastrointestinal

**IGF-I:** Fator de crescimento tipo insulina 1

**IGF-II:** Fator de crescimento tipo insulina 2

**POMC:** Pro-opiomelanocortina

**trKB:** Receptor do tipo tirosinoquinase

## RESUMO

A glicose é importante em processos relacionados à aprendizagem e memória, seja servindo de substrato metabólico para a atividade neuronal, seja através da ativação de aferências vagais. Tem sido demonstrado que ratos re-expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade, exibem elevada esquia dos braços abertos em relação à primeira exposição, fato esse atribuído à aprendizagem emocional adquirida durante a primeira exposição ao labirinto. Desse modo, é possível que a utilização de glicose, bem a como as aferências vagais, sejam igualmente importantes em processos mnemônicos no LCE. O presente estudo avaliou se a indução de estresse metabólico, mediante a administração intracerebroventricular (ICV) de 2-desoxi-D-Glicose (2-DG; análogo da glicose incapaz de participar do metabolismo) ou de Estreptozotocina (STZ; antagonista insulínico), assim como a vagotomia subdiafragmática bilateral, poderia prejudicar a aquisição de esquia dos braços abertos em ratos re-expostos ao LCE. Ratos Wistar machos, com cânula guia cronicamente implantada no ventrículo lateral esquerdo, receberam uma micro injeção de salina (0.9%), 2-DG (10 e 20  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ ) ou STZ (2,2 e 4.4 mg/kg) durante 3 minutos, e foram submetidos ao LCE por 5 min. No dia seguinte, cada animal foi re-exposto ao LCE por 5 min. sem administração de drogas. Os resultados indicaram que ratos tratados com salina ou sham-operados exibiram elevada esquia dos braços abertos na segunda exposição ao LCE em relação à primeira, o que é indicativo da ocorrência de aprendizagem emocional. Ao contrário, ratos tratados com 2-DG (20  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ ) e STZ (4.4 mg/kg), ou ainda vagotomizados, exibiram o mesmo nível de esquia dos braços abertos em ambas as exposições ao LCE. Portanto, a utilização neuronal de glicose, bem como as aferências vagais, são importantes para a ocorrência de aprendizagem emocional no LCE.

## ABSTRACT

Glucose is important for learning and memory processes, whether by providing metabolic substrate for neural activity underlying learning and memory, or indirectly, by activating vagal afferents. It has been shown that rats re-tested in the elevated plus maze (EPM), an animal model of anxiety, display increased open arm avoidance relative to the first EPM exposure, showing that an emotional like memory occurs along the first maze exploration. Thus, it is possible that glucose, as well as vagal afferents, could be similarly important for emotional learning in the EPM. The present study evaluated if the establishment of metabolic stress, induced by central administration of either 2-deoxy-D-Glucose (2-DG; a glucoprivic like drug) or streptozotocin (STZ; an antagonist of the insulin), as well as bilateral subdiaphragmatic vagotomy, could impair the open arm avoidance acquisition in rats submitted to the EPM. Male Wistar rats stereotaxically implanted with a stainless steel guide cannula into the left lateral ventricle were assigned to receive a microinjection of either saline (0.9%), 2-DG (10 and 20  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ ) or STZ (2,2 and 4.4 mg/kg) during three minutes and were submitted to a 5 minutes EPM exposure. On the next day, each animal was retested in the EPM for 5 minutes with no drug administration. The data showed that rats treated with saline or sham-operated exhibited increased open arm avoidance along the second EPM exposure, relative to the first, thus indicating the presence of emotional learning. In contrast, rats treated with 2-DG (20  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ ) and STZ (4.4 mg/kg), or even submitted to vagotomy, exhibited the same level of open arm avoidance in both EPM exposures. We concluded that neural glucose utilization, as well as the vagal afferents may underlie the emotional learning in the EPM test.

## **1. INTRODUÇÃO:**

### **1.1. GLICOSE E SNC:**

A glicose exerce papel fundamental no processo de modulação da memória agindo tanto periféricamente quanto no SNC (TALLEY et al, 2002). Regiões cerebrais relacionadas com aprendizado e memória, tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal exibem aumento da utilização de glicose, evidenciada por estudos que utilizam técnicas de tomografia por emissão de pósitrons (ALKIRE et al, 1998; KILPATRICK & CAHILL, 2003; SWARTZ et al, 1995). Portanto, a glicose poderia proporcionar substrato metabólico para circuitos neurais envolvidos com plasticidade neural (CHOEIRI et al, 2005).

Ao atingir a corrente sanguínea, a glicose é transportada através da barreira hematoencefálica e posteriormente para o interior das células neurais por um conjunto de proteínas transportadoras de glicose denominadas GLUT (*Glucose transporter*), subdivididas em três famílias: Classe I (GLUT 1-4), classe II (GLUT 5) e classe III (GLUT 6-9) (JOOST et al, 2002); os transportadores de glicose (GLUT 1 e GLUT 3), bem como a expressão de seus mRNAs, dá-se de forma abundante no cérebro (RAYNER, 1996; VANUCCI et al, 1997, 1998) e parecem estar intimamente associados a processos de aprendizagem. A expressão destes transportadores relaciona-se com o aumento da utilização local de glicose, ou seja, a expressão de GLUT 1 parece estar relacionada positivamente com plasticidade sináptica, paralela ao aumento da utilização de glicose em nível central, principalmente em regiões que se relacionam com processos cognitivos, como o hipocampo – área CA1 (CHOEIRI et al, 2005).

Dentre as discussões dos vários aspectos da captação da glicose e sua utilização, parece haver relação entre o aumento da captação de glicose durante ativação neuronal e função sináptica (MESSIER, 2004).

A captação da glicose e seu metabolismo cerebral acredita-se passar por três etapas intermediárias entre a transferência de glicose fora dos microvasos cerebrais e sua utilização pelos neurônios. (MESSIER, 2004).

A proteína GLUT 1 encontra-se localizada na barreira hematoencefálica e participa da regulação da passagem da glicose do sangue para o SNC e da disponibilização desta como combustível metabólico para as células neuronais. (GIAUME et al, 1997).

Primeiramente a glicose atravessaria o parênquima cerebral via ação de GLUT 1, isoforma de alto peso molecular (55 kDa); dentro das células endoteliais o transportador GLUT 1 é assimetricamente distribuído, sendo sua concentração três a quatro vezes maior na superfície abluminal em relação à superfície luminal (FARREL & PARDRIDGE, 1991). A diminuição da densidade de GLUT 1 na superfície luminal é sugerida como fator importante para o fluxo de glicose para estas células, devido ao fato da concentração endotelial de glicose ser menor do que a concentração plasmática sanguínea (MESSIER, 2004).

A alta abundância de GLUT 1 na superfície abluminal das células endoteliais cria um gradiente de concentração que facilita o fluxo de glicose do sangue para as células endoteliais. A glicose então é transportada para fora das células endoteliais no fluido cerebral extracelular, sendo uma porção substancial da glicose transportada deste fluido para os astrócitos que possuem processos (end feet) que circulam os capilares. O transporte do fluido extracelular para os astrócitos é realizado via transportadores de glicose do tipo GLUT 1, isoforma de baixo peso molecular (45 kDa). (MESSIER, 2004).

A glicose sendo captada por astrócitos, pode ser armazenada sob a forma de glicogênio, podendo ser degradada posteriormente e transportada de volta ao fluido extracelular (MESSIER, 2004).

Astrócitos possuem uma pequena reserva de glicogênio, porém, possuem alto padrão de degradação do mesmo; o glicogênio é degradado à glicose pela estimulação de receptores beta-adrenérgicos (FILLENZ & LOWRY, 1998 a, b). A rota astrocitária é provavelmente a preferencial para a glicose alcançar neurônios. (MESSIER, 2004)

Finalmente, o transportador de glicose do tipo GLUT 3, especificamente presente em neurônios, possibilita o transporte da glicose do fluido extracelular para os neurônios. (MESSIER, 2004).

O transportador de glicose do tipo GLUT 3, referenciado como um transportador de glicose neurônio específico foi originalmente encontrado expresso em uma grande variedade de tecidos humanos além do cérebro (KAYANO et al, 1988).

Estudos posteriores sugerem uma mais restrita expressão de GLUT 3 em tecidos humanos, incluindo o cérebro, testículos e espermatozóides (HABER et al, 1993).

GLUT 3 é a principal proteína transportadora de glicose neuronal (MAHER et al, 1993; NAGAMATSU et al, 1992). Grande número de estudos tem examinado mudanças plásticas na expressão de GLUT cerebral. Em geral estes estudos sugerem que a expressão de GLUT é plástica e consistentemente paralela a mudanças na ativação neuronal cerebral e utilização de glicose. Por exemplo, privação de água induz aumento na utilização local de glicose cerebral em estruturas osmorregulatórias, paralelo a um aumento nos níveis de GLUT 1 e GLUT 3 (DUELLI et al., 1999).

Em roedores, GLUT 3 possui localização principalmente cerebral. A expressão do mRNA deste transportador, em ratos, localiza-se em neurônios, incluindo o cerebelo, estriado, córtex e hipocampo (NAGAMATSU et al, 1993),

O fator final capaz de controlar a captação de glicose é o fluxo sanguíneo cerebral. À medida que o fluxo sanguíneo aumenta, a concentração sanguínea de glicose permanece alta e pode facilitar a entrada desta para dentro das células endoteliais por sustentar um alto gradiente de concentração entre os dois compartimentos (MESSIER, 2004).

Entretanto, muitos aspectos deste mecanismo de captação de glicose podem ser mediados por astrócitos localizados nas junções entre vasos sanguíneos e sinapses (ANDERSON & NEDERGAARD, 2003; ZONTA et al, 2003).

Além das proteínas transportadoras de glicose citadas anteriormente o cérebro também possui transportadores de glicose do tipo GLUT 4 e GLUT 8, sensíveis a ação da insulina, sendo a proteína do tipo GLUT 4 localizada em diversos locais do organismo como músculos esqueléticos, tecido adiposo e coração (BIRNBAUM, 1989), córtex cerebral e hipocampo (DORÉ et al, 1997). GLUT 8 possui localização principalmente cerebral, ressaltando-se o hipocampo, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e amígdala. (REAGAN et al, 2001; 2002).

O papel da insulina junto ao sistema nervoso central é alvo de uma série de hipóteses, sugerindo que esta participa proporcionando melhora de desempenho cognitivo em humanos e animais em uma ampla variedade de testes, incluindo sujeitos saudáveis, sujeitos idosos, pacientes portadores da doença de Alzheimer e modelos experimentais de resistência a insulina (REAGAN, 2005).

No cérebro dos mamíferos a insulina é formada em uma subpopulação de células piramidais e os receptores insulínicos encontram-se densamente distribuídos. Ambos parecem ter um papel neuromodulatório e controlar o metabolismo neuronal de glicose (BEGUM et al, 1991).

A insulina é necessária para a utilização de glicose na periferia e para sobrevivência neuronal no SNC (DEVASKAR, 1991). No cérebro, acredita-se que a insulina estimula a captação de glicose em células gliais (CLARKE et al, 1984; DRINGEN & HAMPRECHT, 1992) e aumenta a síntese de mRNA de GLUT 1 em culturas primárias de neurônios e glia (WERNER et al, 1989).

A maior concentração de células cerebrais receptivas à insulina, encontra-se em muitas estruturas formadoras do sistema límbico (HILL et al, 1986; ABOTT et al, 1999).

Insulina e IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I), um membro da superfamília da insulina e mitógeno bem caracterizado, são importantes moduladores de crescimento e atividade metabólica no SNC, sendo seus respectivos receptores abundantemente expressos no cérebro. (YE et al, 1996).

Insulina e IGF-I são neurotrópicos, uma vez que suportam crescimento neuronal, sobrevivência e diferenciação na ausência de outros fatores, promovendo crescimento de neuritos, migração, síntese protéica, expressão de proteínas do citoesqueleto e formação nascente de sinapses (YE et al, 1996).

Estudos que se utilizaram de marcação imunohistoquímica e radioimunoensaio demonstraram imunorreatividade à insulina em neurônios localizados no hipocampo, tálamo, hipotálamo e amígdala de animais experimentais e humanos (WOZNIAK et al, 1993; FROLICH et al, 1998).

Embora evidências experimentais indiquem que a insulina pode ser transportada através da barreira hematoencefálica ao LCR via captação mediada por receptor (PODUSLO et al, 2001), sua localização em neurônios no SNC e células gliais não havia sido demonstrada.

Entretanto, recentes evidências sugerem que o cérebro pode utilizar insulina de diferentes fontes, tanto produzida localmente, quanto periféricamente, para a realização de diferentes funções, incluindo cognição. (GEROZISSIS & KYRIAKI, 2003).

Além disso, a insulina participa do processo de modulação da glicose junto ao SNC, através de ligação à seus receptores, promovendo o aumento do tráfico de GLUT 4 em direção à membrana plasmática e GLUT 8, translocado do retículo endoplasmático (REAGAN, 2005).

Logo, o aumento dos níveis sanguíneos deste hormônio poderia sinalizar o aumento da expressão destes transportadores junto ao SNC. (SCHWARTZ et al, 1992).

Enquanto a relação entre glicose, insulina e função cognitiva está bem estabelecida, os mecanismos através dos quais a glicose e/ou insulina produzem “melhora” cognitiva não é esclarecido. (REAGAN, 2005).

O papel da sinalização insulínica e de IGF-I em relação ao desenvolvimento e função do SNC vem sendo estudado com a utilização de camundongos transgênicos e knock-out. (de la MONTE & WANDS, 2005).

Estes modelos sugerem que a sinalização insulínica ocorre via IGF-II (fator de crescimento semelhante à insulina – II), um ligante bi-funcional capaz de promover mecanismos de sinalização através da ativação de insulina e IGF-I no cérebro imaturo, entretanto, não é efetivo como a insulina para mediar metabolismo energético, homeostase da glicose, sobrevivência e cognição (NAKAE et al, 2001).

Os efeitos estimulatórios da insulina e IGF-I são mediados através de mecanismos complexos de sinalização celular, iniciando-se com o ligante acoplado-se aos seus respectivos receptores do tipo tirosinoquinase (ULLRICH et al, 1985).

Receptores insulínicos e IGF-I do tipo tirosinoquinase, fosforilam moléculas citosólicas incluindo o seu principal substrato, proteínas IRS (moléculas substrato do receptor de insulina). (SHPAKOV & PERTSEVA, 2000; MYERS et al, 1994).

Sendo assim, os transportadores de glicose do tipo GLUT 4 e GLUT 8, parecem funcionar como transportadores de glicose sensíveis à insulina, que podem contribuir para a homeostase neuronal, servindo como sensores



metabólicos que provêm ao neurônio uma avaliação do meio neuronal que o cerca (REAGAN, 2005).

Os mecanismos neurobiológicos envolvidos na modificação da função cognitiva pela insulina estão de acordo com os importantes mecanismos da memória *per se*. Insulina afeta a atividade neuronal em neurônios piramidais hipocampais, induz aumento da potenciação de longa duração (LTP) hipocampal, aumenta a utilização da glicose no córtex entorrinal e hipocampo e promove crescimento neuronal (STOCKHORST et al, 2004).

O SNC é sugerido como capaz de desempenhar um papel fundamental no metabolismo da glicose, via circuitos neurais centrais que se sobrepõem a circuitos capazes de controlar a ingestão de alimento e peso corporal (SCHWARTZ & PORTE, 2005).

O cérebro é um órgão insulino-sensitivo (HEIJBOER et al, 2006). A insulina provém informações aferentes ao SNC em relação à suficiência de reservas de gordura corporal. (HEIJBOER et al, 2006). A insulina aumenta a expressão gênica de POMC (pro-opiomelanocortina), normalmente diminuída durante períodos de jejum, e inibe a expressão de mRNA codificador de neuropeptídeo Y (NPY) que normalmente é aumentado no núcleo arqueado (ARC) durante o jejum. (BENOIT et al, 2002; SIPOLS et al, 1995).

A insulina, atualmente, acredita-se ser requerida para a homeostase da glicose (HEIJBOER et al, 2006). OKAMOTO et al, em 1985, demonstraram que a expressão seletiva de receptores de insulina no cérebro reduz a severidade da diabetes em camundongos com deficiência neste receptor.

A importância da sinalização neuronal da insulina é evidenciada em camundongos, cuja deleção do receptor de insulina neurônio-específico faz com que apresentem sobrepeso, resistência à insulina e tolerância à glicose. (HEIJBOER et al, 2006). Desta forma, há crescentes evidências que os neuropeptídeos com localização hipotalâmica envolvidos na regulação da ingestão de alimentos, também possam estar envolvidos na regulação do metabolismo da glicose e no metabolismo energético. (HEIJBOER et al, 2006).

Periféricamente o hormônio insulina participa de uma série de reações bioquímicas, tendo ação nos mais diversos órgãos, sendo seus principais alvos o fígado, tecido adiposo e massa muscular (BERNE et al, 2004).

No fígado, a insulina acelera o movimento interno da glicose, promove o armazenamento da glicose como glicogênio, estimula a glicólise e inibe a gliconeogênese (BERNE et al, 2004).

No músculo a insulina estimula o transporte de glicose para as células musculares, além de estimular o fluxo sanguíneo muscular (BERNE et al, 2004).

No tecido adiposo a insulina também estimula o transporte de glicose para o interior da célula, convertendo-a em  $\alpha$ -glicerofosfato, usado na esterificação de ácidos graxos, permitindo o seu armazenamento como triglicerídeos (BERNE et al, 2004).

Estados emocionais são expressos através de respostas comportamentais e fisiológicas, como por exemplo, a liberação de catecolaminas adrenais que media estados hiperglicêmicos, capaz de preparar o corpo para demandas energéticas associadas a comportamentos defensivos do tipo fuga/luta (GHIZONI et al, 2006). Entretanto, desde a escolha da estratégia defensiva a ser adotada, como o seu controle, são dependentes de processos de natureza cognitiva (GRAEFF, 1994).

Portanto, o processo de aquisição de memória torna-se mais efetivo sob condições de estimulação emocional (CAHILL & MCGAUGH, 1995; O'CARROLL et al., 1999; BLAKE et al., 2001; FORD et al., 2002), o que indica a participação de estruturas límbicas (amígdala) no processo de aquisição de "novas memórias".

Estas condições que envolvem aprendizado em situações provenientes de estímulo emocional também poderiam ser mediadas através de informações periféricas fornecidas pelo nervo vago; este nervo constitui-se no maior dos nervos cranianos, misto e essencialmente visceral. O nervo vago emerge do sulco lateral do bulbo na forma de filamentos radiculares, deixa o crânio pelo forame jugular, percorre o pescoço e o tórax, terminando no abdome; dá origem a numerosos ramos que inervam a faringe e a laringe, entrando na formação dos plexos viscerais que promovem a inervação autônoma das vísceras torácicas e abdominais. (MACHADO, 1985)

O nervo vago possui dois gânglios sensitivos, o gânglio superior (ou jugular) e o gânglio inferior (ou nodoso). Entre os dois gânglios reúne-se ao vago o ramo interno do nervo acessório. (MACHADO, 1985)

Funcionalmente as fibras vagais podem ser classificadas em aferentes e eferentes, sendo sub-classificadas em aferentes viscerais especiais, gerais e

somáticas gerais, eferentes viscerais gerais e viscerais especiais. (CARPENTER, 1999).

As fibras eferentes vagais originam-se em núcleos situados no bulbo e as fibras sensitivas (aferentes) nos gânglios superior (somáticas) e inferior (viscerais). (MACHADO, 1985).

Sendo assim, o nervo vago participa na constituição de plexos, que são emaranhados de filamentos nervosos e gânglios possuidores de elementos tanto do sistema nervoso simpático quanto do parassimpático, além de fibras viscerais aferentes. (MACHADO, 1985)

Dentre os principais plexos presentes na cavidade torácica, podemos citar o plexo cardíaco, o plexo pulmonar e o esofágico; na cavidade abdominal destaca-se o plexo celíaco, dentre outros plexos secundários. Vale ressaltar a participação do nervo vago na constituição destes plexos através da emissão de fibras pré-ganglionares a partir do tronco vagal anterior e posterior; as fibras parassimpáticas do vago passam pelos gânglios pré-vertebrais do simpático sem fazer sinapse, e terminam estabelecendo sinapses com gânglios e células ganglionares das vísceras abdominais, destacando-se os que formam os plexos mioentéricos (Auerbach) e submucosos (Meissner). (MACHADO, 1985).

A inervação sensoria do trato gastrointestinal (TGI) é responsável por monitorar uma grande variedade de informações pertinentes ao processo digestório, tais como: motilidade, secreção, absorção e fluxo sanguíneo (GRUNDY, 2006).

Esta informação sensoria converge até o SNC através do nervo vago e medula espinhal ao tronco encefálico onde a informação é processada e retransmitida à áreas encefálicas superiores (JOSI & GEBHART, 2000).

Projeções centrais destes neurônios convergem ao tronco cerebral e a medula espinhal e fazem sinapse com neurônios de segunda ordem que distribuem a informação visceral através de estruturas neuronais centrais particularmente a núcleos talâmicos envolvidos em cognição. (GRUNDY, 2002).

Projeções vagais ao tronco encefálico, mais especificamente ao NTS (núcleo do trato solitário), emitem aferências ao hipotálamo e estruturas límbicas associadas com aspectos comportamentais e emocionais do processamento sensorial (SAWCHENKO, 1983).

Diferentes populações de neurônios aferentes vagais localizam-se na camada mucosa ou muscular do TGI (GRUNDY, 2006). Terminações aferentes localizadas na camada mucosa estão intimamente associadas com a lâmina própria em proximidade à mucosa epitelial, mas não estão expostas diretamente ao conteúdo do lúmen (GRUNDY, 2006). Aferências vagais tem sido identificadas associadas à células epiteliais especializadas tais como as células enterocromafins, que podem ser sensores capaz de transduzir e monitorar as condições fisiológicas e químicas do conteúdo luminal (PHILIPS & POWLEY, 2000).

Neurônios sintetizadores de adrenalina e noradrenalina localizados no tronco cerebral (bulbo), possuem atividade glicorreceptiva, principalmente nas áreas A1 (bulbo ventrolateral caudal) e C1 (bulbo rostral) e A2 (NTS) e C2 (NTS), sendo assim, ingestões sistêmicas do agente glicoprívico 2-DG (fig. 1), demonstraram aumento da ingesta, hiperglicemia e expressão de Fos, predominantemente nas áreas C1 e C2, mas também em A1 e A2. (MARINO-NETO, SABI, PASCHOALINI, 2004).

Desta forma, estes neurônios poderiam mediar respostas comportamentais e metabólicas à alterações sistêmicas ou centrais nos níveis de glicose (MARINO-NETO, SABI, PASCHOALINI, 2004).

Neurônios localizados nas áreas A1/C1 e A2/C2 também podem ser ativados por outras situações de stress, tais como hemorragia, desafio imunológico, nado forçado, odores, promovendo a ativação de sistemas adrenérgicos bulbares, através de estímulos aferentes viscerais (MARINO-NETO, SABI, PASCHOALINI, 2004).

Logo, estes circuitos parecem ser importantes sob diferentes condições de estresse e demanda energética (MARINO-NETO, SABI, PASCHOALINI, 2004).

Sendo assim, duas vias de sinalização através das quais a glicose poderia atuar como mediadora do processo de aprendizado e memória tem sido propostas: a primeira atravessando livremente a barreira hematoencefálica e a segunda através da ativação de aferências periféricas, que levariam a mudanças na atividade neural de áreas de projeção no cérebro. (TALLEY et al, 2002).

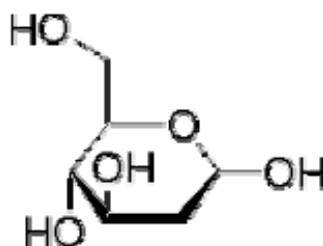
Nesse sentido, aferências vagais constituem-se em uma via de transmissão periférica, capaz de modular informações e transmiti-las ao NTS, reportando as condições gerais do corpo, dentre as quais se inclui a glicemia (CRAIG, 2003).

Desta forma, a secção bilateral subdiafragmática do nervo vago poderia levar ao comprometimento de uma ampla gama de informações periféricas capazes não só da manutenção da homeostasia, como também de processos que envolvem situações de conflito emocional e conseqüentemente aprendizado e memória.

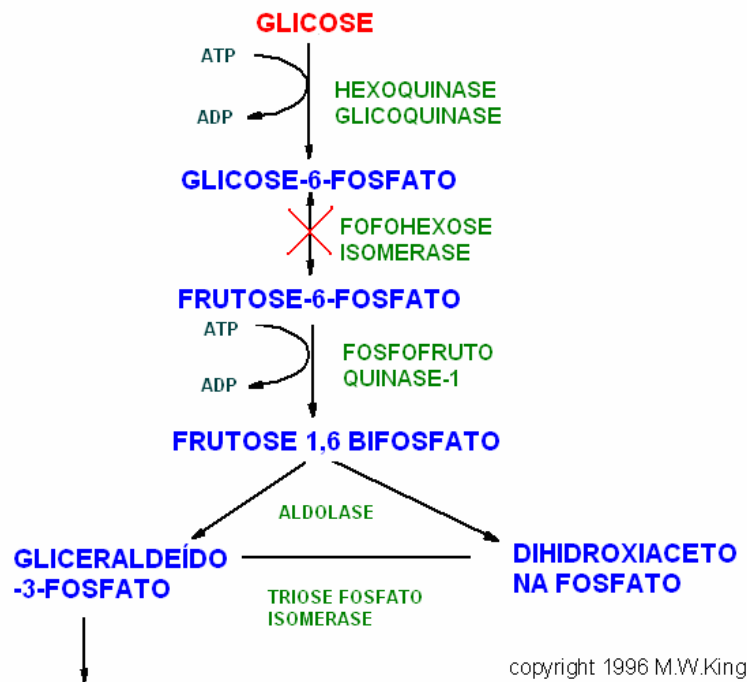
Por outro lado, processos mnemônicos podem ser prejudicados por situações de glicoprivação do SNC, como por exemplo, a utilização de análogos da glicose (2-Desoxi-D-glicose – 2DG), capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, mas incapazes de participar do metabolismo celular, induzindo estresse metabólico, com glicoprivação e prejuízo de processos cognitivos. (fig. 2)

Estudos demonstram que glicoprivação central com 2-DG induz uma modesta resposta regulatória, com significativo aumento na glicose sanguínea, adrenalina e corticosterona (MARIN-SPIOTTA et al, 2004).

Injeções de 2-DG no terceiro ventrículo induziram modesta resposta regulatória e hiperglicemia periférica, indicando que neurônios centrais glicossensíveis são estimulados por este tratamento (RITTER et al, 2000). Injeções via ICV de 2-DG são esperadas resultar em grande decréscimo da estimulação glicêmica em núcleos que circundam o ventrículo. O tronco cerebral também possui neurônios glicossensíveis dispersos em vários locais, sendo responsivos a estimulação com o agente glicoprívico 5-Tio-D-glicose, promovendo aumento na glicemia ou aumento na ingestão de alimento. (RITTER et al, 2000).

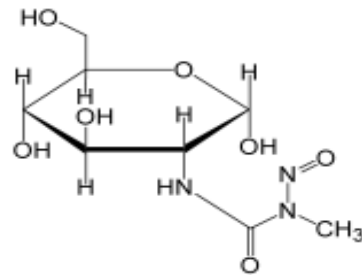


**Figura 1.** Estrutura química da 2-Desoxi-D-glicose (2-DG). Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/D8375> (Laboratórios Sigma-Aldrich)

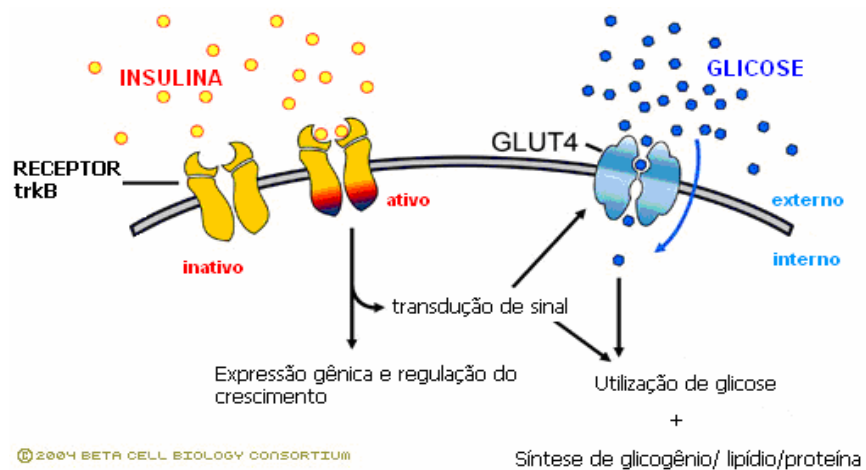


**Figura 2.** Primeira etapa da via glicolítica, demonstrando a inibição da enzima fosfoglicoisomerase ao ligar-se a 2-Desoxi-D-Glicose (2-DG). Fonte: adaptado de Indiana State University.

Outra forma de glicoprivação resulta da administração via ICV de estreptozotocina (fig. 3), uma glicosamina capaz de promover a privação de glicose celular, através da diminuição da autofosforilação dos receptores trkB (tirosinoquinases), diminuindo sua atividade intrínseca tirosinoquinase (KADOWAKI et al, 1984; BURANT et al, 1986; AR' RAJAB et al, 1993) e elevando a atividade fosfotirosina fosfatase (MEYEROVITCH et al, 1989, 1992; BEGUM et al, 1991). ( fig. 4). A injeção ICV de estreptozotocina tem sido utilizada como modelo no estudo da Doença de Alzheimer esporádica (SAD), caracterizada por progressiva neurodegeneração, sendo a causa mais comum de demência (GRÜNBLATT et al, 2004).



**Figura 3.** Estrutura química da estreptozotocina (STZ). Fonte: [www.axxora.com/files/formula/ALX-380-010.gif](http://www.axxora.com/files/formula/ALX-380-010.gif) (Axxora Platform)



**Figura 4.** Ligação da glicose e insulina a proteína GLUT 4 – Transdução de sinal. Fonte: Beta Cell Biology Consortium – 2004 (<http://www.betacell.org/content/articles/print.php?aid=1>)

Desta forma, o modelo de indução de SAD pela injeção ICV de estreptozotocina pode servir de estudo para a compreensão da SAD em humanos, caracterizada por uma progressiva deterioração de funções cognitivas e do metabolismo energético da glicose cerebral (GRÜNBLATT et al, 2004).

Como, os GLUTs 4 e 8 são sensíveis a ação da insulina e localizam-se em regiões límbicas, logo, a glicoprivação induzida pela STZ dá-se de maneira seletiva em regiões associadas ao aprendizado emocional, tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal.



## 1.2. APRENDIZADO EMOCIONAL, MEMÓRIA E O LCE:

O labirinto em cruz elevado (HANDLEY & MITHANI, 1984) é um bem conhecido modelo animal para o estudo da ansiedade em roedores (RODGERS & COLE, 1994).

Este modelo constitui-se em um labirinto em forma de cruz, com dois braços protegidos por paredes laterais e dois braços abertos.

Durante a exploração do labirinto instala-se uma situação de conflito no animal, caracterizada por uma pulsão exploratória motivada talvez por curiosidade ou busca de um companheiro de espécie, associada a uma pulsão para evitar a exploração motivada por medo (MONTGOMERY, 1955).

Durante a exploração do labirinto, normalmente por 5 minutos, os animais evitam os braços abertos, preferindo explorar os braços fechados. Esta preferência tem sido atribuída a ausência de superfície vertical nos braços abertos, o que impede o comportamento tigmotático dos animais (exploração do ambiente através das vibrissas), conseqüentemente reduz a exploração neste tipo de braço (TREIT et al, 1993), bem como ao nível de luminosidade, menor nos braços fechados em relação aos braços abertos (PEREIRA et al, 2005); desta forma, quanto maior a diferença de luminosidade entre estes dois ambientes, maior torna-se o conflito do animal em explorar estas áreas, optando pela exploração dos braços menos iluminados do labirinto. Sendo assim, a literatura indica que a preferência pelos braços fechados não se dá somente em função do comportamento tigmotático (CARDENAS et al, 2001), mas também pela capacidade do animal discriminar do ponto de vista exploratório áreas com menor ou maior nível de luminosidade, fazendo com que os animais não só evitem explorar os braços abertos, como também as áreas mais iluminadas do LCE. (PEREIRA et al, 2005).

O modelo do LCE, durante as duas últimas décadas, vem sendo validado constantemente do ponto de vista etológico (LISTER, 1990), fisiológico e farmacológico (PELLOW et al, 1985). A validação comportamental é demonstrada quando os animais, durante a exploração ao LCE, demonstram comportamentos

característicos de medo, tais como congelamento e avaliação de risco (RODGERS et al, 1997), exibindo preferência em explorar as áreas delimitadas pelos braços fechados (PELLOW et al, 1985).

Do ponto de vista fisiológico, a validação dá-se pelo aumento dos níveis plasmáticos circulantes de corticosterona em animais confinados nos braços abertos em comparação aos animais confinados nos braços fechados. (PELLOW et al, 1985), bem como aumento da glicemia (GHIZONI et al, 2006).

A validação farmacológica é resultado de estudos farmacológicos que demonstram o aumento da exploração dos braços abertos quando são administradas drogas ansiolíticas, representada pelas variáveis aumento do número de entrada nos braços abertos e aumento no tempo de exploração dos braços abertos, sendo que drogas ansiogênicas reduzem estas variáveis (PELLOW et al, 1985).

O LCE é um modelo bastante difundido por seu baixo custo e facilidade de execução experimental; é rápido, simples e de baixo custo, além disso, não oferece estímulos aversivos ao animal, não ocorrendo choques elétricos ou privação de água/alimento e sim estímulos incondicionados de medo como novidade e espaços abertos. (PELLOW et al, 1985; RODGERS et al, 1997).

Drogas ansiolíticas aumentam a exploração dos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas diminuem a exploração neste tipo de braço (PELLOW et al, 1985), entretanto, mudanças qualitativas no estado emocional geradas pela exposição ao LCE podem alterar a eficácia de algumas drogas ansiolíticas. Um exemplo já descrito é o fenômeno denominado "one trial tolerance", onde os benzodiazepínicos são inefetivos em ratos e camundongos com experiência prévia ao LCE (LISTER, 1987; FILE, 1990). A ausência do efeito ansiolítico ocorreria devido à alteração da natureza da ansiedade gerada após a primeira exposição, ocorrendo na segunda exposição a expressão de um medo específico ou uma fobia adquirida, insensível aos benzodiazepínicos. (FILE & ZANGROSSI, 1993).

O paradigma do labirinto em cruz elevado tem sido um modelo animal bastante utilizado desde seu estabelecimento na década de 80, entretanto, algumas incorporações foram adicionadas ao modelo no decorrer destas duas décadas, como a análise minuto a minuto das variáveis comportamentais analisadas em camundongos (RODGERS et al, 1996) e em ratos (ROSA et al, 2000) e a incorporação de uma segunda exposição (paradigma 1<sup>a</sup>/2<sup>a</sup> exposição).

Tanto a análise minuto a minuto quanto o paradigma E1/E2 tornaram-se ferramentas importantes para a avaliação do aprendizado emocional no LCE.

A análise “minuto a minuto” das variáveis comportamentais e etológicas nos possibilita a obtenção de informações a cerca do padrão comportamental de animais expostos ao LCE no decorrer de uma mesma exposição. Tem sido demonstrado que o padrão comportamental dos animais expostos ao LCE altera-se no decorrer da sessão em camundongos (HOLMES & RODGERS, 1998) e em ratos (ROSA, 2000); (PEREIRA et al, 2005), com a diminuição da exploração dos braços abertos no decorrer do tempo de exposição.

Portanto, os dados da literatura indicam ocorrência de padrões comportamentais distintos entre o início e o término da exposição ao LCE, o que é indicativo da ocorrência de alteração comportamental induzida pela experiência prévia, ou seja, aprendizagem.

Dados da literatura relatam o aumento da esquia dos braços abertos quando da re-exposição do animal ao LCE (paradigma E1/E2) (TREIT et al, 1993), provavelmente devido ao aprendizado prévio, ocorrido na primeira exposição. A existência de dois ambientes conflitantes (aberto/fechado), possivelmente seja o principal elemento desencadeante da aquisição de esquia dos braços abertos no LCE. (PEREIRA et al, 2005; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000). O paradigma Exposição1/ Exposição 2, no LCE, baseia-se em expor o animal duas vezes ao LCE, possibilitando a avaliação da experiência prévia sobre o comportamento futuro. Sendo assim, o LCE também serve como objeto de estudo da emocionalidade relacionada com aprendizado e memória (CAROBREZ et al., 2001).

Desta forma, dados prévios da literatura relatam que não só o comportamento de aquisição de esquia dos braços abertos em um dado minuto da primeira exposição é influenciado pelo minuto anterior, mas também que o comportamento de esquia na segunda exposição é determinado pela experiência anterior ao LCE.

A experiência emocional é capaz de promover a ativação da amígdala (RICHTER-LEVIN & AKIRAV, 2003); a ativação da amígdala sinaliza para outras estruturas encefálicas, promovendo a indicação que existe a ocorrência de uma experiência emocional, devendo esta ser armazenada e consolidada (MCGAUGH et al, 2002; RICHTER-LEVIN E AKIRAV, 2003).

Desta forma, a participação de hormônios associados ao estresse, liberados durante uma experiência emocional, é capaz de promover a ativação da amígdala basolateral, resultando em facilitação da memória (MCGAUGH, 2000) e conseqüente aprendizado emocional. Além disso, a exposição de ratos ao LCE induz hiperglicemia nos animais (GHIZONI et al, 2006). Assim é possível que a elevação glicêmica possa modular a aprendizagem emocional no LCE.

## **1. OBJETIVOS:**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Avaliar o processo de aquisição de esquiva dos braços abertos em ratos submetidos ao paradigma E1/E2 no labirinto em cruz elevado (LCE) sob privação central de glicose ou submetidos à vagotomia.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

2.2.1 Avaliar o processo de aquisição de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 no LCE em ratos submetidos à injeção intracerebroventricular de 2-Desoxi -D-glicose (2-DG), previamente a 1ª exposição.

2.2.2 Avaliar o processo de aquisição de esquiva dos braços abertos no paradigma E1/E2 no LCE em ratos submetidos à injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) previamente à 1ª exposição.

2.2.3 Avaliar o processo de aquisição de esquiva no paradigma E1/E2 no LCE em ratos submetidos previamente a vagotomia bilateral subdiafragmática.

### **3. Materiais e Métodos:**

#### **3.1 Animais:**

Foram utilizados ratos wistar machos com aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 250-350g, totalizando 68 animais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e transportados até o laboratório de neurobiologia do departamento de ciências fisiológicas da referida universidade. Os animais foram separados em grupos de 5 animais por caixa de polipropileno (49 X34 X 16 cm), forradas com serragem com livre acesso a água e ração padrão. A temperatura foi mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com um ciclo claro/escuro de 12 horas (6h-18h). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas (a cada 48 horas), pesagem e administração de drogas. Os experimentos foram realizados no período vespertino (13h – 17h) com o observador fora da sala de experimentação.

O protocolo experimental estabelecido foi aprovado pelo Comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

#### **3.2 Drogas:**

As drogas utilizadas para experimentação (2-DG e STZ) foram dissolvidas em solução salina (0,9%), nas seguintes concentrações: 2-DG ( $10\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ ); ( $20\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ ); STZ ( $1\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$  - 2.2 mg/kg); ( $2\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$  – 4.4 mg/kg).

Os anestésicos utilizados para a realização do procedimento cirúrgico foram ketamina e xilazina, nas doses de 0,16 mL/100 g e 0,06 mL/100g, respectivamente, sendo os animais anestesiados por via intraperitoneal (IP).

### 3.3 Canulação:

Os animais utilizados para a avaliação da neuroglicoprivação (n=53) através da utilização de análogos da glicose (2-DG e estreptozotocina) foram submetidos à cirurgia estereotáxica, visando atingir o ventrículo lateral, com coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1986).

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica foram anestesiados com solução de Ketamina (0,17mL/100g) e Xilazina (0,06mL/100g), via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico tendo a cabeça fixada por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo e presilha dental. Previamente à incisão no escalpo, procedeu-se a injeção subcutânea do anestésico local lidocaína (0,4 mL). Após a assepsia com solução de álcool iodado, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, de forma a expor a calota craniana. Esta porção exposta da calota craniana foi raspada e seca, visando a adesão da solução acrílica. Em seguida foi marcada a posição para perfuração e implantação da cânula guia, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (23G). Posteriormente, foi feito um orifício de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro, com auxílio de uma broca esférica de uso odontológico. A seguir procedeu-se a implantação da cânula- guia de 13mm de comprimento nas seguintes coordenadas: 0,8 mm posterior ao bregma, 1,5 mm lateral ao bregma e 3mm de profundidade (PAXINOS E WATSON, 1986).

Decorrido um período de recuperação pós-cirúrgico de sete dias, após a canulação ICV, o animal foi levado à experimentação, através da administração via ICV das drogas citadas no item 3.2, com auxílio de uma micro seringa Hamilton de 10 $\mu$ L, acoplada a uma agulha injetora de 14mm de comprimento introduzida na cânula guia. O fluxo de injeção foi de aproximadamente 2 a 3  $\mu$ L/min.

Logo após o termino da aplicação da droga, o animal foi imediatamente levado ao labirinto em cruz elevado (LCE).

### 3.4 Vagotomia:

Para a realização da vagotomia, os animais (n=15), foram anestesiados com Ketamina (0,17mL/100g) e Xilazina (0,06mL/100g), via Intraperitoneal (IP), sendo posteriormente colocados em decúbito dorsal, sobre uma prancha cirúrgica. Posteriormente procedeu-se a retirada dos pêlos do animal, digitalmente, realizando-se a anti-sepsia do campo cirúrgico com a utilização de PVPI (polivinil pirrolidona-iodo). Foi feita, então, uma diérese de aproximadamente 4 cm na linha mediana do abdome, seccionando o couro e a linha alba do animal, visando atingir a cavidade abdominal. Após a identificação dos nervos vago, estes foram seccionados, mantendo-se um afastamento de 01 cm entre o coto proximal e distal.

Posteriormente foi feita a sutura da incisão, primeiramente no plano muscular – que é realizada por pontos contínuos simples utilizando-se fio Prolene 5.0 – e, em seguida, no plano do couro – com a realização de pontos descontínuos com fio de algodão 0.0.

Os animais submetidos à vagotomia, após um período de recuperação pós-cirúrgico de 28 dias, foram submetidos ao LCE, como descrito no item 3.6.2. O período de 28 dias visa confirmar o sucesso da vagotomia, através do acompanhamento do ganho de peso dos animais no período pós-cirúrgico (LEONHARDT et al, 2004).



### 3.5 Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

O LCE é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando assim uma cruz simétrica (quatro braços de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura). Dois braços opostos são fechados por laterais de 40 cm de altura (vidro fumê), enquanto os braços restantes são abertos e circundados apenas por uma borda de 1cm de acrílico transparente. Na junção entre os braços delimita-se uma área central de 10 x 10cm<sup>2</sup>. O labirinto como um todo é elevado 50cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto foram utilizadas como única fonte de iluminação do experimento, apresentando os seguintes índices de luminosidade: braços abertos = 336 lux, braços fechados= 240 lux, quadrado central= 382 lux.

As sessões experimentais foram gravadas com o auxílio de webcam, sendo as variáveis posteriormente transcritas com o auxílio do Programa Etholog 2.25<sup>®</sup>. (OTTONI, 2000)

As variáveis comportamentais analisadas foram espaciais/temporais (SETEM et al, 1999). As variáveis espaciais/temporais são representadas pela porcentagem de entradas nos braços abertos (% EA), porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (% TA), número de entradas nos braços fechados (EF) e número de entradas nos braços abertos (EA) (PELLOW ET AL, 1985). O critério de definição de entrada e saída de braço foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora de um braço, respectivamente.

A análise das variáveis espaciais/ temporais foi realizada, considerando-se o tempo total da sessão (5 min.). As sessões foram realizadas com intervalo de 24h entre a primeira e a segunda exposição e teve início com a cuidadosa colocação do animal no centro do labirinto, voltado para um dos braços fechados, para livre exploração. Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após cada animal exposto ao LCE, este foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool 20%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo.

### **3.6 Procedimentos**

#### **3.6.1 Procedimento 1: (Administração ICV das drogas em estudo)**

Decorrido um período de sete dias após a implantação da cânula, visando a recuperação cirúrgica do animal, estes foram submetido à administração ICV de 2-DG ou STZ, sendo subdivididos nos seguintes grupos: sal. 0,9% (n=15); 2-DG 10 (n=9); 2-DG 20 (n=8); STZ 2.2 (n=8) e STZ 4.4 (n=13) a fim de receberem as drogas em estudo, previamente a E1, com um fluxo de aproximadamente 3 mL/min, sendo imediatamente após expostos ao LCE. O tempo de exposição dos animais ao LCE foi de cinco minutos, sendo estes colocados cuidadosamente no quadrado central do labirinto, com a face voltada para um dos braços fechados para livre exploração. Após decorrido este período os animais foram retirados do LCE e levados a sua caixa de origem, junto ao biotério do laboratório de neurobiologia. Decorrido um período de 24h após a primeira exposição, os animais foram levados novamente ao LCE (re-expostos), sem a administração de drogas.

Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após cada animal ser exposto ao LCE, este foi limpo com tecido umedecido em álcool 20%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo do experimento.

#### **3.6.2 Procedimento 2: (Vagotomia bilateral):**

Os animais submetidos à vagotomia, conforme descrito no item 3.4, após um período de recuperação pós-cirúrgico de 28 dias, foram submetidos ao LCE, levados a explorar o labirinto por um período de 5 minutos, sendo logo após retirados do LCE e colocados em sua caixa de origem, junto ao biotério do laboratório de neurobiologia. Decorrido um intervalo de 24h após a primeira exposição, o animais foram levados novamente ao LCE (re-expostos), sendo as variáveis comportamentais anteriormente citadas, novamente analisadas.

Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após cada animal ser exposto ao LCE, este foi limpo com tecido umedecido em álcool 20%. A eventual queda de um

animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo do experimento

### **3.7. Coleta, transcrição e organização dos dados:**

As variáveis dependentes analisadas foram representadas pela porcentagem de entrada dos braços (%EA), porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA), número de entrada nos braços abertos (EA) e número de entrada nos braços fechados (EF). O critério de definição de entrada e saída de cada braço foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora de um braço, respectivamente. A variável % EA foi calculada através da fórmula  $(EA / (EA + EF)) \times 100$ . A variável %TA foi calculada através da fórmula  $(Ta / Tt) \times 100$ , sendo TA o tempo de permanência nos braços abertos e Tt o tempo total da sessão (5 minutos).

Nos experimentos 1 e 2, visando avaliar a aquisição de esquiava dos braços abertos, as variáveis independentes relacionadas para análise foram: “exposição” (primeira e segunda exposição ao LCE) e “droga” (tratamento com 2-DG ou STZ).

As sessões experimentais foram gravadas com o auxílio de webcam, sendo as variáveis dependentes posteriormente analisadas com o auxílio do software Etholog 2.25 (OTTONI, 2000).

### **3.8. Análise Estatística:**

Os dados foram analisados por análise de variância de duas vias – ANOVA - (Fator 1: tratamento com droga ou vagotomia e fator 2: Exposição ao LCE), seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações. Apenas valores de probabilidade menores que 5% foram considerados significantes.

## 4. RESULTADOS:

**Tabela 1.**

Resultados do teste ANOVA de duas vias após análise dos animais expostos por 5 minutos ao LCE indicando os efeitos principais e interações entre os grupos tratados com sal. 0,9%; 2-DG 10; 2-DG 20; 2-DG 40; STZ 2.2 e STZ 4.4

Variável	Droga	Exposição	Droga X Exposição
% Entrada Aberto	$F_{4,96} = 6,18; p < 0,05$	$F_{1,96} = 55,94; p < 0,05$	$F_{4,96} = 2,25; NS$
% Tempo Aberto	$F_{4,96} = 8,02; p < 0,05$	$F_{1,96} = 35,72; p < 0,05$	$F_{4,96} = 3,14; p < 0,05$
Entrada Aberto	$F_{4,96} = 10,95; p < 0,05$	$F_{1,96} = 49,88; p < 0,05$	$F_{1,96} = 5,76; p < 0,05$
Total entradas fechado	$F_{4,96} = 2,27; NS$	$F_{1,96} = 8,37; p < 0,05$	$F_{4,96} = 1,40; NS$

Os ratos foram submetidos ao paradigma do labirinto em cruz elevado, com 24h de intervalo entre a primeira e a segunda exposição.

De acordo com a tabela 1, o teste ANOVA, seguido de Duncan, revela efeito significativo no fator Droga, com relação a variável %EA ( $p < 0,05$ ) no grupo controle (sal. 0,9%) quando comparado ao grupo 2-DG 10 na 1ª exposição ao LCE.

O teste de Duncan também revelou efeito significativo no fator exposição, nos grupos controle (sal. 0,9%), 2-DG 10, 2-DG 20 e STZ 2.2, quando comparada a 2ª com a 1ª exposição ao LCE. (Figura 5A)

Não foi observado efeito significativo no fator Droga X Exposição, quando considerada a variável %EA.

Com relação à %TA, o teste de Duncan revelou significância entre os fatores Droga ( $p < 0,05$ ), quando comparado o grupo controle (sal. 0,9%) e 2-DG 10 na 1ª exposição ao LCE; Exposição ( $p < 0,05$ ), quando comparada a 2ª com a 1ª exposição no grupo 2-DG 10; e Droga X Exposição ( $p < 0,05$ ). (Figura 5B)

Já em relação à EA, foi verificada significância no fator Droga ( $p < 0,05$ ) no grupo 2-DG 10 quando comparado ao grupo controle (sal. 0,9%) na 1ª exposição; exposição ( $p < 0,05$ ) quando comparada a 2ª com a 1ª exposição nos grupos controle (sal 0,9%), 2DG-10 e STZ 2.2. e droga X Exposição ( $p < 0,05$ ). (Figura 6A)

Com relação a variável EF, Duncan verificou significância apenas no fator exposição ( $p < 0,05$ ), no grupo STZ 2.2; não foi verificada significância estatística no fator Droga e Droga X Exposição. (Figura 6B).

## Tabela 2

Resultados do teste ANOVA de duas vias após análise de animais expostos por cinco minutos ao LCE indicando as principais interações entre os grupos vagotomizados e sham operados.

Variável	Grupo	Exposição	Grupo X Exposição
% Entrada Aberto	$F_{1,26} = 0,74; NS$	$F_{1,26} = 13,80; p < 0,05$	$F_{1,26} = 5,99; p < 0,05$
% Tempo Aberto	$F_{1,26} = 0,25; NS$	$F_{1,26} = 10,30; p < 0,05$	$F_{1,26} = 1,98; NS$
Entrada Aberto	$F_{1,26} = 1,30; NS$	$F_{1,26} = 11,20; p < 0,05$	$F_{1,26} = 5,21; p < 0,05$
Total entradas fechado	$F_{1,26} = 0,004; NS$	$F_{1,26} = 0,23; NS$	$F_{1,26} = 0,004; NS$

Os ratos foram submetidos ao paradigma do labirinto em cruz elevado, com 24h de intervalo entre a primeira e a segunda exposição.

De acordo com a tabela 2, o teste Duncan revela significância no fator Exposição ( $p < 0,05$ ) quando comparada a 2ª com a 1ª exposição no grupo sham-operado, quando se considera a variável %EA. (Figura 7A)

Duncan também revelou significância ( $p < 0,05$ ) no fator Droga X Exposição ( $p < 0,05$ ), considerando-se a variável %EA.

Não foi evidenciada significância estatística no fator Grupo, quando considerada a variável %EA.

Com relação a variável %TA, verificou-se significância estatística, de acordo com Duncan, no fator Exposição ( $p < 0,05$ ), quando comparada a 2ª com a 1ª exposição nos animais sham-operados. (gráfico 7B)

Não houve significância estatística nos fatores Grupo e Grupo X Exposição, quando considerada a variável %TA.

A variável EA revela significância, quando considerado o fator Exposição ( $p < 0,05$ ) no grupo sham-operado. (Figura 8A).

Também se observou significância no fator Grupo X Exposição ( $p < 0,05$ ).

Não foi observada significância estatística no fator Grupo.

Com relação a variável EF, não se observou significância tanto no fator Grupo, Exposição, como no fator Grupo X Exposição. (Figura 8B).

### Tabela 3:

Resultados do teste ANOVA de duas vias após análise de animais expostos por cinco minutos ao LCE indicando as principais interações entre os grupos vagotomizados e sham operados com relação ao peso corporal pelo período de 4 semanas após cirurgia.

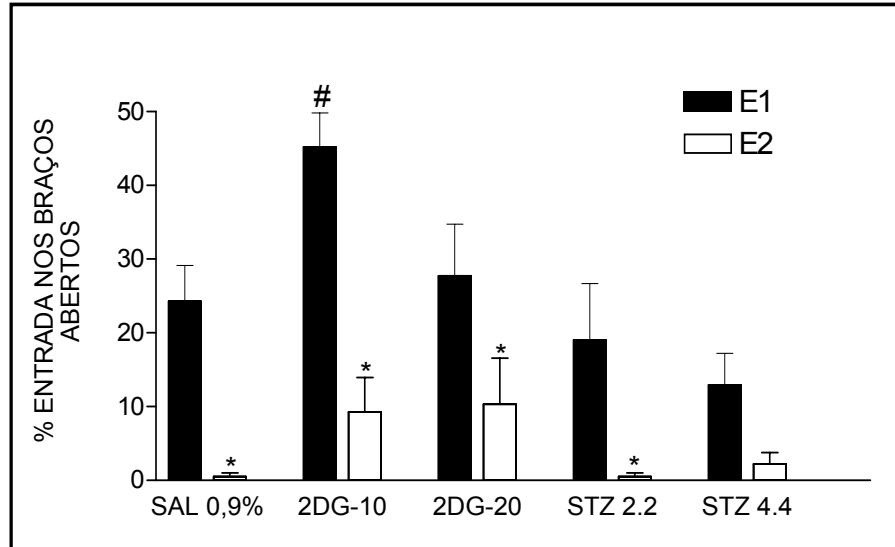
Variável	Grupo	Tempo	Grupo X Tempo
Peso corporal	$F_{1,52} = 14,31; p < 0,05$	$F_{3,52} = 24,71 p < 0,05$	$F_{3,52} = 0,5781; NS$

Os ratos foram submetidos ao paradigma do labirinto em cruz elevado, com 24h de intervalo entre a primeira e a segunda exposição.

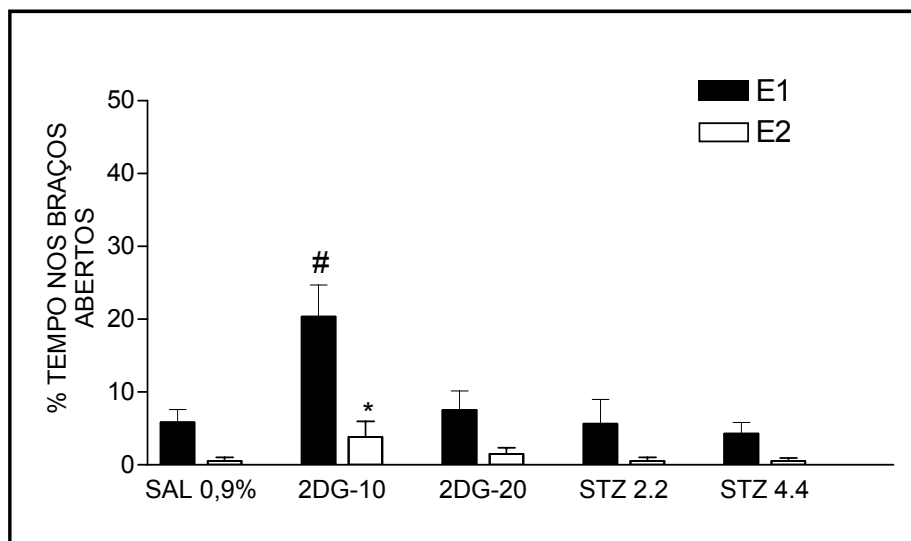
De acordo com a tabela 3, o teste ANOVA seguido de Duncan, revela efeito significativo nos fatores Grupo entre animais sham-operados e vagotomizados e Tempo (tempo decorrido após cirurgia), mas não entre Grupo X Tempo. (Figura 9).

Figura 5:

A



B



**Figura 5.A.** Porcentagem de entrada nos braços abertos em ratos submetidos à injeção ICV de 2-DG e STZ. A 2ª exposição (E2) foi realizada 24h após a 1ª (E1). **B.** Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em ratos submetidos à injeção ICV de 2-DG e STZ. A 2ª exposição (E2) foi realizada 24h após a 1ª (E1). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  em relação a E1. #  $p < 0,05$  em relação ao controle (sal 0,9%). (ANOVA seguido do teste Duncan para múltiplas comparações).

Na figura 5.A, verificou-se a diminuição na porcentagem de entrada dos braços abertos nos grupos controle (sal 0,9%); 2DG-10; 2DG-20 e STZ 2.2, na segunda exposição (E2), em relação à primeira (E1), não observando-se a diminuição na porcentagem de entrada dos braços abertos no grupo STZ 4.4.

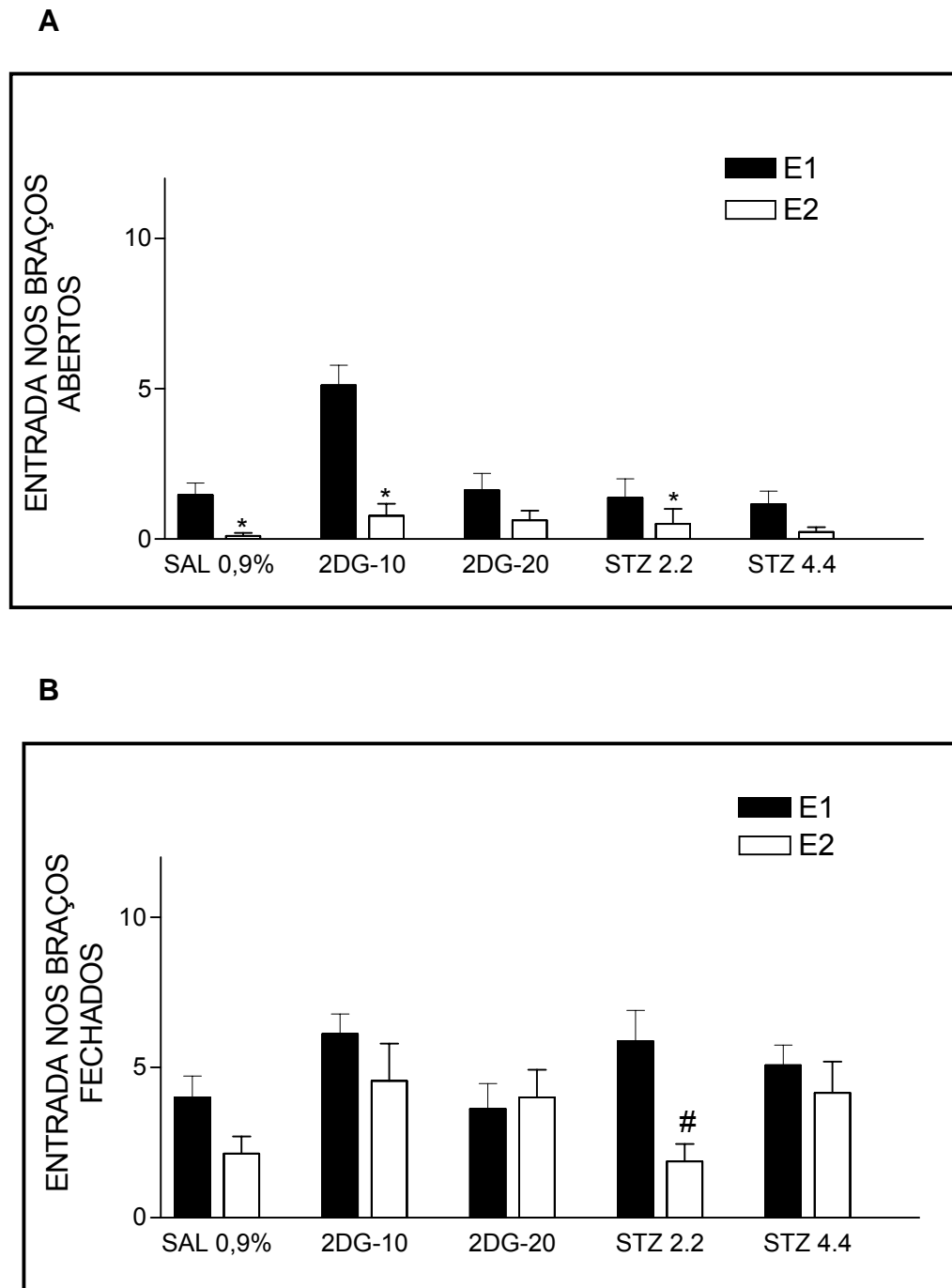
A diminuição da %EA no grupo controle (sal 0,9%); 2DG-10; 2DG-20 e STZ 2.2, sugere a ocorrência de aprendizado emocional. A não ocorrência de significância estatística entre E1/E2 no grupo STZ 4.4, sugere a não ocorrência de aprendizado de cunho emocional.

Também foi observado aumento na %EA nos braços abertos no grupo 2-DG 10, em relação ao grupo controle na primeira exposição (E1), o que é indicativo de ação ansiolítica da referida droga, na dose de 10 $\mu$ mol/10 $\mu$ L.

Na fig. 5.B, observou-se a diminuição na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos no grupo 2DG-10, comparando-se a E2 em relação a E1, sugerindo aprendizado emocional; entretanto observou-se também, como citado anteriormente, aumento na %EA nos braços abertos no grupo 2DG-10 em relação ao grupo controle na primeira exposição (E1), sugerindo ação ansiolítica desta droga, na dose de 10 $\mu$ mol/10 $\mu$ L.



Figura 6:



**Figura 6. A.** Número total de entrada nos braços abertos em ratos submetidos à injeção ICV de 2-DG e STZ. A 2ª exposição (E2) foi realizada 24h após a 1ª (E1). **B.** N° entrada nos braços fechados. A 2ª exposição (E2) foi realizada 24h após a 1ª (E1). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média. #  $p < 0,05$  em relação a E1. (ANOVA seguido do teste Duncan para múltiplas comparações).

Na figura 6A, observou-se a diminuição no número de entrada nos braços abertos (EA), nos animais pertencentes aos grupos controle (sal. 0,9%); 2DG-10 e STZ 2.2, quando analisado E2 em relação a E1.

Esta diminuição no número total de entradas nos braços abertos (EA) nos grupos citados, quando analisado o paradigma E1/E2, sugere a ocorrência de aprendizado emocional.

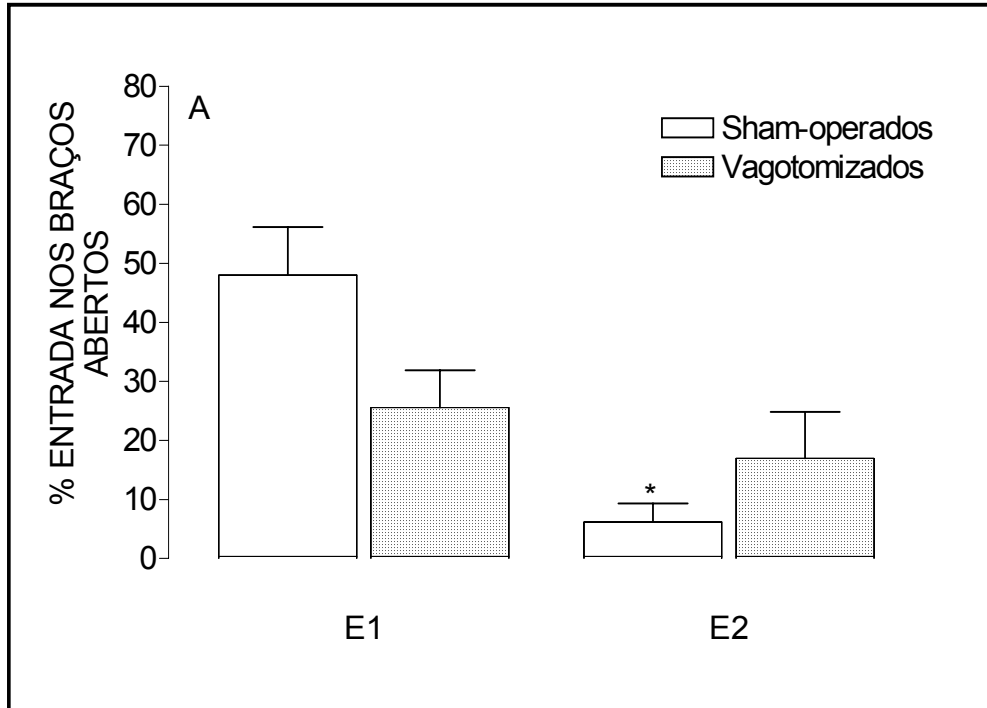
Não foi verificada a diminuição no número total de entradas nos braços abertos (EA) nos demais grupos, sugerindo a não ocorrência de aprendizado.

A figura 6.B, demonstra que não houve alteração no número de entradas nos braços fechados de qualquer grupo em relação ao grupo controle (sal 0,9%), o que indica não haver alteração locomotora nos animais submetidos ao LCE no paradigma E1/E2.

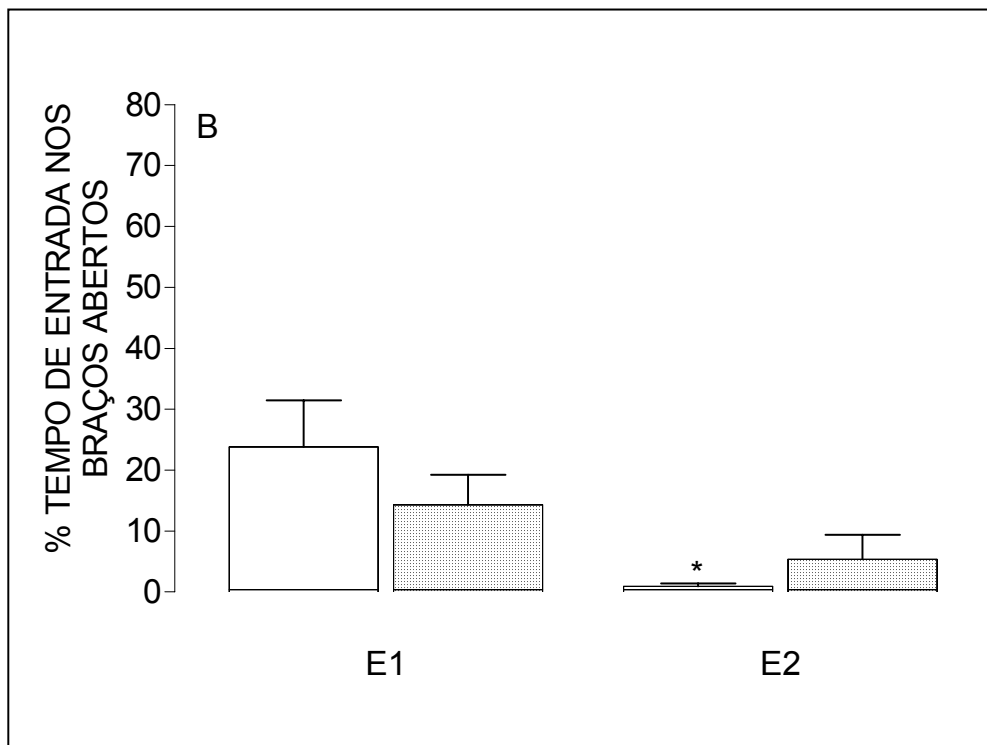
Foi observada diminuição no número de entradas nos braços fechados entre E1/E2 no grupo STZ 2.2.

Figura 7:

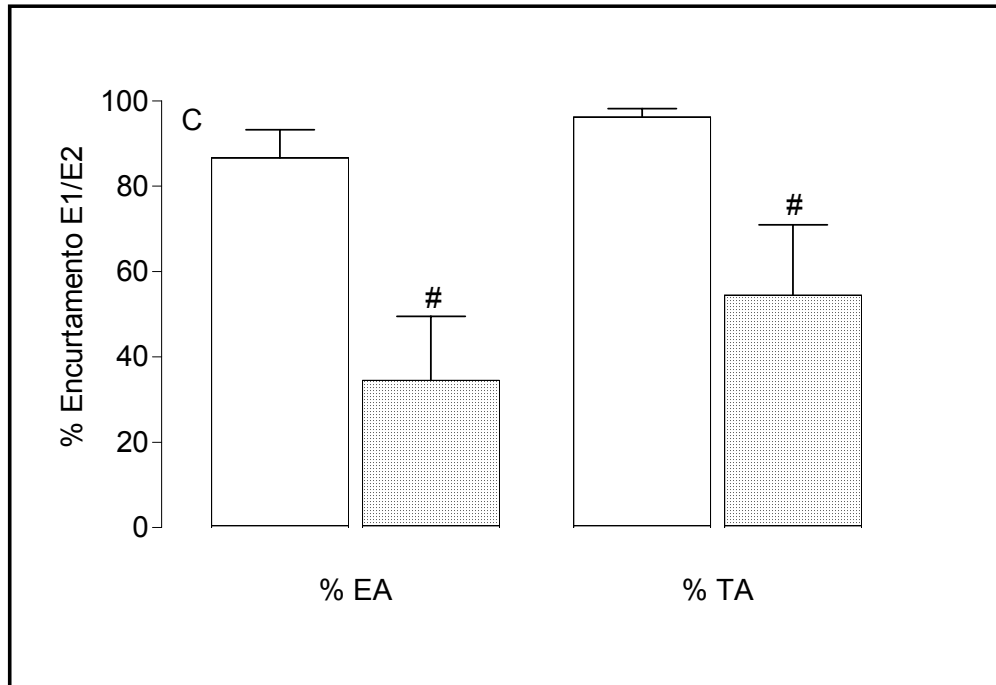
A



B



C



**Figura 7. A.** Porcentagem de entrada nos braços abertos de ratos sham-operados e submetidos à vagotomia bilateral no paradigma E1/E2 no LCE. **B.** Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos sham-operados e submetidos à vagotomia bilateral no paradigma E1/E2 no LCE. **C.** Porcentagem de encurtamento ( $\Delta$  shortening) - porcentagem de encurtamento - valor dado através da seguinte fórmula:  $\%E1/\%E2$  na  $\%EA = \%EA (E1) - \%EA (E2) \times 100\% / \%EA (E1)$ ; de maneira semelhante foi calculado o  $\Delta$  shortening relacionado a  $\%TA$ . O gráfico representa a  $\%$  encurtamento E1/E2 com relação a  $\%$  entrada nos braços abertos e  $\%$  tempo nos braços abertos no paradigma E1/E2, demonstrado na forma de coluna. Os animais foram submetidos ao LCE quatro semanas após cirurgia. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  relativo a E1. #  $p < 0,05$  relativo ao grupo sham-operado. ANOVA seguido do teste Duncan para múltiplas comparações)

Na figura 7.A, verificou-se alteração na %EA dos animais sham-operados, quando comparada a E2 em relação a E1, o que sugere a ocorrência de aprendizado emocional, nos animais onde não foi realizada vagotomia subdiafragmática bilateral.

Não foi observada diminuição na %EA nos animais vagotomizados no paradigma E1/E2, sugerindo a participação do nervo vago em processos de aprendizagem emocional.

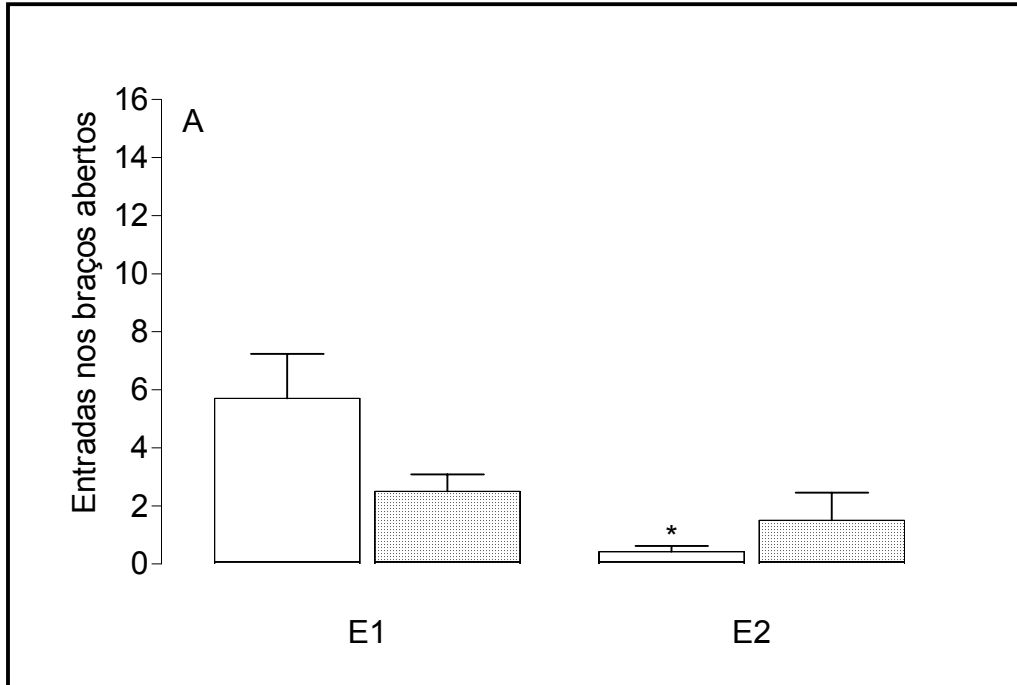
Na figura 7.B, observou-se diminuição na %TA dos animais sham-operados submetidos ao paradigma E1/E2, sugerindo a ocorrência de aprendizado dos animais pertencentes a este grupo.

Não foi observada alteração na %TA dos animais vagotomizados quando comparada E2 em relação a E1, não ocorrendo aprendizado destes animais.

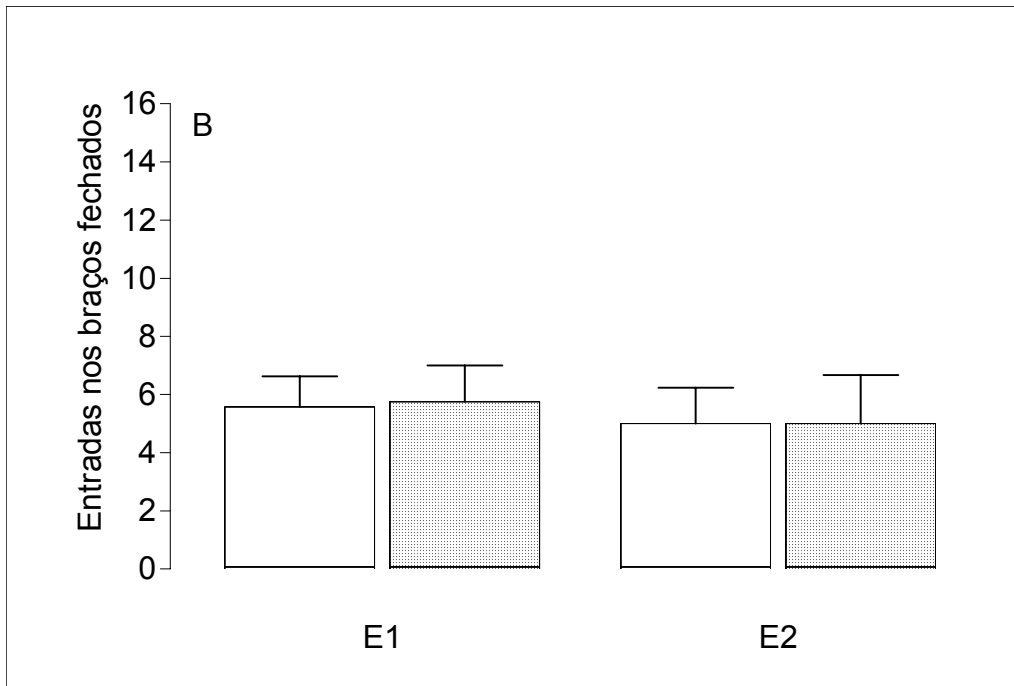
A figura 7.C, demonstra a diminuição da % encurtamento dos animais vagotomizados em relação aos animais sham-operados, quando analisadas as variáveis %EA e %TA, o que sugere prejuízo em processos de aprendizagem emocional nos animais vagotomizados.

Figura 8:

A



B



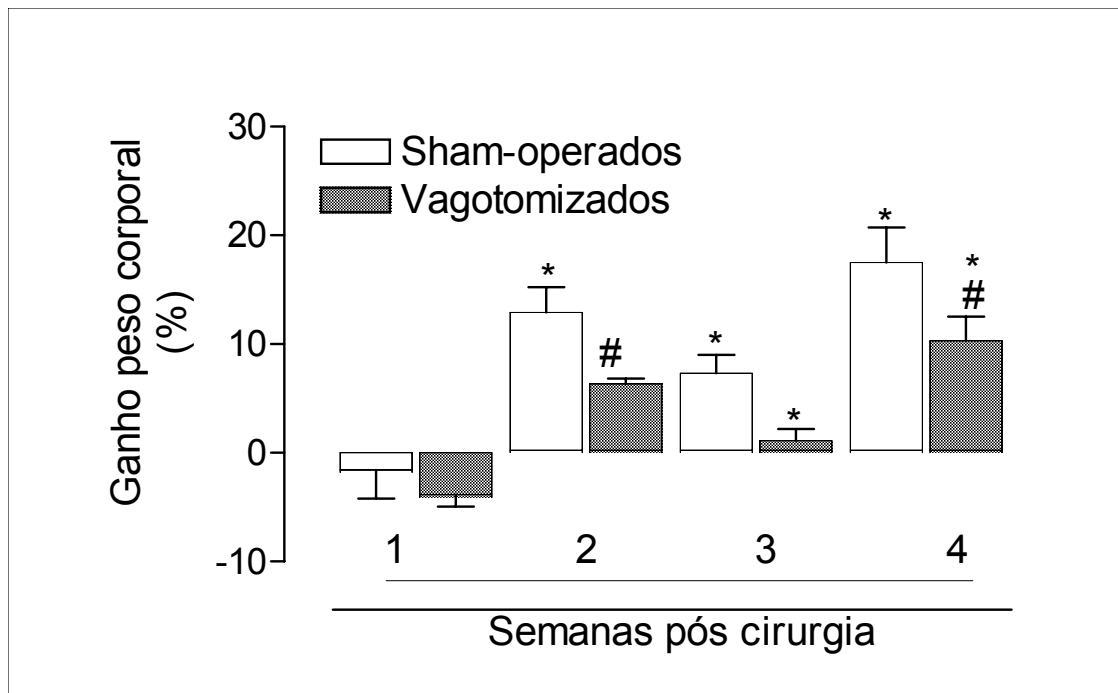
**Figura 8. A.** Número de entrada nos braços abertos em ratos submetidos à vagotomia. Os animais foram vagotomizados ou sham-operados e quatro semanas após foram submetidos ao paradigma E1/E2. **B.** Número de entrada nos braços fechados em ratos submetidos à vagotomia. Os animais foram vagotomizados ou sham-operados e quatro semanas após foram submetidos ao paradigma E1/E2. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  relativo a E1 (ANOVA seguido do teste de Duncan para múltiplas comparações).

A figura 8.A demonstra a diminuição da EA dos animais sham-operados, no paradigma E1/E2, sugerindo a participação do nervo vago em processos associados a aprendizagem.

Não foi verificada alteração na EA dos animais vagotomizados, o que indica a não ocorrência de aprendizado emocional.

A figura 8.B, demonstra não haver alterações na EF de ambos os grupos, tanto na análise E1/E2, quanto entre grupos, o que sugere a não ocorrência de prejuízo de ordem locomotora aos animais submetidos a ambos os tratamentos.

Figura 9:



**Figura 9.** Decréscimo de ganho de peso de corporal em animais submetidos a vagotomia. Os animais foram vagotomizados ou sham-operados e o ganho de peso corporal foi avaliado ao longo de um período de 4 semanas. Cada coluna representa a média da porcentagem de ganho de peso  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  relativo a primeira semana. #  $p < 0,05$  relativo ao grupo sham-operado. (ANOVA seguido do teste de Duncan para múltiplas comparações).

A figura 9 demonstra a alteração no ganho de peso corporal (%) em animais sham-operados e vagotomizados, acompanhados por um período de 4 semanas pós-cirúrgico, quando comparados a primeira semana pós cirurgia.

A figura também demonstra alterações significativas quando efetua-se a comparação entre animais dos dois grupos (sham-operados e vagotomizados), dentro as mesma semana pós cirurgia.

Verifica-se a alteração na % ganho de peso corporal entre animais sham operados na segunda, terceira e quarta semana pós cirurgia, quando comparados ao mesmo grupo na primeira semana pós cirurgia.

Observou-se alterações entre os grupos sham-operados e vagotomizados na segunda, terceira e quarta semana pós cirurgia.



## 5. Discussão:

O labirinto em cruz elevado é um modelo animal, largamente utilizado no estudo da ansiedade (HANDLEY & MITHANI, 1984). Atualmente o LCE vem sendo utilizado com o intuito de estudar-se questões referentes à aprendizagem e memória, utilizando-se a aquisição de esquia dos braços abertos, como ferramenta de avaliação de aquisição de memória emocional. (GHIZONI et al, 2006).

A exposição do animal ao paradigma E1/E2, constitui-se em ferramenta importante para a avaliação de memória emocional adquirida na ocorrência da primeira exposição e evocada na exposição subsequente, pois a aprendizagem no LCE envolve memória espacial e emocional em roedores. A memória espacial relaciona-se com a identificação dos ambientes distintos que compõem o labirinto (braços abertos e fechados), enquanto a memória emocional relaciona-se com a identificação de áreas potencialmente perigosas no labirinto, mais especificamente os braços abertos geradores de medo no animal (DAL-CÓL et al, 2003).

Esta memória emocional é avaliada através da interpretação das variáveis comportamentais anteriormente citadas (%EA, %TA e EA) as quais correlacionam-se inversamente com o nível de ansiedade. Esta ansiedade participa da formação da memória de cunho emocional (MATHEWS, 1990).

A ansiedade caracteriza-se por possuir componentes anteriormente apreendidos e posteriormente evocados, quando ocorre a re-exposição a estes fatores, logo, a compreensão dos processos envolvidos na aquisição de memória é de fundamental importância para a compreensão do mecanismo gerador da ansiedade (MATHEWS 1990).

Sendo assim, o processo de aquisição de esquia evidencia-se quando na segunda exposição ocorre uma diminuição das variáveis comportamentais citadas (TREIT et al, 1993).

Desta forma, a utilização do referido modelo (LCE), vem cada vez mais sendo citada em trabalhos específicos de aprendizagem e memória, uma vez que constitui-se em um modelo onde não são gerados estímulos aversivos ao animal. (DAWSON & TRICLEBANK, 1995).

A glicose, principal fonte energética para o SNC (PARDRIDGE, 1983), participa ativamente da modulação de processos relacionados ao aprendizado e memória (MESSIER, 2004); sendo assim, a ocorrência de glicoprivação ao nível central sugere alterações na aquisição de esquiva dos braços abertos, quando utiliza-se como modelo emocional o LCE (aprendizado emocional).

A concentração glicêmica no meio extracelular diferencia-se em aproximadamente 20-30% da concentração glicêmica sanguínea (MESSIER, 2004), esta relação assimétrica entre a concentração de glicose do meio sanguíneo e dentro do cérebro é de fundamental importância para a distribuição dos transportadores de glicose do tipo 1 (GLUT 1), pois a diferença de concentração entre o lado vascular das células endoteliais da barreira hematoencefálica e o lado cerebral destas células resulta em um gradiente que facilita a entrada de glicose para o cérebro. (MESSIER, 2004).

Experimentos descritos na literatura, realizados com animais expostos ao LCE, demonstram um aumento na captação de glicose hipocampal em torno de 20-30%, quando comparada com os níveis sanguíneos, logo, a glicose participa ativamente de processos cognitivos relacionados ao aprendizado e memória (MCNAY & GOLD, 2002).

No experimento onde se realizou a injeção de ICV de 2-DG com o objetivo de promover-se privação de glicose em nível central, verificou-se a aquisição de esquiva dos animais controle (sal 0,9%) e 2-DG 10  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{L}$ , quando considerada a variável % EA. Além disso, também verificou-se efeito do tipo ansiolítico na primeira exposição dos animais que receberam injeção ICV de 2-DG 10  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{L}$ .

Dados da literatura relatam a aquisição de esquiva dos braços abertos em animais tratados com sol. sal 0,9% (animais controle) (PELLOW et al, 1985; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; PEREIRA et al, 2005). Sendo assim, nossos dados corroboram dados prévios da literatura evidenciando a aquisição de esquiva dos braços abertos no LCE em animais que foram submetidos a tratamento com solução sal. 0,9%.

No mesmo experimento, a análise da variável % TA dos animais expostos ao LCE, demonstra a aquisição de esquiva dos braços abertos na dose de 2-DG 10  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ , entretanto não há redução estatisticamente significativa na %TA nos animais expostos ao LCE na dose de 2-DG 20 $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ , logo, novamente sugere-

se a prejuízo na aquisição de esquia dos braços abertos na dose de 2-DG 20  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ , propondo a participação da glicose, nesta dose, em processos cognitivos associados ao aprendizado emocional.

Dados prévios da literatura revelam a ação central da glicose agindo de forma a facilitar a memória de maneira dose-dependente (WHITE, 1991; KOPF & BARATTI, 1996; RODRIGUEZ et al, 1994; MESSIER & DESTRADE, 1988) em animais experimentais, desta forma, verifica-se que o aumento da dose do análogo glicêmico metabolicamente inativo 2-DG é capaz de promover prejuízo na aquisição de memória emocional, evidenciando a participação da glicose em processos cognitivos.

Como a glicose age de maneira dose dependente (MESSIER, 2004), o efeito promovido pela privação de glicose, destaca-se na dose de 20 $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ , não sendo este efeito observado na dose menor 10  $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ , sendo assim, nossos dados vão ao encontro dos descritos pela literatura.

A glicose também exerce participação em processos cognitivos, de acordo com evidencias descritas pela literatura, na forma de uma curva dose-efeito em forma de “U” invertido (GOLD, 1995; MCNAY & GOLD, 2002), logo doses menores não são capazes de propiciar os efeitos de aumento de memória esperados, bem como doses maiores; conseqüentemente existem doses ideais para a observação de efeitos relacionados com a facilitação da memória.

Quando administrada sistemicamente à roedores, a glicose geralmente aumenta o desempenho da memória na forma de uma curva dose resposta em U invertido (GOLD, 1995). Estudos em humanos idosos e com déficit cognitivo, onde foi usada a administração oral de glicose, tem mostrado resultados complementares com a glicose também apresentando uma curva dose resposta em forma de U invertido e melhorando a memória em uma série de testes (MCNAY & SHERWIN, 2004).

O efeito ansiolítico observado na E1, quando realizada a análise da % EA no LCE, no grupo 2-DG, repete-se quando realizada a análise da % TA neste grupo.

Não há evidências prévias na literatura da ocorrência de efeitos do tipo ansiolítico na E1 quando da utilização de glicose ou análogos via ICV no teste do LCE.

Este efeito pode dar-se devido justamente a participação da glicose em processos cognitivos que suportam ao animal a compreensão do ambiente

aversivo em que se encontra; uma vez que este aporte de glicose não é fornecido de maneira suficiente, o animal tem seu processo cognitivo prejudicado, não sendo capaz de avaliar corretamente o ambiente, conseqüentemente não adquirindo esquivas dos braços abertos na 1ª exposição (efeito ansiolítico).

Entretanto este efeito do tipo ansiolítico não foi verificado na dose de 2-DG 20  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{L}$ .

Vale ressaltar que o animal possui a capacidade de processar estímulos e contextos físicos e compará-los com expectativas formadas a partir de informações armazenadas na memória. Estas experiências prévias são fundamentais para a detecção e avaliação de uma nova situação como potencialmente perigosa e orienta a escolha de uma estratégia comportamental a ser adotada para fugir ou evitar uma situação potencialmente perigosa e assim garantir a sobrevivência. (GRAEFF, 1990).

Estes dados corroboram dados anteriores descritos na literatura que demonstram a participação da glicose em eventos estressores como resposta do tipo fuga/luta, onde o animal encontra-se em um ambiente potencialmente ameaçador e faz-se necessário o aprendizado, para que o mesmo não se repita; além disso, a glicose não participa somente agindo em nível de SNC, mas também periféricamente modula este processo, informando ao SNC o estado geral do organismo, possivelmente através de aferências vagais (GHIZONI et al, 2006).

A glicose participa ativamente de processos relacionados a LTP (CHOEIRI, 2005), conseqüentemente possui grande importância no processamento destes estímulos.

A análise do número de entrada nos braços fechados, como variável relacionada a alteração de atividade locomotora (FILE, 1990), não encontra-se alterada nos grupos 2-DG 10; 2-DG 20 e sal 0,9% (controle), quando comparada primeira e segunda exposição, logo, não há evidência de prejuízo locomotor ao animal, conseqüentemente, a não ocorrência de exploração dos braços abertos, não deve-se a qualquer tipo de prejuízo de alteração de ordem motora.

O decréscimo dos níveis de glicose hipocampal, tem sido associado com a aquisição de memória, em testes em que os animais são espontaneamente levados a explorar o LCE (MCNAY & GOLD, 2002).

Vale ressaltar que a ligação da glicose aos seus transportadores, independe de sinalização insulínica, a qual poderia influenciar em determinadas áreas

cerebrais onde se localizam os transportadores de glicose do tipo GLUT 4 e GLUT 8 (regiões límbicas), sensíveis a este hormônio. Sendo assim, a glicoprivação promovida pelo análogo glicêmico 2-DG, dá-se de maneira inespecífica, promovendo a privação de glicose em todo o cérebro.

Também observou-se comportamento associado ao sono em alguns animais levados a explorar o LCE, bem como piloereção em alguns animais que sofreram a administração ICV do análogo glicêmico 2-DG, o que pode influenciar de maneira significativa na análise das variáveis associadas a exploração do LCE.

A administração de 2-DG, por via IP ou via endovenosa, ocasiona hipotermia, já relatada pela literatura (SHIRIAISHI & MAGER, 1980; THOMPSON, et al, 1980).

A STZ, antagonista do receptor insulínico, liga-se a receptores tirosinoquinases, capazes de promover sinalização insulínica junto aos transportadores de glicose GLUT 4 e GLUT 8, sendo já evidenciada pela literatura a relação entre glicose, insulina e aprendizado (PARK, 2001; MESIER, 2004), entretanto os mecanismos bioquímicos que levam a este aprendizado, bem como a função de neurônios glicossensíveis localizadas nestas áreas, ainda não encontra-se totalmente esclarecido (REAGAN, 2005).

Sendo assim, a injeção ICV de STZ, possui o objetivo de determinar a participação de áreas límbicas em processos associados ao aprendizado, uma vez que os transportadores de glicose capazes de sofrer sinalização insulínica (GLUT 4 e GLUT 8) localizam-se principalmente nestas regiões (MCEWEN & REAGAN, 2004; REAGAN, 2005).

Quando procede-se a análise da variável %EA no grupo de animais tratados com STZ, verifica-se a aquisição de esquiva, quando comparada a primeira e segunda exposição, nos grupos STZ 2.2 mg/kg e no grupo controle, mas não verifica-se a aquisição de esquiva dos braços abertos na dose de 4.4 mg/kg.

A análise da variável %TA, demonstra a não aquisição de esquiva na dose de 2.2 mg/kg e 4.4 mg/kg, bem como do grupo controle (sal 0,9%). Entretanto, foi verificada a aquisição de esquiva do grupo controle e STZ 2.2 mg/kg, quando procedeu-se a análise da variável %EA, todavia o grupo STZ 4.4 mg/kg, não adquiriu esquiva, verificando-se a ocorrência de antagonismo insulínico nesta dose.

Logo, sugere-se a participação da insulina (STZ 4.4 mg/kg) no processo de aquisição de esquia.

Dados recentes da literatura cada vez mais evidenciam a participação da sinalização do hormônio insulina, tanto promovendo “aumento” da memória em testes realizados em animais e humanos (STOCKHORST et al, 2004), assim como a participação da insulina em doenças neurodegenerativas (PLUM et al, 2005), como a doença de Alzheimer.

Como citado anteriormente, a participação da glicose não ocorre somente através de sinalização central em áreas límbicas, mas esta participação dá-se também, através do aumento dos níveis sanguíneos de glicose e conseqüentemente através de sinalização a núcleos encefálicos inferiores (NTS), capazes de sinalizar a áreas límbicas estas alterações na glicemia (CRAIG, 2002; 2003).

A análise da variável EF, indicativa de ocorrência de alteração locomotora, não encontra-se alterada nos grupos STZ 2.2 mg/kg e STZ 4.4 mg/kg, quando relacionadas ao grupo controle (sal. 0,9%), logo não verifica-se a ocorrência de prejuízo locomotor em decorrência da administração ICV da referida droga.

Como o nervo vago constitui-se no maior nervo do corpo humano, sugere-se que a sinalização glicêmica ocorra através deste; logo, informações periféricas carregadas pelo nervo vago são de fundamental importância para informar a manutenção e/ou alteração da homeostasia (CRAIG 2002; 2003).

Desta forma, a secção destas aferências vagais poderia interferir na sinalização glicêmica junto ao NTS e desta forma, prover informações alteradas quanto ao estado homeostático do organismo.

Dados do nosso laboratório sugerem que a vagotomia bilateral subdiafragmática poderia promover prejuízo na sinalização da glicose junto ao NTS e conseqüentemente alterar o padrão de exposição dos animais expostos ao paradigma do LCE na segunda exposição (GHIZONI et al, 2006).

Estudos que promoveram a glicoprivação com o análogo glicêmico 5-TG (5-tio-glicose), demonstram a localização de áreas responsivas a alterações locais de glicose, situadas no tronco cerebral, principalmente área bulbar ventrolateral e dorsomedial, com função regulatória, capazes de alterar a ingestão de alimentos e promover aumento da glicemia (RITTER, 2000).

Áreas localizadas no bulbo dorso medial possuem a função de monitoramento e comparação do conteúdo de glicose presente no LCR e no sangue, sendo intimamente associadas com o quarto ventrículo; estas áreas estão em proximidade com a área póstrema, que possui capilares fenestrados e também encontram-se em proximidade com terminações aferentes quimiosensitivas das fibras vagais do NTS. (RITTER, 2000).

Sendo assim estas áreas localizadas no tronco cerebral e com função regulatória, poderiam não estar recebendo informações sensoriais periféricas providas pelo nervo vago, através do circuito vago-NTS-amígdala (SAWCHENKO, 1983), comprometendo o processamento de informações cognitivas de caráter emocional.

Estes dados são observados através da não alteração no número de EA, bem como da %TA dos animais vagotomizados no paradigma E1/E2, em comparação com os animais sham-operados.

Outra forma de estimar-se a ocorrência de aprendizado emocional foi através da análise de  $\Delta$  shortening (porcentagem de encurtamento), valor dado através da seguinte fórmula:  $\%E1/\%E2$  na  $\%EA = \%EA (E1) - \%EA (E2) \times 100\% / \%EA (E1)$ ; de maneira semelhante foi calculado o  $\Delta$  shortening relacionado a %TA. A porcentagem de encurtamento faz com que se possa comparar a ocorrência de aprendizado emocional entre grupos de animais submetidos ao procedimento experimental e seu grupo controle. Nossos dados demonstram novamente prejuízo no aprendizado emocional de animais vagotomizados.

Estes dados em conjunto sinalizam a participação de informações vagais provenientes de informações sensoriais, capazes de participar de processos cognitivos associados ao aprendizado emocional.

A realização do procedimento cirúrgico objetivando a vagotomia não foi capaz de promover prejuízo locomotor, tanto nos animais sham-operados como nos animais vagotomizados, isto é evidenciado pelo número total de entrada nos braços fechados nestes grupos de animais, onde não foi verificada diferença estatística significativa entre ambos, conseqüentemente, a alteração na exploração dos braços abertos verificada nos animais na segunda exposição não é decorrência de prejuízo locomotor (GHIZONI et al, 2006).

Vale ressaltar que o procedimento de vagotomia bilateral subdiafragmática, promove a perda de informações tanto de fibras aferentes quanto de fibras

eferentes, logo, podem ocorrer alterações no animal do ponto de vista comportamental e fisiológico, tais como prejuízo em informações a cerca de distensão gástrica, entre outras.

A realização de vagotomia bilateral também induz disfunções gastrintestinais (MARTIN et al, 1977), além de promover perda de peso em animais submetidos a este procedimento cirúrgico (KRALY et al, 1986). Sendo assim, a perda de peso evidenciada em nosso trabalho no período de 4 semanas após a intervenção cirúrgica, evidencia o sucesso deste procedimento (GHIZONI et al, 2006; LEONHARDT et al, 2004).

O estudo conduzido por nosso laboratório sugere que informações sensoriais conduzidas através do tronco vagal são importantes para o aprendizado emocional verificado no LCE. Isto poderia dar-se através da presença de glicorreceptores localizados no tronco hepático do nervo vago, sensíveis a informações glicêmicas evidenciadas pelo sistema porta-hepático (NIIJIMA, 1969; NIIJIMA, 1983), informando desta forma ao NTS os níveis glicêmicos circulantes através do circuito vago – NTS – amígdala (MESSIER, 2004).

O nervo vago tem sido considerado importante para a mediação dos efeitos de melhora na memória, através de substâncias administradas sistemicamente. O aumento de desempenho em testes de alteração espontânea induzidos por administração sistêmica de L-glicose foi revertido por vagotomia (TALLEY et al, 2002).

A administração de substância P capaz de promover melhora da memória no teste de esQUIVA inibitória, administrada IP é bloqueada por vagotomia (NOGUEIRA et al, 1994).

Além disso, a remoção cirúrgica dos nervos vagos também atenua os efeitos de melhora de memória evidenciados pelo pós-treino com colecistocinina, bombesina e peptídeo liberador de gastrina no teste de retenção de memória, utilizando-se o T-maze (FLOOD & MORLEY, 1998; FLOOD et al, 1987).

Nossos dados aqui apresentados demonstram que o nervo vago também contribui para aprendizado da esQUIVA dos braços abetos no LCE.

Desta forma, o presente estudo reforça a idéia de que informações sensório-viscerais emergindo do meio interno podem alterar a percepção do meio externo e mudar o comportamento através da demanda emocional (ZAGON, 2001).



Sendo assim, nossos dados sugerem a participação da glicose em processos cognitivos, através da oferta sanguínea desta, quer seja através do aporte sanguíneo junto ao cérebro, quer seja através da mediação de aferências vagais capazes de fornecer informações viscero-sensoriais ao SNC carreadas através do nervo vago.

## **6. CONCLUSÕES:**

1. Ratos submetidos ao LCE após administração ICV de 2-DG (20  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ ) anterior à 1ª exposição ao labirinto, exibiram prejuízo na aquisição de esquiva dos braços abertos.
2. Ratos submetidos ao LCE após administração ICV de STZ (2.2. mg/kg e 4.4 mg/kg) anterior à 1ª exposição ao labirinto, exibiram prejuízo na aquisição de esquiva dos braços abertos.
3. Ratos submetidos ao LCE após administração ICV de 2-DG (10  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{L}$ ) exibiram aumento da exploração dos braços abertos na E1, quando comparados ao grupo controle (sal 0,9%), evidenciado efeito ansiolítico na primeira exposição ao LCE.
4. Não houve prejuízo locomotor dos animais submetidos à administração ICV tanto de 2-DG quanto de STZ em qualquer dose, quando comparados ao grupo controle.
5. Ratos submetidos ao LCE após vagotomia bilateral subdiafragmática exibiram prejuízo na aquisição de esquiva dos braços abertos.
6. Não houve prejuízo locomotor dos animais submetidos à vagotomia bilateral subdiafragmática.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ABOTT, M.A.; WELLS, D.G.; FALLON, J.R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci*, 19: 7300-7308, 1999.

ALKIRE, M.T.; HAIR, R.J.; FALLON, J.H.; CAHILL, L. Hippocampal, but not amygdala, activity at encoding correlates with long-term, free recall of non emotional information. *Proc Natl Sci*, 95: 14506-14516, 1998.

ANDERSON, C.M.; NEDERGAARD, M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci*, 26: 340-344, 2003.

AR' RAJAB. A., AHREN, B. Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas*, 8: 50-57, 1993.

BEGUM N., SUSSMAN, K.E., DRAZNIN B. Differential effects of diabetes on adipocyte and liver phosphotyrosine phosphoserine phosphatase activities. *Diabetes*, 40: 1620-1629, 1991.

BENOIT, S.C.; AIR, E.L.; COOLEN, L.M.; STRAUSS, R.; JACKMAN, A.; CLEGG, D.J.; SEELEY, R.J.; WOODS, S.C. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*, 22: 9048-9052, 2002.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Fisiologia. 5<sup>a</sup> Ed. Ed Guanabara Koogan, 2004.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res*, 108: 197-203, 2000.

BIRNBAUM, M.J. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell*, 57: 305-315, 1989.

- BLAKE, T.M., VARNHAGEN, C.K., PARENT, M.B. Emotionally arousing pictures increase blood glucose levels and enhance recall. : *Neurobiol Learn Mem*, 75: 262-273, 2001.
- BURANT, C.F., TREUTELAAR, M.K., BLOCK, N.E., BUSE, M.G. Structural differences between liver- and muscle-derived insulin receptors in rats. *J Biol Chem*, .261: 14361-1465, 1986.
- CAHILL, L., MCGAUGH, J.L., A novel demonstration of enhanced memory associated with emotional arousal. *Conscious Cogn*, 4: 410-421, 1995.
- CARDENAS, F.; LAMPREA, M.R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 122: 169-174, 2001.
- CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, 25: 697-709, 2001.
- CARPENTER, M.B. Fundamentos de Neuroanatomia. 4ª Ed. Editorial Médica Panamericana, 1999.
- CHOEIRI, W. STAINES, T., MIKI, T., SEINO, S., MESSIER, C. Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience*, 130: 591-600, 2005.
- CLARKE, D.W.; BOYD, F.T.; KAPPY, M.S.; RAIZADA, M.K.; Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-d-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. *J Biol Chem*, 259: 11672-11675, 1984.
- CRAIG, A.D., How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 655-665, 2002.
- CRAIG, A.D., Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr. Op. in Neurobiol*, 13: 500-505, 2003.

DAL-CÓL, M.L. PEREIRA, L.O. ; ROSA, VP.; CALIXTO, A .V.; CAROBREZ, A .P; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav*, 74: 395-400, 2003.

DAWSON, G. R. & TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *TINS*, 16: 33-36, 1995.

De la MONTE, S.; WANDS, J.R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 7: 45-61, 2005.

DEVASKAR, S.U. A review of insulin/ insulin-like peptide in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol*, 293: 385-396, 1991.

DORÉ, S., KAR, S., ROWE, W., QUIRION, R. Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I]IGF-II and [125I]Insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience*, 80: 1033–1040, 1997

DUELLI, R.; STAUDT, R.; DUEMBGEN, L.; KUSCHINSKY, W. Increase in glucose transporter densities of Glut3 and decrease of glucose utilization in rat brain after one week of hypoglycemia. *Brain Res*, 831: 254– 262, 1999.

DRINGEN, R.; HAMPRECHT, B. Glucose, insulin and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem*, 58: 511-517, 1992.

FARREL, C.L., PARDRIDGE, W.M. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88: 5779-5783, 1991.

FILE, S.E., One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, 100: 281-283, 1990.

FILE, S. E., ZANGROSSI, H. "One trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 110: 240-244, 1993.

FILLENZ, M.; LOWRY, J.P. The relation between local cerebral blood flow and extracellular glucose concentration in rat striatum. *Exp. Physiol*, 83: 233-238, 1998a

FILLENZ, M.; LOWRY, J.P. Studies of the source of glucose in the extracellular compartment of the rat brain. *Dev. Neurosci*, 20: 365-368, 1998b.

FLOOD, J. F., SMITH, G. E., & MORLEY, J. F. Modulation of memory processing by cholecystokinin, dependence on the vagus nerve. *Science*, 236: 823-834, 1987.

FLOOD, J.F.; MORLEY, J.F. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Research*, 460: 314-322, 1998.

FORD, C.E., SCHOLEY, A. B., AYRE, G., WESNES, K. The effect of glucose administration and the emotional content of words on heart rate and memory. *J Psychopharmacol*, 16: 241-245, 2002.

FROLICH, L.; BLUM-DEGEN, D.; BERNSTEIN, H.G.; ENGELSBERGER, S.; HUMRICH, J.; LAUFER, S.; MUSCHNER, D.; THALHEIMER, A.; TURK, A.; HOYER, S. ZOCHLING, R.; BOISSL, K.W.; JELLINGER, K.; RIEDERER, P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 105: 423-438, 1998.

GEROZISSIS, K.; KYRIAKI, Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol*, 23: 1-25, 2003.

GHIZONI, D.M.; JOÃO L.M.; MORATELLI NETO, L.; DA CUNHA, I.C.; ORLANDI PEREIRA, L.; BORGES, F.R.; BATTISTI, R.; DE OLIVEIRA, L.G.; MENEGHINI, L.; LUCINDA, A.M.; MARINO NETO, J.; PASCHOALINI, M.A.; FARIA, M.S. The

effects of metabolic stress and vagotomy on emotional learning in an animal model of anxiety. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86: 107–116, 2006.

GIAUME, C., TABERNERO, A., MEDINA J.M. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia*, 21: 114-123, 1997.

GOLD, P.E. Role of glucose in regulating the brain and cognition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61: 987S-995S, 1995

GRAEFF, F. G.; Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviours and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*, 27: 811-829, 1994.

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: ROTH, G. ; BURROWS, G.D.; NOYES, R. (Eds). *Handbooks of anxiety*. v. 3: 307-357, Amsterdam : Elsevier, 1990.

GRUNBLATT, E., HOYER, S., RIEDERER.P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transmission*, 111: 367-386, 2003.

GRUNDY, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut*, 51: 2-5, 2002.

GRUNDY, D. Signalling the state of the digestive tract. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 125: 76 – 80, 2006.

HABER, R.S., WEINSTEIN, S.P., O'BOYLE, E., MORGELLO, S. Tissue distribution of the human GLUT 3 glucose transporter. *Endocrinology*, 132: 2538–2543, 1993.

HANDLEY, S.L., MITHANI, S. Effects of  $\alpha$ 2-adrenoreceptor agonist and antagonist in a maze exploration model of fear - motivated behaviour. *N. S. Arch. Pharmacol*, 327: 1-5, 1984.

HEIJBOER, A.C.; PIJL, H.; VAN DEN HOEK, A.M.; HAVEKES, L.M.; ROMIJN, J.A.; CORSSMI, E.P.M. Gut-Brain axis: regulation of glucose metabolism. *J Endocrinol*, 18: 883-894, 2006

HILL, J.M.; LESNIAK, M.A.; PERT, C.B.; ROTH, J. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: proeminence in olfactory and limbic areas. *Neurosci*, 17: 1127-1138, 1986.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J.. Responses of swiss-webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav*, 2: 473-488, 1998.

JOSHI, S.K., GEBHART, G.F., Visceral pain. *Curr. Rev. Pain*, 4: 499–506, 2000.

KADOWAKI, T., KASUGA, M., AKANUMA, Y., EZAKI, O., TAKAKU, F. Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin-diabetic rats. *J Biol Chem*, 259: 14208-14216, 1984.

KAYANO, T., FUKUMOTO, H., EDDY, R.L., FAN, Y.-S., BYERS, M.G., SHOWS, T.B., BELL, G.I., Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. *J. Biol. Chem*, 263: 15245–15248, 1988.

KILPATRICK, L.; CAHILL, L. Amygdala modulation of parahippocampal and frontal regions during emotionally influenced memory storage. *Neuroimage*, 20: 2091-2099, 2003.

KOPF, S.R.; BARATTI, C.M. Memory modulation by post-training glucose or insulin remains evident at long retention intervals. *Neurobiol Learn Mem*, 65: 189-191, 1996.

KRALY, F.S.; JEROME, C.; SMITH, G.P. Specific postoperative syndromes after total and selective vagotomies in the rat. *Appetite*, 7: 1-17, 1986.



LEONHARDT, M.; HRUPKA, B.J.; LANGHANS, W. Subdiaphragmatic vagal deafferentation fails to block the anorectic effect of hydroxycitrate. *Physiol Behav*, 82: 263-268, 2004.

LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185, 1987.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46: 321-340, 1990.

MAHER, F., VANUCCI, S.J., SIMPSON, I.A. Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT 3 from the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13: 342-345, 1993

MARINO-NETO, J., SABI, M., PASCHOALINI, M. A. Adrenergic Mechanisms. In: *Encyclopedia of endocrine diseases*. Vol.1, p. 106-111. Ed. Elsevier, 2004.

MARIN-SPIOTTA, A.; LEVIN, B.E.; TKACS, N.C. A single episode of central glucoprivation reduces the adrenomedullary response to subsequent hypoglycemia in rats. *Neurosc. Lett*, 360: 81-84, 2004.

MARTIN, J.R.; ROGERS, R.C.; NOVIN, D. Excessive gastric retention by vagotomized rats and rabbits given a solid diet. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 10: 291-294, 1977.

MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behaviour Research and Therapy*, 28: 455-568, 1990.

MCEWEN, B.S., REAGAN, L.P. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*, 490: 13-24, 2004.

MCGAUH, J.L. Memory – a century of consolidation. *Sciences Compass*, 28: 248-251, 2000.

MCGAUGH, J.L., MCINTYRE, C.K., POWER, A.E. Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobio Learn Mem*, 78: 539-552, 2002.

MCNAY, E.C.; GOLD, P.E. Food for thought: fluctuations in brain extracellular glucose provide insight into the mechanism of memory modulation. *Behav. Cogn. Neurosci Ver*, 1: 264-280, 2002.

MCNAY, E.C.; SHERWIN, R.S. Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes*, 53: 418-425, 2004.

MESSIER, C. Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol*, 490: 33-57, 2004.

MESSIER, C.; DESTRADE, C. Improvement of memory for an operant response by post-training glucose in mice. *Behav Brain Res*, 31: 185-91, 1988.

MEYEROVITCH J., BACKER, J.M., KAHN, C.R. Hepatic phosphotyrosine phosphatase activity and its alteration in diabetic rats. *J. Clin. Invest*, 84: 976-983, 1989.

MEYEROVITCH J., BACKER, J.M., CSERMELY, P., SHOELSON, SE, KAHN, CR. Insulin differentially regulates protein phosphotyrosine phosphatase activity in rat hepatoma cells. *Biochemistry*, 31: 10338-10344, 1992.

MONTGOMERY, K.C., The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol*, 48: 254-260, 1955.

MYERS, M.G.; SUN, X.J.; WHITE, M.F. The IRS-1 signaling system. *Trends Biochem*, 19: 289-293, 1994.

NAGAMATSU, S., KORNHAUSER, J.M., BURANT, C.F., SEINO, S., MAYO, K.E., BELL, G.I. Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT 3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem*, 267: 467-472, 1992.

NAKAE, Y.; KIDO, Y.; ACCILI, D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev*, 22: 818-835, 2001.

NIIJIMA, A. Glucose sensitive afferent nerve fibers in the liver and their role in food intake and blood glucose regulation. *Journal of the Autonomic nervous System*, 9: 207- 220, 1983.

NIIJIMA, A. Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. *Annals of the New York Academy of Science*, 157: 690–700, 1969.

NOGUEIRA, P.J.C.; TOMAZ, C.; WILLIAMS, C.L. Contribution of the vagus nerve in mediating the memory-facilitating effects to substance P. *Behavioural Brain Research*, 62: 165-169, 1994.

O' CARROLL, R.E., DRYSDALE, E, CAHILL, L. SHAIJAHAN, P., EBMEIER, K.P. Memory for emotional material: a comparison of central versus peripheral beta blockade. *J Psychopharmacol*, 13: 32-39, 1999.

OKAMOTO, H.; NAKAE, J.; KITAMURA, T.; PARK, B.C.; DRAGATIS, I.; ACCILI, D. Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, 114: 214-223, 2004.

OTTONI, E.B. Etholog2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, instruments & Computers*, 32: 446-449, 2000

PARDRIDGE, W.M. Brain metabolism: a perspective from the blood–brain barrier. *Physiol. Rev*, 63: 1481– 1535, 1983

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates 2<sup>a</sup> ed. New York Academic Press., 1986.

PARK, C.R. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*, 25: 311-323, 2001.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth*, 14: 149-167, 1985.

PEREIRA, L.O., DA CUNHA, I.C., NETO, J.M., PASCHOALINI, M.A., FARIA, M.S. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res*, 159: 55-61, 2005.

PHILIPS, R.J., POWLEY, T.L., Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Res. Rev*, 34: 1 – 26, 2000.

PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRÜNING.; The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism*, 16: 59-65, 2005.

PODUSLO, J.F.; CURRAN, G.L.; WENGENACK, T.M.; MALESTER B.; DUFF, K. Permeability of proteins at the blood-brain barrier in the normal adult mouse and double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 8: 555-567, 2001.

RITTER, S.; DINH, T.T.; ZHANG, Y. Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res*, 856: 37-47, 2000.

RAYNER, D.V.; Glucose Transporters in the brain. *Proc. Nutr. Soc*, 55: 209-219, 1996.

REAGAN, L.P., GOROVITS, N., HOSKIN, E.K., ALVES, S.E., KATZ, E.B., GRILLO, C.A., PIROLI, G.G., MCEWEN, B.S., CHARRON, M.J. Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98: 2820-2825, 2001.

REAGAN, L.P., ROSSEL, D.R., ALVES, S.E., HOSKIN, E.K., MCCALL, A.L., CHARRON, M.J., MCEWEN, B.S. GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res*, 932: 129-134, 2002.

REAGAN, L.P., Neuronal insulin signal transduction mechanisms in diabetes phenotypes. *Neurobiology of Aging*, 26: 56-59, 2005.

RICHTER-LEVIN, G., AKIRAV, I. Emotional tagging of memory formation--in the search for neural mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev*, 43: 247-256, 2003.

RODGERS, R. J.; COLE, J.C. The elevated plus maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDRIE, C. A., (Eds.) *Ethology and Psychopharmacology*, Chichester: John Wiley and Sons, 1994.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; COLE, J.C.; DEWAR, C.V.; KIDD, G.R.; KIMPSON, P.H. Plus maze retest profile in mice: importance of initial stages of Trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology, biochemistry and Behaviour*, 54: 41-50, 1996.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 289-304, 1997.

RODRIGUEZ, W.A; HORNE C.A; MONDRAGON, A.N.; PHELPS, D.D. Comparable dose-response functions for the effects of glucose and fructose on memory. *Behav Neural Biol*, 61: 162-169, 1994.

ROSA, V. P. ; VANDRESEN, N. ; CALIXTO, A. V. ; KOVALESKI, D. F. ; FARIA, M. S. . Temporal analysis of the rat's behaviour in the plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66: 177-182, 2000.

SAWCHENKO, PE. Central connections of the sensory and motor nuclei of the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst*, 9: 13–26, 1983.

SCHWARTZ, M.W.; PORTE, D. Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*, 307: 375-379, 2005.

SCHWARTZ, M.W., FIGLEWICZ, D.P., BASKIN, D.G., WOODS, S.C., PORTE D. JR. D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews*, 13: 387-414, 1992.

SHPAKOV, A.O.; PERTSEVA, M.N.; Structural and functional characterization of insulin receptor substrate proteins and the molecular mechanisms of their interaction with insulin superfamily tyrosine kinase receptors and effector proteins. *Membr Cell Biol*, 13: 455-484, 2000.

SHIRIASHI, T.; MAGER, M. 2-Deoxy-D-glicose induced hypothermia: thermoregulatory pathways in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 239: 270-276, 1980

SIPOLS, A.J.; BLASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M.W. Effects of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, 44: 147-151, 1995.

STOCKHORST, U.; DE FRIES, D.; STEINGRUEBER, H-J.; SCHERBAUM, W.A.; Insulin and the CNS: effects on fod intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiology & Behavior*, 83: 47-54, 2004.

SWARTZ, B.E., HALGREN, E., FUSTER, J.M., SIMPKINS, E., GEE, M., MANDELKERN, M. Cortical metabolic activation in humans during a visual memory task. *Cereb Cortex*, 5: 205-214, 1995.

TALLEY, C.P., CLAYBORN H., JEWEL E., MCCARTY, R., GOLD, P.E. Vagotomy attenuates effects of L-glucose but not of D-glucose on spontaneous alternation performance. *Physiol. and Beh*, 77: 243-249, 2002.

THOMPSON, D.A.; LILAVIVATHANA, U.; CAMPBELL R.G.; WELLES.L.; CRAIG A.B. Thermoregulatory and related responses to 2-deoxy-d-glucose administration in humans. *Am J Physiol*, 239: 291-295, 1980.

TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 44: 463-469, 1993.

ULLRICH, A.; BELL, J.R.; CHEN, E.Y.; HERRERA, R.; PETRUZELLI, L.M.; DULL, T.J.; GRAY, A.; COUSSENS, L.; LIAO, Y.C.; TSUBOKAWA, M. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313: 756-761, 1985.

VANUCCI, S.J., MAHER, F., SIMPSON, I.A. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, 21: 2-21, 1997.

VANUCCI, S.J., CLARK, R.R., KOEHLER-STEC, E., LI, K., SMITH, C.B., DAVIES, P., MAHER, F., SIMPSON, I.A. Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci*, 20: 369-379, 1998.

WERNER, H.; RAIZADA, M.K.; MUDD, L.M.; et al. Regulation of rat brain/HepG2 glucose transporter gene expression by insulin an insulin-like growth factor-I in primary cultures of neuronal and glial cells. *Endocrinology*, 125: 314-320, 1989.

WHITE, N.M.; Peripheral and central memory enhancing actions of glucose. In: Frederickson, R.C.A., McGaught, J.L.; Felten, D.L. (Eds). Peripheral signaling of

the brain: role in neural-immune interactions, learning and memory. Hogrefe and Huber, Toronto, pp. 421-443, 1991.

WOZNIAK, W.; RYDZEWSKI, B.; BAKER, S.P.; RAIZADA, M.K. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int*, 22: 1-10, 1993.

YE, P.; XING, Z.; DAI, Z.; D'ERCOLE. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res*, 95: 44-54, 1996.

ZAGON, A. Does the vagus nerve mediate the sixth sense? *Trends in Neurosciences*, 24: 671–673, 2001

ZONTA, M.; ANGULO, C.M.; GOBBO, S.; ROSENGARTEN, B.; HOSSMANN, K.A.; POZZAN, T.; CARMIGNOTO, G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6: 43-50, 2003.