

Ana Magdalena Velázquez Chávez

**INFLUÊNCIA DE UMA REGIÃO DO CROMOSSOMO 4 DO
RATO NO METABOLISMO E MEMÓRIA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
mestre em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Geison de Souza
Izídio

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chávez, Ana Magdalena Velázquez.

INFLUÊNCIA DE UMA REGIÃO DO CROMOSSOMO 4 DO RATO NO
METABOLISMO E MEMÓRIA / Ana Magdalena Velázquez Chávez ;
orientador, Geison de Souza Izídio - Florianópolis, SC, 2017.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Linhagem SHR. 3. Linhagem SLA16. 4.
Glicose. 5. Campo aberto. I. Izídio, Geison de Souza. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Ana Magdalena Velázquez Chávez

**INFLUÊNCIA DE UMA REGIÃO DO CROMOSSOMO 4 DO
RATO NO METABOLISMO E MEMÓRIA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Florianópolis, 6 de fevereiro de 2017.

Prof. Jamil Assereuy Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Geison de Souza Izídio, Dr.
Orientador - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. ^a Daniele Cristina de Aguiar, Dr.^a
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Leandro José Bertoglio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, *Ana* e *Dario*, e meus irmãos *Marcos* e *Alex*, pelo apoio, carinho e amor, em especial a minha avó *Eusebia*, cuja benção me deu a fortaleza necessária para culminar o mestrado com sucesso.

Ao *Luis Salgueiro*, meu companheiro e confidente, pelo apoio constante e tonar minha vida completa.

AGRADECIMENTOS

O trabalho desta dissertação foi desenvolvido, em sua maioria, no Laboratório de Genética do Comportamento do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Eu gostaria de expressar minha gratidão para as pessoas que de alguma maneira contribuíram para o trabalho. Em particular gostaria de agradecer:

Ao meu orientador, Professor Geison de Souza Izídio, a quem devo parte da minha formação científica e humana, pela oportunidade de fazer meu trabalho em seu laboratório e pelo exemplo de pesquisador de pensamento crítico e comprometido com a formação de cientistas de excelência no Brasil e a nível internacional.

Aos Professores Carlos Zárate e Patricia Dillenburg, pela amizade e colaboração neste trabalho que me levaram a desenvolver as bases sólidas para o meu amadurecimento profissional. Ao Rodrigo Ferracini Rodrigues por ter contribuído com as ideias iniciais das análises de bioinformática.

Ao Professor Rui Daniel Schröder Prediger pela colaboração fundamental e a gentileza de me receber em seu laboratório: Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, onde foram realizados os experimentos de memória com a Doutoranda Katiane Roversi cuja paciência e ensino tornaram agradável o aprendizado.

Aos meus grandes amigos do LCG, principalmente a Elisa Corvino, Jessica Squáriz, Guilherme Fadanni, Laís Ostaszewski, Isis Mello, Rafaela Venturi e Natalli Granzotto, pela amizade e suporte nos momentos difíceis e por tornarem o ambiente de trabalho agradável com discussões científicas. Aos demais colegas, Renata, Pamela e Rachel, por sua colaboração no dia a dia do laboratório.

Aos meus amigos de mestrado, Fernanda Troyner, Suelen Detoni, Thiele Rosales e Mallone Lopez pela amizade, colaboração e companheirismo durante todo esse tempo e que apesar da distância, ainda hoje permanecem.

Colegas de mestrado, doutorandos, professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida a mim para a realização do mestrado.

“Cuando la sabiduría entrare a tu corazón y la ciencia fuere grata a tu alma, la discreción te guardará; te preservará la inteligencia para librar-te de los que se alegran haciendo el mal, cuyas verdades son torcidas, y torcidos sus caminos”
(Proverbios, 2; 10-15.)

RESUMO

O funcionamento correto do sistema nervoso central (SNC) depende de uma regulação estrita do metabolismo. Um desequilíbrio nesta regulação pode desencadear consequências graves ao longo do tempo, como estresse oxidativo, distúrbios emocionais, prejuízo na memória e até mesmo neurodegeneração. A linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) caracteriza-se por desenvolver ao longo do tempo hipertensão, anormalidade no metabolismo de lipídeos e prejuízo cognitivo associado com alterações do metabolismo central e periférico de glicose. Consequentemente, a linhagem SHR tem sido proposta como modelo para o estudo de demência induzida por alterações metabólicas. Em nosso laboratório, nós desenvolvemos uma linhagem congênica, chamada SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*), que é geneticamente idêntica a linhagem SHR, exceto por uma região do cromossomo 4. A hipótese deste trabalho foi que a área genômica diferencial (AGD) possui gene (s) que prejudicam o metabolismo de carboidratos e as tarefas de aprendizado/memória relacionados à idade das linhagens SHR e SLA16. Assim, o objetivo foi avaliar a influência genética da AGD no metabolismo e memória destas duas linhagens de ratos. Para isso foram desenvolvidos quatro blocos experimentais. No primeiro bloco foi realizada uma análise bioinformática dos genes da AGD, para avaliar a sua relação com vias/funções metabólicas e processos neurobiológicos. O segundo bloco caracterizou o perfil metabólico periférico de glicose e lipídeos e o desempenho em tarefas cognitivas dos machos jovens das linhagens SHR e SLA16. O terceiro bloco repetiu o anterior, entretanto utilizou-se machos adultos das linhagens SHR e SLA16. Finalmente, o quarto bloco, avaliou o efeito do tratamento prolongado com metformina (200 mg/kg via oral) no metabolismo de glicose e sua influência nas tarefas de aprendizado/memória nos machos jovens das linhagens

SHR e SLA16. Os resultados do primeiro bloco experimental mostram que a AGD possui genes envolvidos em vias relacionadas com metabolismo de glicose, danos oxidativos, processos neurobiológicos e doenças neurodegenerativas. O segundo bloco revelou que machos jovens da linhagem SLA16 diferem significativamente no metabolismo periférico de glicose e lipídeos em relação aos machos SHR. O terceiro bloco sugeriu que a idade influenciou no prejuízo cognitivo e no metabolismo de triglicérides da linhagem SLA16 em comparação à linhagem SHR, sem manifestar alterações no metabolismo periférico de glicose. Finalmente, o quarto bloco sugeriu que o tratamento prolongado com metformina melhora o metabolismo de glicose e aparentemente reverte o prejuízo do aprendizado na memória espacial de longa e curta duração, somente nos animais SLA16. Estes dados, em conjunto, revelam que a AGD possui genes associados às vias metabólicas e processos neurobiológicos que alteram negativamente o metabolismo de triglicérides e o aprendizado/memória espacial ao longo do tempo. Eles também sugerem a linhagem SLA16 como modelo de estudo dos mecanismos subsequentes das alterações metabólicas da glicose e prejuízos de aprendizado e memória espacial, relacionados à idade.

Palavras-chave: Linhagem SHR. Linhagem SLA16. Campo aberto. Glicose. Metformina.

ABSTRACT

The correct functioning of the central nervous system (CNS) depends on a strictly regulation of metabolism. An imbalance in this regulation can trigger serious consequences over time, such as oxidative stress, emotional disturbances, memory damaged and even neurodegeneration. The SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) strain is characterized by the development of hypertension, abnormalities in lipid metabolism and cognitive impairment associated with changes in central and peripheral glucose metabolism over time. Consequently, the SHR strain has been proposed as a model for the study of dementia induced by metabolic alterations. In our laboratory, we developed a congeneric strain called SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*), which is genetically identical to the SHR strain, except for one region of chromosome 4. The hypothesis of this dissertation was that genes of the DGA impair carbohydrate metabolism and learning/memory tasks related to age in SHR and SLA16 strains. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of this differential genomic area (DGA) on the metabolism and memory of these two strains of rats. To accomplish this objective, four experimental blocks were developed. In the first block, a bioinformatic analysis of the DGA genes was carried out to evaluate its relation with metabolic functions and neurobiological processes. The second block characterized the peripheral metabolic profile of glucose and lipids and the performance in cognitive tasks of young males of SHR and SLA16 strains. The third block repeated the previous one, however using now adult males of the SHR and SLA16 strains. Finally, the fourth block evaluated the effect of long-term treatment with metformin (200 mg/kg) on glucose metabolism and its influence on learning/memory tasks in young males of the SHR and SLA16 strains. The results of the first experimental block show that DGA has genes related to glucose metabolism, oxidative damage, neurobiological processes and neurodegenerative diseases. The second block revealed that young SLA16 males differ significantly in peripheral metabolism of glucose and lipids in relation to SHR males. The third block suggested age influences on the cognitive impairment and triglyceride metabolism of the SLA16 compared to the SHR, without manifesting alterations in peripheral glucose metabolism. Finally, the fourth block suggested that prolonged treatment with metformin improves glucose metabolism and apparently reverses the impairment of learning in spatial memory of long-term and short-term, only in SLA16 rats. These data, together, revealed that DGA has genes associated with metabolic pathways and

neurobiological processes that influence triglyceride metabolism and spatial learning/memory over time. These data also suggested the SLA16 strain as a model for the study of mechanisms following metabolic changes in glucose and age-related impairments of learning and spatial memory.

Keywords: SHR strain. SLA16 strain. Open field. Glucose. Metformin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos prejuízos ocasionados pela alteração da sinalização de insulina e sua relação com as patogêneses da DA	33
Figura 2 - Modelos animais para o estudo do prejuízo neurobiológico devido à insulina resistência a nível central	35
Figura 3 - Construção da linhagem congênica SLA16 e localização do QTL Anxrr16	38
Figura 4 - Desenho experimental aplicado no teste de tolerância oral à glicose	44
Figura 5 - Representação do aparato utilizado no teste do Campo Aberto.....	46
Figura 6 - Desenho experimental do teste de realocação de objetos e localização dos objetos no campo aberto	47
Figura 7 - Desenho experimental do teste do labirinto em Y modificado.....	48
Figura 8 - Representação do aparato utilizado no teste de labirinto aquático de Morris.....	49
Figura 9 - Desenho experimental do condicionamento aversivo para avaliar memória emocional de longo prazo.....	50
Figura 10 - Esquema representativo do bloco experimental 2.	55
Figura 11 - Esquema representativo do bloco experimental 3	56
Figura 12 - Esquema representativo do bloco experimental 4	57
Figura 13 - Curva de crescimento e ganho de peso semanal.....	61

Figura 14 - Locomoção e atividade exploratória na habituação ao CA de machos jovens das linhagens SHR e SLA16.....	62
Figura 15 - Memória espacial de curta e longa duração em machos jovens das linhagens SLA16 e SHR	64
Figura 16 - Memória de curta duração avaliada pelo teste de LYM em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16.....	65
Figura 17 - Desempenho dos machos jovens SHR e SLA16 no labirinto aquático de Morris	66
Figura 18 - Avaliação da memória emocional de longo prazo em machos jovens das linhagens SHR e SLA16.	67
Figura 19 - Teste de tolerância oral à glicose e variação dos níveis de glicose sanguínea nos primeiros 15 minutos em machos jovens das linhagens SLA16 e SHR.	68
Figura 20 - Habituação ao CA durante uma exposição de 15 minutos em machos adultos das linhagens SHR e SLA16.	70
Figura 21 - Memória espacial de curta e longa duração avaliados em machos adultos SLA16 e SHR pelo TRO.....	71
Figura 22 - Memória de curta duração avaliada pelo labirinto em Y modificado em ratos machos adultos das linhagens SLA16 e SHR..	75
Figura 23 - Curva de aprendizagem durante a fase de treino e latência para passar pelo local a plataforma no dia do teste no LAM avaliados em machos adultos SHR e SLA16.....	74
Figura 24 - Avaliação da memória emocional de longo prazo em machos das linhagens SHR e SLA16.....	76
Figura 25 - Curva de tolerância a glicose e incremento da glicose sanguínea nos primeiros 15 minutos em machos adultos das linhagens SHR e SLA16	77

Figura 26 - Curva de crescimento e ganho de corporal semanal (B) de machos jovens SHR e SLA16 tratados com metformina 200 mg/kg/dia ou veiculo.	79
Figura 27 - Efeito da metformina na habituação ao CA em 15 min nos machos jovens SHR e SLA16.	80
Figura 28 - Efeito da metformina na memória espacial de curta e longa duração em machos jovens SLA16 e SHR.....	81
Figura 29 - Efeito da metformina na memória espacial de curta duração em machos jovens SLA16 e SHR.	82
Figura 30 - Efeito da metformina na curva de aprendizagem em machos jovens SHR e SLA16 e latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris.....	83
Figura 31 - Efeito da metformina sobre a memória emocional em machos das linhagens SHR e SLA16.....	85
Figura 32 - Efeito do tratamento com metformina no TTOG em machos das linhagens SLA16 e SHR.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vias e genes da AGD do cromossomo 4 do rato associados a memória e metabolismo.....	59
Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos de machos jovens das linhagens SHR e SLA16.....	69
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos de machos adultos das linhagens SHR e SLA16.....	78
Tabela 3 - Efeito do tratamentos prolongado com metformina sobre os parâmetros bioquímicos de machos adultos das linhagens SHR e SLA16.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A- β	Peptídeo β -amilóide
ACV	Acidente cérebro vascular
AGD	Área Genômica Diferencial
<i>Anxrr16</i>	QTL para resposta relacionada à ansiedade 16 (do inglês <i>Anxiety related response QTL 16</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva da glicose (do inglês <i>area under curve</i>)
BHE	Barreira hemato-encefálica
CA	Campo Aberto
CEUA/UFSC	Comitê de ética no uso de animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina
CNV	Número de cópias variáveis (do inglês <i>copy numbers variants</i>)
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
DT2	Diabetes tipo 2
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GLUT-1	Transportador saturável independente de insulina tipo 1 (do inglês <i>Glucose Transporter type 1</i>)
GLUT-3	Transportador saturável independente de insulina tipo 3 (do inglês <i>Glucose Transporter type 3</i>)
ICV	Intra cérebro ventricular
ID	Índice de discriminação
IDE	Enzima degradante de insulina (do inglês <i>Insulin degradation enzyme</i>)
IGF-1	Fator de crescimento dependente de Insulina (do inglês <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>)
KEGG 2016	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
LAM	Labirinto aquático de Morris

LGC	Laboratório de Genética do Comportamento
LYM	Labirinto em Y modificado
LEW	Linhagem Lewis
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PPAR- δ/γ	Do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor: delta/gamma</i>
QTL	<i>Locus</i> para característica quantitativa (do inglês <i>Quantitative trait loci</i>)
RI	Receptores de insulina
RGD	Banco de dados do genoma do rato (do inglês <i>Rat Genome Database</i>)
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
SHR	Rato espontaneamente hipertenso (do inglês <i>Spontaneous Hypertensive Rat</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SLA16	SHR.LEW- <i>Anxrr16</i>
STZ	Estreptozotocina
TC	Tempo de Congelamento
TRO	Teste de Realocação de Objetos
TTOG	Teste de Tolerância oral à Glicose
WKY	Linhagem Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	27
1.2	REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE GLICOSE	28
1.3	ALTERAÇÕES DO METABOLISMO NO SNC	30
1.4	A INFLUÊNCIA DA IDADE NO PREJUÍZO COGNITIVO ASSOCIADO ÀS ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	33
1.5	MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DOS TRANSTORNOS METABÓLICOS E PREJUÍZOS COGNITIVOS	34
1.6	A LINHAGEM DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSA	35
1.7	A LINHAGEM CONGÉNICA SLA16	37
1.8	A METFORMINA E O TRANSTORNO METABÓLICO DA GLICOSE.....	39
2	HIPÓTESE PRINCIPAL DO ESTUDO.....	41
3	OBJETIVOS	41
3.1.1	Objetivo geral.....	41
3.1.2	Objetivos específicos	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
4.2	ANIMAIS	43

4.3	DROGAS	43
4.4	TESTES METABOLICOS	44
4.4.1	<i>Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)</i>	44
4.4.2	<i>Análise bioquímica de lipídeos séricos</i>	44
4.4.3	<i>Curva de crescimento</i>	45
4.5	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	45
4.5.1	<i>Campo Aberto (CA)</i>	45
4.5.2	<i>Teste de Realocação de Objetos (TRO)</i>	46
4.5.3	<i>Teste do Labirinto em Y modificado (TLY)</i>	47
4.5.4	<i>Teste do Labirinto Aquático de Morris (LAM)</i>	48
4.5.5	<i>Condicionamento aversivo contextual (CAC)</i>	49
4.6	ANÁLISES ESTÍSTICAS	51
4.7	DESENHOS EXPERIMENTAIS	52
4.7.1	<i>Bloco Experimental 1 - Categorização dos genes pertencentes à área genômica diferencial (AGD) através de análises de enriquecimento in silico</i> 53	
4.7.2	<i>Bloco Experimental 2 – Avaliação do perfil metabólico e memória de machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	54
4.7.3	<i>Bloco Experimental 3 - Perfil metabólico e memória de machos adultos das linhagens SHR e SLA16</i>	55
4.7.4	<i>Bloco Experimental 4 - Efeito da metformina no perfil metabólico e na memória de machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	56

5	RESULTADOS	58
5.1	BLOCO EXPERIMENTAL 1 - CATEGORIZAÇÃO DOS GENES PERTENCENTES À ÁREA GENÔMICA DIFERENCIAL (AGD) ATRAVÉS DE ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO <i>IN SILICO</i>	58
5.2	BLOCO EXPERIMENTAL 2 - AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA DE MACHOS JOVENS DAS LINHAGENS SHR E SLA16	60
5.2.1	<i>Curva de crescimento dos machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	60
5.2.2	<i>Habituação ao campo aberto em machos jovens SLA16 e SHR</i>	61
5.2.3	<i>Memória de curta e longa duração avaliada pelo teste de realocação de objeto em machos jovens nas linhagens SHR e SLA16</i>	63
5.2.4	<i>Memória de curto prazo avaliado pelo teste do labirinto em Y modificado em machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	64
5.2.5	<i>Aprendizado e memória espacial avaliado pelo teste do LAM em machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	66
5.2.6	<i>Avaliação da memória emocional através do teste do condicionamento aversivo contextual em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	67
5.2.7	<i>Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	68
5.2.8	<i>Níveis basais de parâmetros bioquímicos em machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	69
5.3	BLOCO EXPERIMENTAL 3 – PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA DE MACHOS ADULTOS DAS LINHAGENS SHR E SLA16	69
5.3.1	<i>Teste do campo aberto (CA) em machos adultos das linhagens SLA16 e SHR</i>	69

5.3.2 *Memória espacial de curta e longa duração em machos adultos das linhagens SHR e SLA16 avaliados pelo teste de realocação de objetos (TRO)* 71

5.3.3 *Memória de curto prazo avaliado pelo teste de labirinto em Y modificado, em machos adultos de 10 meses de idade, das linhagens SHR e SLA16* 72

5.3.4 *Aprendizagem e memória de longa duração de machos adultos SHR e SLA16 avaliados no labirinto aquático de Morris* 74

5.3.5 *Avaliação da memória emocional através do teste de condicionamento aversivo contextual em machos adultos das linhagens SHR e SLA16*..... 75

5.3.6 *Teste de tolerância oral à glicose (TOG) avaliado em machos adultos das linhagens SHR e SLA16* 77

5.3.7 *Níveis basais de parâmetros bioquímicos em machos adultos das linhagens SHR e SLA16*..... 77

5.4 BLOCO EXPERIMENTAL 4 – EFEITO DA METFORMINA NO PERFIL METABÓLICO E NA MEMÓRIA DE MACHOS JOVENS DAS LINHAGENS SHR E SLA16 78

5.4.1 *Efeito do tratamento com metformina 200 mg/kg/dia sobre a curva de crescimento em machos jovens das linhagens SHR e SLA16* 78

5.4.2 *Efeito do tratamento com metformina no teste do campo aberto (CA) em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16* 80

5.4.3 *Efeito do tratamento com metformina no teste de realocação de objetos (TRO) em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16* 80

5.4.4 *Efeito do tratamento prolongado da metformina na memória de curto prazo avaliado pelo teste de labirinto em Y modificado, em machos jovens das linhagens SHR e SLA16*..... 81

5.4.5 *Efeito da metformina no aprendizado e memória espacial nos machos das linhagens SHR e SLA16 avaliados no LAM*..... 82

5.4.6	<i>Efeito da metformina sobre a memória emocional de longa duração avaliada pelo medo condicionado</i>	<i>84</i>
5.4.7	<i>Efeito do tratamento com metformina no teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em machos jovens das linhagens SHR e SLA16.....</i>	<i>86</i>
5.4.8	<i>Efeito da metformina na glicemia e nos níveis de colesterol total e triglicérides séricos em machos jovens das linhagens SHR e SLA16</i>	<i>88</i>
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÃO.....	101
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O cérebro dos mamíferos exige elevadas quantidades de energia para realizar processos essenciais como, por exemplo, a sínteses de neurotransmissores e a manutenção dos gradientes de íons relacionados com processos de sinalização (HARRIS *et al.*, 2012). Estima-se que para manter seu funcionamento são necessárias 25% da glicose e 20% do oxigênio de todo o organismo, onde a glicose é utilizada como a principal fonte de energia. O metabolismo de este açúcar provê o combustível necessário para a geração de ATP (adenosina trifosfato), a molécula energética base para a manutenção de funções das células neurais e não neurais. Uma fina regulação do metabolismo glicêmico é essencial para o ótimo funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (MERGENTHALER *et al.*, 2013; BELANGER *et al.*, 2011).

O balanço energético do SNC é resultado de uma intensa coordenação entre os neurônios, astrócitos e oligodendrócitos no cérebro, e as células epiteliais de vasos sanguíneos cerebrais que formam a barreira hemato-encefálica (BHE) (NAGALSKI *et al.*, 2016). Devido à permeabilidade restritiva da BHE e às limitadas reservas locais de carboidratos cerebrais (reserva de glicogênio principalmente em astrócitos), o SNC precisa, para funcionar corretamente, um fornecimento constante de glicose e outros nutrientes, que depende fortemente da expressão de transportadores de glicose na BHE (SHAH, DESILVA & ABBRUSCATO, 2012).

Existem vários transportadores de glicose no SNC, são principalmente de dois tipos. O primeiro, transportador de glicose sódio-independente (GLUT; transporte facilitado), que possui 12 isoformas identificadas, entre elas se encontram: o transportador saturável independente de insulina tipo 1 (GLUT-1) presente nas células gliais e nas células endoteliais vasculares da BHE, e o transportador de glicose independente de insulina tipo 3 (GLUT-3), que é utilizado pelos neurônios e possui uma maior afinidade pela glicose (BONDY, LEE & ZHOU, 1992). O segundo tipo, o transportador de glicose sódio-dependente (SGLT; transporte ativo secundário), o qual possui 6 isoformas, entre elas SGLT1 e SGLT6 encontradas nas células neuronais (SHAH, DESILVA & ABBRUSCATO, 2012).

Algumas células do SNC utilizam outros tipos de fontes de energia. Por exemplo, em comparação com as células da glia, os neurônios possuem um elevado metabolismo oxidativo, o qual é caracterizado por uma taxa alta de consumo de glicose, e devido à baixa disponibilidade deste açúcar no SNC, precisam de outra fonte de energia (HARRIS *et al.*, 2012). A maior parte da glicose que entra na via glicolítica dos astrócitos é liberada no espaço extracelular como lactato. O lactato pode ainda ser utilizado, pelos neurônios, como uma fonte de energia. Além disso, devido à capacidade limitada de entrada de glicose dos axônios mielinizados no compartimento axonal, estes podem utilizar como fonte de energia o lactato liberado pelos oligodendrócitos (FÜNFSCHILLING *et al.*, 2012).

Em relação aos lipídeos, os triglicerídeos formam parte das membranas celulares e estão envolvidos em vias de sinalização no SNC que sugerem estar envolvidas na patogênese da depressão e distúrbios emocionais (MÜLLER *et al.*, 2015). O colesterol não esterificado no cérebro representa a quarta parte do colesterol presente em todo o corpo, sendo vital para a função cerebral normal. Encontra-se distribuído em todo o cérebro, envolvido na sinalização, plasticidade sináptica, memória e aprendizagem (SCHREURS, 2010; DIETSCHY & TURLEY 2001). A fonte de colesterol no SNC vem quase inteiramente da síntese *in situ*, e há atualmente pouca evidência para a transferência líquida do colesterol do plasma ao cérebro (DIETSCHY & TURLEY, 2001). Desde o desenvolvimento até na etapa adulta, este é sintetizado principalmente nos astrócitos, células gliais e em menor quantidade nos neurônios, onde este último precisa de colesterol para a síntese da superfície celular dos axônios (dendritos e sinapses), incluso as vesículas sinápticas, a bainha de mielina e como precursor de hormônios esteroides (ZHANG & LIU, 2015).

1.2 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE GLICOSE

A insulina é um hormônio peptídico, secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas de *Langerhans*, que mantem os níveis normais de glicose no sangue. Este atua, facilitando a captação de glicose celular, regulando o metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de proteínas. Além disso, promovendo a divisão celular e o crescimento através de seus efeitos mitogênicos (WILCOX, 2005).

Uma das principais funções da insulina é o controle da homeostase periférica da glicose. Embora a sua função no cérebro ainda

não está bem elucidada, a presença de receptores de insulina (RI) e suas vias de transdução no SNC, sugerem a sensibilidade deste órgão à insulina.

Em humanos, existem duas isoformas de RI gerados por um *splicing* alternativo. O RI-B, que é o mais cumprido e predominante nos tecidos periféricos sensíveis à insulina, fígado, tecido adiposo e músculo esquelético, e o RI-A, presente no cérebro (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014). Os RIs no cérebro possuem efeitos fisiológicos importantes sobre este órgão, como desenvolvimento neuronal, glicoregulação, comportamento alimentar e peso corporal, bem como processos cognitivos, incluindo atenção, aprendizado e memória (DERAKHSHAN & TOTH, 2013).

A insulina apresenta duas possíveis fontes no SNC. Uma de origem periférica, por secreção das células β do pâncreas e passagem através da BHE, e a outra de origem central, que sugere uma produção local no cérebro (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014). Outros estudos estabelecem que o conteúdo de insulina no cérebro seja independente da insulina periférica, em outras palavras: os níveis de insulina circulantes não afetam a concentração de insulina no cérebro (HAVRANKOVA, ROTH & BROWNSTEIN, 1979).

O RNAm da insulina foi localizado por hibridização *in situ* nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, no giro-denteado e na camada de células granulares dos bulbos olfatórios do cérebro (DEVASKAR *et al.*, 1994). Diferenças na atividade do sistema transportador da BHE podem estar respondendo às diferenças regionais na permeabilidade à insulina, registrando valores mais altos na ponte de *Varólio*, medula e hipotálamo, e menores no córtex occipital e tálamo (BANKS & KASTIN, 1998). Além disso, a concentração de peptídeo C, obtido durante a síntese da insulina, diminui após 72 h de jejum e aumenta após administração oral de glicose, tanto no plasma, quanto no hipotálamo (JEZOVA, VIGAS & SADLON, 1985). Em ratos com diabetes do tipo 1, o tratamento com peptídeo C impede parcialmente a morte celular programada nos neurônios do hipocampo (LI, ZHANG & SIMA, 2002).

Por outro lado, a enzima degradante de insulina (IDE) está presente em várias regiões do cérebro como áreas corticais, hipocampo, cerebelo e tronco cerebral. Esta se encontra nos neurônios (em maior quantidade), oligodendrócitos, plexo coróide e algumas células endoteliais dos vasos sanguíneos (BERNSTEIN *et al.*, 2008). A IDE é regulada pela exposição a baixos níveis de peptídeo β -amilóide (A- β), que pode ser um alvo terapêutico importante devido ao seu papel na

degradação de A- β e outras substâncias (BERNSTEIN *et al.*, 2008). O hipocampo possui um papel fundamental na formação das memórias espacial e aversiva de curta e longa duração. Tanto em humanos como em roedores, a memória espacial é dependente do hipocampo e se encontra extensamente caracterizada em ambas as espécies. A natureza da função espacial das células do hipocampo foi confirmada, a partir da tarefa avaliada no labirinto de oito braços de *Olton*, que parece ser um teste sensível do sistema de mapeamento hipocampal (O'KEEFE e NADEL, 1978).

1.3 ALTERAÇÕES DO METABOLISMO NO SNC

Desequilíbrios no metabolismo da glicose e lipídeos causam graves consequências sobre o SNC. Estes poderiam até mesmo, em tese, participar da gênese de distúrbios comportamentais leves, depressão, mania e doenças neurodegenerativas. Porém, não está bem estabelecido como uma desregulação no metabolismo de carboidratos ou lipídeos podem exercer estes efeitos negativos sobre o funcionamento normal do cérebro (NAGALSKI *et al.*, 2016; DI PAOLO & KIM, 2011).

Existem evidências de que o metabolismo cerebral da glicose tem um papel fundamental na síndrome metabólica. Um defeito na homeostase da glicose no SNC possui um enorme impacto no aumento dos níveis das lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) plasmático, que poderiam explicar os múltiplos componentes da síndrome metabólica, incluindo a obesidade, resistência insulina hepática e hipertrigliceridemia (LAM *et al.*, 2007). Além disso, os níveis elevados de triglicerídeos em pacientes com Diabetes tipo 2 (DT2) estão associados com a diminuição do desempenho em tarefas cognitivas (PERLMUTER *et al.*, 1988). A hipertrigliceridemia pode produzir prejuízos na memória de longo prazo associado com a manutenção de N-Metil D-Aspartato (NMDA) e com o estresse oxidativo no cérebro (FARR *et al.*, 2008).

Por outro lado, a hiperglicemia crônica pode comprometer progressivamente as células do endotélio vascular, causando falhas na micro e macro circulação, que são observadas regularmente no cérebro de pacientes com DT2 (VINIK & FLEMMER, 2002), e conduzir os neurônios à morte (TENNANT & BROWN, 2013). Esta é provavelmente a razão pela qual as diferentes formas de demência como

exemplos, a demência vascular, a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) podem ser mais frequentes em pacientes diabéticos (CUKIERMAN *et al.*, 2005).

Evidências indicam que nos estágios pré-clínicos da DA, ocorre uma grave redução da taxa metabólica cerebral da glicose, a qual pode prejudicar o microambiente oxidativo geral dos neurônios durante a progressão da doença e, por conseguinte, levar a alterações nas enzimas mitocondriais e no metabolismo da glicose no tecido cerebral dos pacientes (MOSCONI *et al.*, 2008).

Os efeitos da hiperglicemia crônica sobre a cognição são mais acentuados do que os efeitos demonstrados na hiperglicemia aguda. Em 2009, Cukierman-Yaffe e colaboradores encontraram uma associação entre o declínio cognitivo e controle glicêmico inadequado em pacientes com DT2. Este resultado sugere que níveis altos de hemoglobina glicosilada, em pacientes com DT2, estão inversamente relacionados ao desempenho em tarefas que avaliam a aprendizagem, raciocínio e memória. No entanto, é importante salientar que as diferenças na função cognitiva foram de ligeiras a moderadas, provavelmente associada às complicações relacionadas com a hiperglicemia, atrofia do cérebro ou presença de complicações microvasculares.

A hiperglicemia crônica pode causar a glicosilação de proteínas, resultando na desregulação da transdução do sinal e da transcrição. Além disso, os níveis elevados de glicose extracelular aumentam a pressão osmótica que leva a água para fora das células causando uma desidratação. Isto pode conduzir a um estresse oxidativo, que levaria a uma deterioração do tecido representando um perigo para as células (TOMLINSON & GARDINER, 2008). Uma das razões para este possível estado de estresse oxidativo é que o excesso de glicose, que entra na via do poliál, seja metabolizado em sorbitol, utilizando NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) como redutor e conseqüentemente, os níveis de NADPH diminuem significativamente, prejudicando a síntese do antioxidante glutatona. Isto conduz ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), ao dano mitocondrial e conseqüentemente, à morte celular. Em paralelo, o sorbitol pode interagir espontaneamente com as proteínas produzindo produtos de glicação, cujos níveis excessivos são prejudiciais para as células por vários mecanismos, incluindo o processo inflamatório desencadeado (OTT *et al.*, 2014).

O acúmulo das EROs podem levar a várias condições patológicas no cérebro incluindo as doenças neurodegenerativas, que podem estar relacionadas com uma disfunção da mitocôndria cerebral (WANG *et al.*, 2010). Além disso, o prejuízo na aprendizagem e memória está associado ao prejuízo da neurogênese hipocampal, ao aumento dos níveis de EROs no cérebro, a redução da plasticidade sináptica no hipocampo e a disfunção da mitocôndria cerebral (ECKERT *et al.*, 2003; STRANAHAN *et al.*, 2008).

Alterações na ação da insulina no cérebro podem contribuir para a síndrome metabólica e para o desenvolvimento de distúrbios emocionais e doenças neurodegenerativas (KLEINRIDDERS *et al.*, 2014). Os receptores de insulina, assim como os receptores IGF-1 e suas cascatas de sinalizações, estão distribuídos por todo o cérebro. A insulina atua sobre esses receptores para modular o metabolismo periférico, inclusive a regulação do apetite, função reprodutora, temperatura corporal, gordura corporal, liberação de glicose hepática e resposta à hipoglicemia. A sinalização via insulina também modula a atividade de canais dos neurotransmissores, a síntese de colesterol cerebral e a função mitocondrial. A disfunção da ação da insulina no cérebro conduz ao prejuízo da função neuronal e da neurogênese. E finalmente, a sinalização da insulina modula a fosforilação da proteína Tau, um componente primário para o desenvolvimento da DA (KLEINRIDDERS *et al.*, 2014; **Figura 1**).

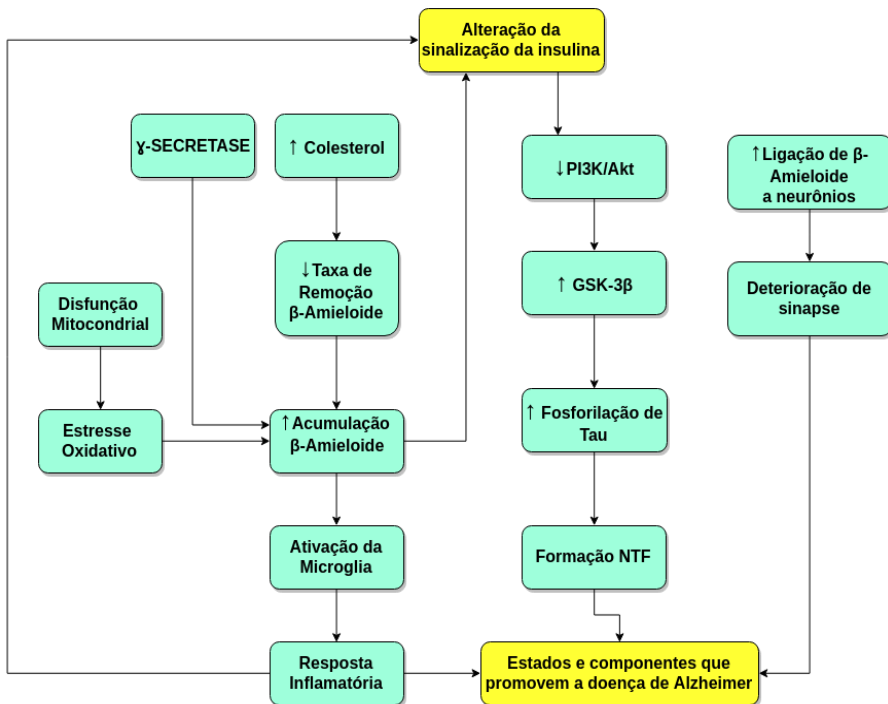


Figura 1 - Esquema dos prejuízos ocasionados pela alteração da sinalização de insulina e sua relação com as patogêneses da DA (Fonte: adaptado de BLÁZQUEZ *et al.*, 2014)

1.4 A INFLUÊNCIA DA IDADE NO PREJUÍZO COGNITIVO ASSOCIADO ÀS ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Os transtornos metabólicos estão associados com o risco de desenvolver prejuízos cognitivos ao longo da vida. Vários trabalhos, tanto em humanos como em animais, tem correlacionado os transtornos no metabolismo da glicose com o prejuízo na aprendizagem e na memória. Um estudo de coorte prospectivo realizado em humanos com transtornos metabólicos de glicose revelou que os pacientes com pré-diabetes ou com diabetes não controlada, após duas décadas, possuem um maior risco em desenvolver prejuízo cognitivo. Esta associação é mais forte quanto maior é a duração da diabetes, sugerindo que uma prevenção primária da diabetes ou controle de glicose durante a meia-idade (48-67 anos) pode prever o prejuízo cognitivo na velhice (RAWLINGS *et al.*, 2014). Além disso, níveis de colesterol alto na

meia-idade, ou a diminuição dos níveis de colesterol no início da velhice está relacionado com o risco de prejuízos cognitivos, DA e demência (ANSTEY *et al.*, 2008).

1.5 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DOS TRANSTORNOS METABÓLICOS E PREJUÍZOS COGNITIVOS

Vários modelos em roedores com transtornos metabólicos têm sido propostos para o estudo de patologias relacionadas a distúrbios emocionais, o prejuízo na memória e as doenças neurodegenerativas. Como exemplos, animais com mutações na via de sinalização de leptina, tais como camundongos *ob/ob* ou *db/db*, os animais tratados com dietas ricas em conteúdo graxo e finalmente, o tratamento com estreptozotocina (STZ) intracerebroventricular (ICV) em roedores, podem todos induzir a resistência à insulina no cérebro (**Figura 2**). A deficiência da sinalização da insulina resulta em uma série de disfunções no cérebro, incluindo a agregação anormal de proteínas, assim como falhas e perda da função sináptica. Todas estas alterações são fatores centrais no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DA e a DP (GAO, LIU, LI & HÖLSCHER, 2013). O modelo farmacológico é o mais utilizado no estudo de transtornos metabólicos associados às doenças do SNC. Por exemplo, a administração de estreptozotocina intracerebral em ratos *Long Evans* é um modelo experimental mais utilizado para o estudo da DA. Neste modelo, a administração de T3D-959, um agonista PPAR- δ/γ (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor: delta/gamma*), corrige o déficit cognitivo induzido pela administração de estreptozotocina (DE LA MONTE *et al.*, 2016).

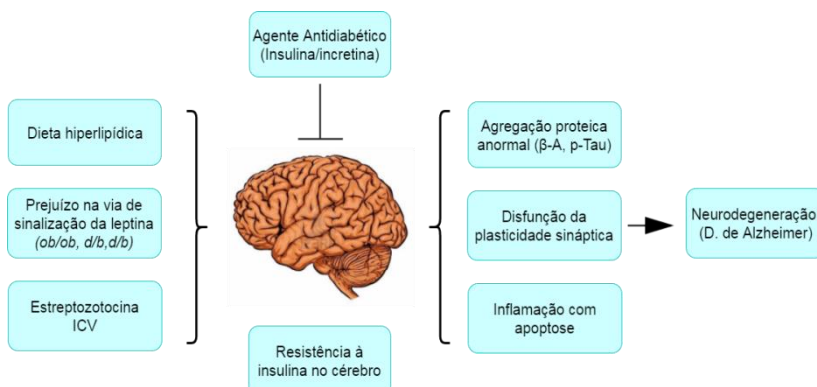


Figura 2 - Modelos animais para o estudo do prejuízo neurobiológico devido à insulina resistência a nível central (Fonte: modificado de GAO *et al.*, 2013)

1.6 A LINHAGEM DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSA

Em 1963, Okamoto e Aoki desenvolveram a linhagem de ratos espontaneamente hipertensa (SHR), a fim criar um modelo animal para o estudo da hipertensão. Esta linhagem possui anormalidades no metabolismo de lipídeos, especialmente na síntese de colesterol e níveis aumentados de ácidos graxos livres e triglicerídeos plasmáticos em comparação à linhagem *Wistar Kyoto* (WKY) (IRITANI *et al.*, 1977). Além disso, eles possuem anormalidades no metabolismo de glicose, e a presença de hiperglicemia e a hiperinsulinemia tem sugerido uma resistência da ação da insulina no nível dos tecidos periféricos (MONDON & REAVEN, 1988; GOUVEIA *et al.*, 2000). Os prejuízos cognitivos na linhagem SHR são acompanhados por disfunção central e periférica de insulina. Desta maneira, estes ratos têm sido sugeridos como um modelo de estudo da demência relacionada à insulina (GRÜNBLAT *et al.*, 2015).

Alguns estudos na literatura têm descrito uma correlação positiva entre o prejuízo na memória e a hipertensão em seres humanos (ELIAS *et al.*, 1987; FRANCESCHI *et al.*, 1982). Um estudo mais recente em pacientes com AD associou a hipertensão e a hipercolesterolemia com prejuízos funcionais da cognição (GOLDSTEIN *et al.*, 2008). A relação entre hipertensão e função cognitiva ainda não é completamente entendida, e pode desempenhar

papéis diferentes de acordo com os tipos e estágios da demência. Flutuações na pressão arterial sistólica podem contribuir para o declínio cognitivo em pacientes com DA e podem representar um alvo terapêutico negligenciado (LATTANZI *et al.*, 2015).

Sendo assim, a hipertensão de meia-idade parece ser um parâmetro altamente preditivo de um prejuízo cognitivo subsequente (20 anos depois). E devido à produção de lesões cerebrovasculares focais e anormalidades da substância branca, ela pode contribuir para o desenvolvimento precoce de uma forma subclínica de DA (HANON & LEYS, 2002). Wyss e colaboradores (1992) sugerem a linhagem SHR como um modelo para o estudo de mecanismos envolvidos na disfunção cognitiva subjacente em pacientes hipertensos e de efeitos das drogas anti-hipertensivas.

Muitos outros fenótipos fisiológicos e patológicos, além da hipertensão, já foram estudados nos ratos SHR, inclusive sob o ponto de vista genético. Por exemplo, um estudo da sequência do genoma dos ratos SHR revelou que 688 genes se sobrepõem com regiões CNV (*copy numbers variants*), que estão associados a genes com funções imunológicas, neurológicas e mecânicas. Algumas análises de enriquecimento destes genes junto com fenótipos metabólicos, cardiovasculares e neurocomportamentais sugerem que eles poderiam estar relacionados com os fenótipos manifestos no SHR/Olalpcv e em outras sub-linhagens de ratos SHR (ATANUR *et al.*, 2010).

Em 1999, Aitman e colaboradores, mediante integração de expressões de *microarrays* e mapeamento por QTLs (do inglês *Quantitative trait locus*), identificaram o gene *Cd36* como responsável de insulino-resistência que leva a um defeito no metabolismo de ácidos graxos, glicose e hipertensão, na linhagem SHR. Além disso, foi encontrada uma deleção intrônica do gene *Echdc2* nos ratos SHR, produto da catálise do segundo passo da beta-oxidação do metabolismo dos ácidos graxos (ATANUR *et al.*, 2010).

Em comparação à linhagem WKY, o SHR mostra uma baixa habilidade de aprendizagem nos testes de campo aberto e esQUIVA passiva (KNARDAHL *et al.*, 1979a; KNARDAHL *et al.*, 1979b). Pesquisas também relatam que os ratos machos SHR possuem um prejuízo na aprendizagem e na memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris (WYSS *et al.*, 2000). Além disso, os ratos SHR de 12 meses de idade apresentam o aprendizado e a memória comprometidos

no teste de labirinto radial. Porém, uma terapia anti-hipertensiva (captopril) pode prevenir este prejuízo (WYSS *et al*, 1992). O desenvolvimento da hipertensão e a idade nos SHR estão correlacionados com altos níveis de atividades e prejuízo no aprendizado e memória (MENESES *et al*, 1996).

1.7. A LINHAGEM CONGÊNICA SLA16

Duas linhagens de ratos distintas que são submetidas às mesmas condições ambientais, tratamentos farmacológicos ou estressores podem diferir ou até possuir diferenças contrastantes que são de origem exclusivamente genética (DE MEDEIROS, 2012). Em 1997, Ramos e colaboradores observaram um comportamento contrastante relacionado à emocionalidade entre as linhagens SHR e LEW, onde a linhagem LEW apresentou um perfil mais “ansioso” frente a estímulos aversivos de diversos testes. Conseqüentemente estas linhagens foram propostas como modelos para o estudo dos mecanismos neurobiológicos subsequentes aos transtornos de emocionalidade. Posteriormente foram realizadas análises de *loci* para características quantitativas nestas duas linhagens, onde foi identificado, no cromossomo 4, o primeiro QTL (do inglês *Quantitative trait locus*) relacionado a emocionalidade em ratos, que afetou a locomoção central no teste do campo aberto (CA), um índice experimental de ansiedade (RAMOS *et al*, 1999).

Este QTL, denominado *Anxrr16* (do inglês *Anxiety related response QTL16*), foi confirmado nos descendentes do cruzamento entre LEW e SHR. Observou-se um efeito contra-intuitivo, devido a que os descendentes cujos alelos pertenceram à linhagem mais ansiosa (LEW), apresentaram um perfil menos ansioso na F2 (IZÍDIO *et al*, 2011).

Para estudar o efeito do QTL *Anxrr16* no cromossomo 4, foi desenvolvida a linhagem congênica SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*). Criada a partir de retrocruzamentos dirigidos entre duas linhagens isogênicas, a LEW, doadora da área genômica diferencial (AGD), e a SHR, linhagem receptora (**Figura 3**), com a finalidade de avaliar os a influencia da AGD nos comportamentos de ansiedade/emocionalidade e identificar os mecanismos moleculares envolvidos na emocionalidade (DE MEDEIROS *et al.*, 2014).

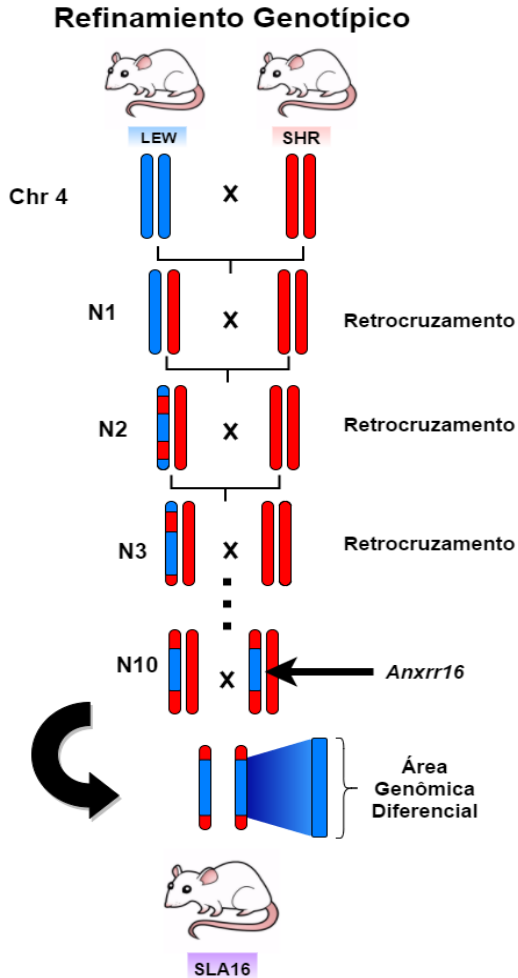


Figura 3 - Construção da linhagem congênica SLA16 e localização do QTL *Anxrr16* (Fonte: modificado de DE MEDEIROS *et al.*, 2014).

A linhagem SLA16 difere da SHR em vários comportamentos relacionados à emocionalidade. Foi observado que os genes contidos na AGD aparentemente influenciam na ansiedade e aprendizagem de comportamentos relacionados a um conteúdo emocional (ANSELMINI *et al.*, 2016). A AGD tem aproximadamente 1.100 genes e se sobrepõe com QTLs relacionados com imunidade, metabolismo, memória, pressão arterial e outros fenótipos (RGD, 2016).

Estes estudos sugerem que a AGD pode possuir um efeito pleiotrópico, que não somente influencia a reatividade emocional, mas também o consumo de álcool e potencialmente outros fenótipos relacionados à emocionalidade e ao estresse (DE MEDEIROS *et al.*, 2014).

1.8. A METFORMINA E O TRANSTORNO METABÓLICO DA GLICOSE

A metformina (N-1,1-dimetilguanidina) é um fármaco utilizada amplamente para o tratamento da DT2. Ela entra na célula hepática através de transportadores do tipo SLC22A1, diminuindo a produção da glicose hepática e aumentando a sensibilidade à insulina, principalmente através da inibição suave e transitória do complexo mitocondrial da cadeia respiratória 1 (VIOLLET *et al.*, 2012). A inibição resultante do *complexo 1* reduz os níveis de ATP e consequentemente produz acumulação de AMP. Este último se une ao *sítio P* da adenilato ciclase do receptor de glucagon, e inibe sua atividade, levando à redução da síntese de AMPc e, consequentemente, à supressão da gliconeogênese. Além disso, a diminuição resultante do estado energético do fígado ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), um sensor metabólico celular, que suprime o metabolismo de ácidos graxos e melhora a função do receptor de insulina (PERNICOVA & KORBONITS 2014). Possui efeitos anti-inflamatórios na periferia e no nível central (LABUZEK *et al.*, 2010). Tem uma alta absorção por via oral: uma dose de 100 mg/kg via oral pode ser absorvida em ratos em até 96%. A biodisponibilidade absoluta oral em ratos é 30% devido principalmente ao efeito do metabolismo de primeira passagem gastrointestinal (CHOI, KIM & LEE; 2006). Atravessa rapidamente a BHE e se acumula em diferentes estruturas do SNC, como: glândula pituitária, bulbo olfatório, hipotálamo, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex frontal (LABUZEK *et al.*, 2010).

A metformina prevê a resistência à insulina produzida por uma dieta com alto conteúdo graxo de longa duração aprimorando os parâmetros metabólicos, diminuindo os níveis de estresse oxidativo periférico e central e melhorando o comportamento de aprendizado (PINTANA *et al.*, 2012). Além disso, melhora a aprendizagem espacial em camundongos e promove a neurogênese, ativando a via atípica de PKC/CBP em células-tronco neurais adultas (POTTS & LIM, 2012).

Esta droga também, previne o prejuízo cognitivo e danos cerebrais induzidos pela cisplatina em camundongos (ZHOU *et al.*, 2016) e reduz a neuroinflamação, diminui a perda de neurônios no hipocampo e melhora a memória de curto prazo em camundongos diabéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A metformina atenua significativamente a condição resistente à insulina em ratos Wistar tratados com uma dieta com alto conteúdo graxo (HFD). Ela melhora os parâmetros metabólicos, diminui os níveis de estresse oxidativo periférico e cerebral e melhora o comportamento de aprendizagem, em comparação com o grupo tratado com veículo. Além disso, impede completamente a disfunção mitocondrial cerebral causada pelo consumo de HFD em longo prazo. Sugerindo que a metformina efetivamente melhora a sensibilidade periférica à insulina, evita a disfunção mitocondrial do cérebro e restaura completamente o comportamento de aprendizagem (PINTANA *et al.*, 2012).

2. HIPÓTESE PRINCIPAL DO ESTUDO

A área genômica diferencial (AGD) possui gene (s) que prejudicam o metabolismo de carboidratos e as tarefas de aprendizado/memória relacionados à idade das linhagens SHR e SLA16.

3. OBJETIVOS

3.1.1 *Objetivo geral*

Avaliar a influência da AGD no metabolismo da glicose e comportamentos relacionados ao aprendizado/memória em ratos jovens e adultos das linhagens SHR e SLA16.

3.1.2 *Objetivos específicos*

- Categorizar a lista de genes pertencentes à AGD em termos de vias metabólicas e neurobiológicas através de análises de enriquecimentos gênicos *in silico* (Bloco experimental 1);
- Caracterizar a memória espacial e o perfil metabólico em ratos jovens das linhagens SHR e SLA16 (Bloco experimental 2);
- Caracterizar a memória espacial e o perfil metabólico em ratos adultos das linhagens SHR e SLA16 (Bloco experimental 3);
- Determinar os efeitos do tratamento com metformina sobre a memória espacial e perfil metabólico das linhagens SHR e SLA16 (Bloco experimental 4).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos experimentais realizados no presente trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal local (CEUA/UFSC), sob o protocolo N° PP00656 (CEUA/UFSC). O protocolo foi desenhado com o fim de minimizar os procedimentos que envolvam estresse, dor e desconforto, nos ratos, durante nos experimentos. O número de animais utilizados por grupo experimental foi o mínimo para a obtenção de análise estatística fidedigna.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos jovens (2 meses de idade) e adultos (10 meses de idade) da linhagem isogênica SHR/NCrAnra (SHR) e congênica SLA16, produzidos por sistema de acasalamento irmão/irmão, no biotério do Laboratório de Genética do Comportamento (LGC-UFSC). Os animais foram desmamados com 28 dias de idade e separados por sexo e mantidos em gaiolas de plástico coletivas (cinco ratos/gaiola). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h (ciclo claro das 07 h até 19 h), com água e comida *ad libitum* e temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.3 DROGAS

A dose utilizada de 200 mg/Kg/dia via oral de metformina cloridrato foi baseada em trabalhos prévios da literatura (GHADMEZHAD *et al.*, 2016; CAI *et al.*, 2016; CHOI, KIM & LEE, 2006).

- Cloridrato de metformina, (ABHILASH CHEMICALS, certificado de análise em **anexo 1**) concentração de 200 mg/mL;
- A solução controle utilizada (veículo) foi água deionizada em dose de 0,1 mL/100g provida pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMED) da USFC.

4.4 TESTES METABOLICOS

4.4.1 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

Para avaliar a resposta das linhagens ao teste tolerância oral à glicose, os ratos permaneceram em jejum por um período de 5 horas prévio ao teste, segundo o protocolo de Mondon e Reaven (1988). A glicose sanguínea foi mensurada em condições basais e 15, 30, 60 e 120 minutos após administração por via oral (por gavagem) de uma dose de 1,5 g/kg glicose (**Figura 4**). Amostras de sangue foram extraídas da extremidade da cauda e foram analisadas através de um glicômetro (*G-Tech Free 1*; sistema *No Code*, método da enzima glicose oxidase; faixa de medidas de 10~600 mg/dL de glicose).

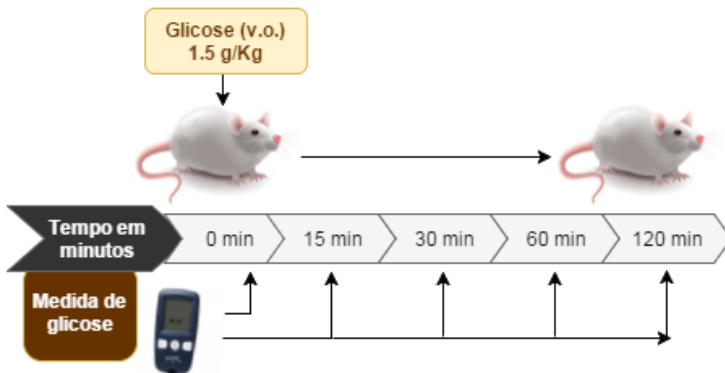


Figura 4 - Desenho experimental aplicado no TTOG (Fonte: desenho próprio do autor - www.draw.io).

4.4.2 Análise bioquímica de lipídeos séricos

Para avaliar os valores basais de triglicerídeos e colesterol total no sangue das linhagens SHR e SLA16, após dos dias de finalizarem os testes comportamentais, os animais foram colocados em jejum por 2 horas e amostras de sangue foram coletadas para segundo o protocolo descrito por Iritani e colaboradores (1977). A coleta de amostra de sangue e eutanásia foram realizado baixo anestesia com cetamina/xilazina, em dose de 0,4/0,2 mL/Kg via i.p., por punção cardíaca e posterior decapitação. No caso grupo experimental que recebeu tratamento metformina, ao fim de evitar a inferência da

anestesia no tratamento, os animais foram anestesiados em câmara de isoflurano a 5 %, e eutanasiados por decapitação. As amostras de sangue foram coletadas e depositadas em banho de gelo para reduzir atividade metabólica. Seguidamente foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos, e o soro foi separado para posterior análise bioquímica. Os valores de colesterol total e triglicérides foram mensurados pelo método espectrofotométrico utilizando os kits de reagentes para análises bioquímicas da marca Labtest®.

4.4.3 Curva de crescimento

O crescimento dos machos jovens foi monitorado pelo registro semanal do peso corporal ao longo dos experimentos (no período de 8 até 13 semanas de idade). Para isso, utilizou-se uma balança da marca digital “*Electronic Kitchen Scale*” modelo SF - 400 com precisão de 5.000 gramas \pm 1g. Com o objetivo de evitar a fuga dos animais durante a pesagem, os mesmos foram colocados dentro de um frasco plástico previamente tarado na balança. O peso em gramas foi registrado quando o animal estava sem movimentos e com as quatro patas apoiadas na superfície.

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.5.1 Campo Aberto (CA)

O campo aberto foi utilizado para avaliar o processo de aprendizado não associativo, através da habituação ao um ambiente novo, a atividade exploratória e a locomoção. Originalmente descrito por Calvin Hall em 1934, este aparato consiste em uma caixa de madeira coberta com fórmica impermeável cor cinza, que possui uma área de 100 x 100 cm com paredes de 40 cm de altura e pistas visuais na sala de teste (**Figura 5**). O animal foi colocado no centro do CA e a exploração do aparato foi registrada por uma vídeo-câmera durante 15 min. O aparato foi limpo com álcool 10% entre um animal e outro. O experimento foi conduzido sob uma lâmpada de luz vermelha (12 lux).

Os parâmetros comportamentais de distância percorrida total e central, e tempo gasto no centro do CA foram obtidos através de análise pelo software ANY-maze™. O ato de levantar as duas patas dianteiras

durante os primeiros 5 minutos do teste foi quantificado por um observador treinado.

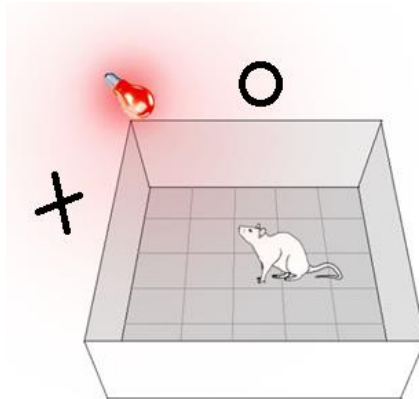


Figura 5 - Representação do aparato utilizado no teste do Campo Aberto (Fonte: desenho próprio do autor – *Software* Adobe Photoshop CS5).

4.5.2 Teste de Realocação de Objetos (TRO)

O teste de realocação de objetos (TRO) foi proposto inicialmente por Ennaceur e colaboradores (1997) e baseia-se no instinto inato dos roedores em preferir explorar o novo, que leva os animais a reconhecer seu ambiente, discriminando aquilo que é novo. Esta avaliação comportamental foi realizada também no CA, 24 horas após da habituação.

O TRO foi realizado em três sessões: No dia 1 a familiarização e o teste para avaliar memória de curta duração (Teste 1) e, no dia 2, o teste para avaliar memória de longa duração (Teste 2) com as mesmas pistas visuais na sala da sessão durante todas as sessões do TRO (**Figura 6**). A familiarização consiste em expor o animal durante 5 minutos a dois objetos idênticos dispostos em cantos opostos a 10 cm das paredes do aparato e 70 cm de distância entre eles. Uma hora e meia após a familiarização foi realizado o Teste 1, onde um dos objetos é realocado para o canto oposto e os animais reexpostos ao aparato durante 5 minutos. O teste 2 foi realizado 24 h após a familiarização, onde o objeto foi realocado para o canto restante, e o animal foi avaliado novamente por 5 minutos. Os objetos utilizados foram duas garrafas de

plástico verdes com 5,5 cm de altura. Em todas as sessões o tempo de exploração dos objetos foi registrado por um observador treinado e “cego” em relação aos grupos. A exploração foi definida pela direção do nariz para o objeto a uma distância inferior a 1 cm e tocar o objeto com o nariz ou patas dianteiras.

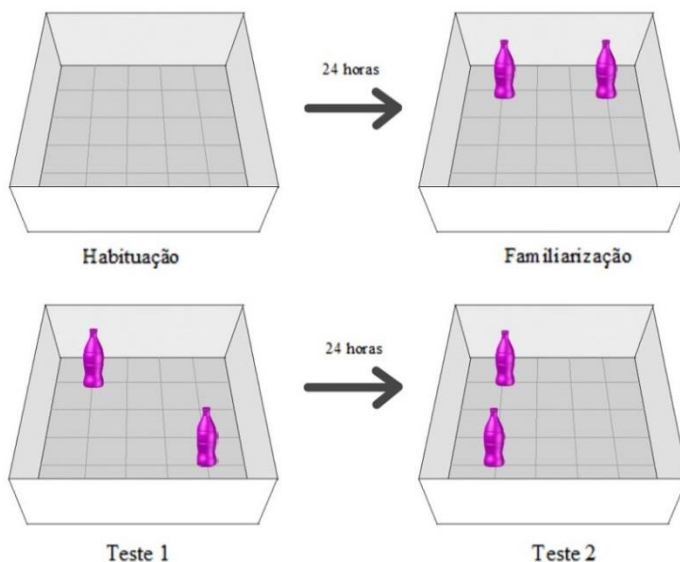


Figura 6 - Desenho experimental do teste de realocação de objetos e localização dos objetos no campo aberto (Fonte: desenho do autor – *Software Adobe Photoshop CS5*).

4.5.3 Teste do Labirinto em Y modificado (TLY)

O Teste do Labirinto em Y modificado é utilizado para avaliar memória espacial de curta duração em roedores e baseia-se na preferência dos roedores por explorar áreas que eles não tenham explorado previamente (DELLU *et al.*, 1997). O aparato consiste de três braços idênticos (50 cm comprimento \times 10 cm largura \times 40 cm altura) em um ângulo de 120° entre si, fabricados com madeira impermeável na cor cinza e com uma porta removível no início de cada braço (**Figura 7**).

O TLY foi realizado em duas etapas (treino e teste) de 5 minutos cada, separadas por um intervalo de 120 minutos. Durante a

sessão de treino, o braço “novo” foi bloqueado por uma porta removível e os animais foram colocados no final do braço “início” com a face em direção ao centro do aparato. Na sessão de teste, a porta removível foi retirada e o animal foi novamente colocado no braço “início”. O número de entradas e o tempo de permanência em cada um dos braços foram registrados utilizando o *software* ANY-maze™. Os resultados foram expressos como porcentagem de entradas e tempo de permanência no braço novo em relação aos outros braços (SOARES *et al.*, 2013). Os experimentos foram conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade – cor vermelha (12 lux).

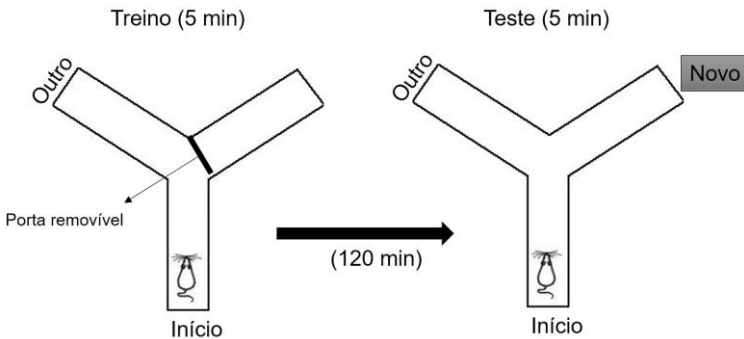


Figura 7 - Desenho experimental do teste do labirinto em Y modificado. (Fonte: Modificado de MATHEUS *et al.*, 2016)

4.5.4 Teste do Labirinto Aquático de Morris (LAM)

Ratos foram submetidos à versão de memória espacial de referência do labirinto aquático de Morris (LAM), previamente descrito por Richard Morris em 1984. O LAM é um teste robusto e confiável que está fortemente correlacionado com a plasticidade sináptica do hipocampo (VORHEES & WILLIAMS, 2006). Possui uma natureza relativamente aversiva, devido à aversão que apresenta o rato em escapar da água e sua motivação por encontrar a plataforma (HARRISON, HOSSEINI & MCDONALD, 2009).

O labirinto aquático de Morris consiste em um tanque circular (1.7 cm de diâmetro e 80 cm de altura) preenchido com água mantida aquecida a $25 \pm 2^\circ$ até a altura de 60 cm. O tanque encontrava-se localizado em uma sala contendo vários elementos visuais de destaque.

Uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm) foi colocada submersa a 1 cm da superfície e localizada em uma posição fixa (meio do quadrante sudeste) durante as sessões de treino (**Figura 8**). Os animais foram submetidos a 4 sessões de treinos por dia, com intervalos de 30 s entre cada sessão, durante 4 dias. Em cada sessão de treino os animais foram liberados de uma posição diferente do tanque, sempre com a face de frente para a parede do tanque. O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 1 minuto. Os animais que não encontravam a plataforma foram guiados até a mesma onde permaneciam por 10 s. O tempo de latência para o animal encontrar a plataforma foi registrado. 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste. Esta sessão de teste consistiu de uma única prova, onde a plataforma foi retirada e o animal deixado durante 60s no tanque. O tempo gasto no quadrante correto (onde a plataforma estava localizada na sessão de treinamento), bem como o número de vezes que o animal cruzou o local onde previamente estava a plataforma e o número de entradas no quadrante da plataforma foram analisados pelo *software* ANY-mazeTM.

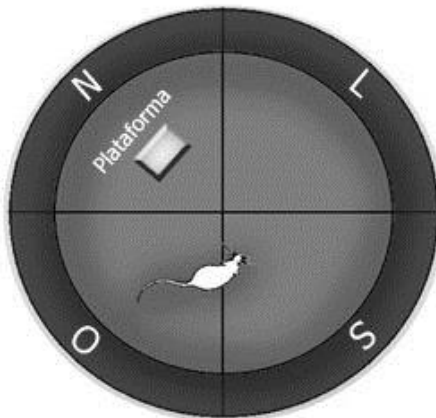


Figura 8 - Representação do aparato utilizado no teste de labirinto aquático de Morris (Fonte: desenho do autor – Software Adobe Photoshop CS5).

4.5.5 Condicionamento aversivo contextual (CAC)

Foi utilizado o protocolo de Ribeiro e colaboradores (2010), com modificações, para avaliar uma memória de longa duração e alto conteúdo emocional. Foi utilizada uma maior intensidade do choque, para aumentar o nível de congelamento exibido previamente no trabalho

de Anselmi e colaboradores (2016). Para validar o modelo experimental modificado, utilizaram-se dois grupos experimentais, os quais seguiram o mesmo protocolo, com a diferença foi que um dos grupos não recebeu choque (**Apêndice 1**). As condições ambientais foram de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e luz de 12-15 lux de intensidade. A limpeza da caixa foi realizada com álcool 10 % entre cada animal testado.

Durante o teste do condicionamento aversivo foi utilizado uma caixa de condicionamento com dimensões de 20 x 20 x 20 cm, com paredes laterais, teto e fundo de alumínio, e uma porta frontal de vidro. Os assoalhos das caixas era constituído por barras de metal de 5 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si. No dia 1 (habituação), os animais foram colocados individualmente na caixa por 3 min. No dia 2 (contextualização), o animal foi colocado na caixa, e depois de 30 segundos, foram realizados 3 choques (0.7 mV) nas patas, com duração de 3 segundos e com intervalo de 30 segundos. Após 30 segundos do último choque, o animal foi retirado da caixa. Após 5 dias da contextualização foi realizado o teste, colocando o animal na caixa por um período de 3 min (**Figura 9**). Os experimentos foram gravados por vídeo câmara, e o tempo de congelamento e as tentativas de escape foram avaliados por um observador treinado e “cego” aos grupos experimentais.



Figura 9 - Desenho experimental do condicionamento aversivo para avaliar memória emocional de longo prazo. (Fonte: modificado de <http://www.cns.nyu.edu/labs/ledouxlab/research.htm>)

4.6 ANÁLISES ESTÁSTICAS

Os resultados do primeiro bloco experimental foram analisados através do *software* Enrichr®, onde o teste exato de Fisher foi utilizado para estabelecer as relações significativas dos genes da AGD com as vias relacionadas a metabolismo e processos neurobiológicos, valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. O valor de *z-score* foi utilizado em conjunto com o valor de *p* para caracterizar a lista de genes da AGD.

Em relação aos blocos experimentais 2-4, os resultados foram expressos como a média aritmética \pm erro padrão médio. Os dados foram analisados utilizando o *software* STATISTICA® 7.0 (StatSoft Inc., USA). O Teste *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para verificar a normalidade dos dados analisados, $p > 0,20$ foi considerado como significativo. Para comparar resultados de testes de medidas únicas entre as linhagens, foi utilizado o teste- T simples não pareado. Para comparar as linhagens em testes que possuíam medidas repetidas no tempo (fator de repetição), as variáveis foram tratadas como independentes e avaliadas por ANOVA de uma via de medidas repetidas. Comparações nos experimentos que incluíram os fatores linhagem, tratamento e medidas no tempo (repetições) foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos em todos os experimentos realizados. Quando necessário, os resultados significativos da ANOVA foram subavaliados pelo teste de *post-hoc Newman-Keuls*. Os resultados estão apresentados em gráficos produzidos com o *software* GraphPad Prism® 5.0.

4.7 DESENHOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos realizados, nesta dissertação, foram desenvolvidos em quatro blocos experimentais, conforme descrito abaixo:

- **Bloco experimental 1:** Análise *in silico* da lista de genes presentes na área genômica diferencial (AGD) presente no cromossomo 4 da linhagem congênica SLA16, a fim de determinar a relação da mesma com vias e funções associadas a processos neurobiológicos e ao metabolismo.
- **Bloco experimental 2:** Baseado nos resultados proporcionados pela análise *in silico* foram realizadas avaliações comportamentais de aprendizado/memória e análises bioquímicas do perfil metabólico, em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16.
- **Bloco experimental 3:** Para determinar a influência da idade, foram realizadas avaliações comportamentais de aprendizado/memória e análises bioquímicas do perfil metabólico em ratos machos adultos das linhagens SHR e SLA16.
- **Bloco Experimental 4:** Baseado nos resultados da análise *in silico* e nos resultados do bloco experimental 2 e 3, avaliou-se o efeito da metformina sobre o perfil metabólico e aprendizado/memória, em ratos machos jovens, das linhagens SHR e SLA16.

4.7.1 Bloco Experimental 1 - Categorização dos genes pertencentes à área genômica diferencial (AGD) através de análises de enriquecimento *in silico*

Com o objetivo de categorizar o genes da AGD do cromossomo 4 do rato em vias relacionadas ao metabolismo e processos neurobiológicos, o **Bloco Experimental 1** foi desenvolvido como se segue:

Foram analisados 1.176 genes (~86Mb) da AGD, localizados no cromossomo 4 do rato entre as posições 84.916.565 pb e 171.202.478 pb, selecionados a partir do Banco de dados do Genoma do Rato (RGD) do NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica - Recuperado em novembro 2015, web site: <http://rgd.mcw.edu/>). Para avaliar esta lista de genes, foi realizada uma análise de enriquecimento *in silico*, utilizando o *software* Enrichr® (Ma'ayan Lab, EEUU). Este funciona comparando as listas de genes derivados dos experimentos, com listas gênicas existentes criadas a partir de resultados experimentais analisados, publicados e organizados em diferentes bibliotecas (CHEN *et al.*, 2013). As bibliotecas (ou bases de dados) utilizadas em esta análise, selecionadas a partir da característica “*Pathways*” (vias e funções), foram as seguintes: KEGG 2016, Wikipathways 2016, Reactome 2016 e Biocarta 2016.

O *Enrichr* utiliza três testes estatísticos para avaliar a significância estatística da sobreposição da lista de genes de interesse com as bases de dados: 1) o teste exato de Fisher, 2) o cálculo do valor de Z e uma combinação destes parâmetros, 3) o valor de C (valor combinado). O valor Z aplica uma correção ao valor de p fornecido pelo teste exato de Fisher, ao fim de corrigir possíveis resultados falsos positivos que podem gerar análises de grandes números de genes, por se sobreporem facilmente com as listas de genes das bases de dados presentes no *Enrichr*.

Valores de Z menores de -1.5 representam um desempenho melhor em termos de valor p . A pontuação combinada o valor de C [$\log(\text{valor } p) * \text{valor } Z$] serve para classificar termos, tendo em vista os valores de p e Z . Esta análise permitiu estabelecer as relações significativas entre os genes da AGD e funções e vias de interesse.

Foram utilizados os valores de p e Z para a seleção de vias e funções de interesse de estudo desta dissertação.

4.7.2 Bloco Experimental 2 – Avaliação do perfil metabólico e memória de machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Para avaliar a influência da AGD na memória e o perfil bioquímico foram utilizados machos jovens das linhagens SHR e SLA16 (n= 10 animais por grupo/linhagem) de 11 semanas de idade, mantidos segundo as condições do item 4.3. O crescimento dos animais foi monitorado pelo registro semanal do peso corporal ao longo dos experimentos, a partir das 8 semanas de idade até finalizarem os experimentos segundo o **item 4.4.4**.

Primeiramente, ao fim de avaliar o metabolismo glicêmico, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose (TTOG) conforme o descrito no **item 4.4.1**. Após dois dias, foram iniciados os testes comportamentais, descritos no **item 4.5.**, os quais foram executados na seguinte ordem, com intervalo de um dia entre testes:

-
1. Campo Aberto (CA)
 2. Teste de Realocação de Objetos (TRO)
 3. Labirinto em Y modificado (LYM)
 4. Labirinto aquático de Morris (LAM)
 5. Teste do condicionamento aversivo contextual (CAC)

Uma vez finalizados os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina 0,4/0,2 mL/Kg via i.p. para coletar amostras de sangue por punção cardíaca, com o fim de avaliar os níveis triglicéridos e colesterol total séricos, conforme descrito no **item 4.4.2.**, e imediatamente foram eutanasiados por decapitação.

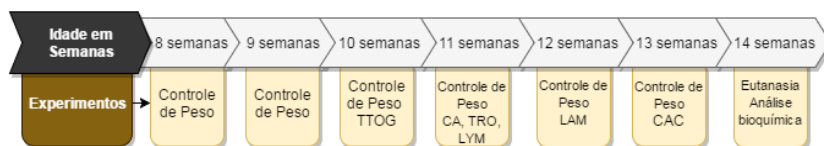


Figura 10 - Esquema representativo do bloco experimental 2: o peso corporal dos machos jovens das linhagens SHR e SLA16 foi monitorado, foram submetidos ao teste de tolerância oral a glicose (TTOG) e aos testes comportamentais de campo aberto (CA), teste de realocação de objetos (TRO), labirinto em Y modificado (LYM), labirinto aquático de Morris (LAM) e condicionamento aversivo contextual (CAC) e caixa metabólica. Após os testes comportamentais os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para posterior análise bioquímica (Fonte: desenho próprio do autor - www.draw.io).

4.7.3 Bloco Experimental 3 - Perfil metabólico e memória de machos adultos das linhagens SHR e SLA16

Para avaliar a influência da idade nas diferenças comportamentais de memória e o perfil metabólico das linhagens SHR e SLA16 ($n= 6$ animais por grupo/linhagem), foram utilizados machos adultos de 10 meses de idade (ANDREOLLO *et al.*, 2012).

Primeiramente, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose (TTOG), conforme o descrito no **item 4.4.1**. Após dois dias, foram iniciados os testes comportamentais, descritos no **item 4.5.**, os quais foram executados na seguinte ordem, com intervalo de um dia entre testes:

1. Campo Aberto (CA)
2. Teste de Realocação de Objetos (TRO)
3. Labirinto em Y modificado (LYM)
4. Labirinto aquático de Morris (LAM)
5. Teste do condicionamento aversivo contextual (CAC)

Uma vez finalizado os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina 0,4/0,2 mL/Kg via i.p. e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para avaliar os níveis triglicéridos e colesterol total por análise

bioquímica, conforme descrito no **item 4.4.2**, e imediatamente os animais foram eutanasiados por decapitação.

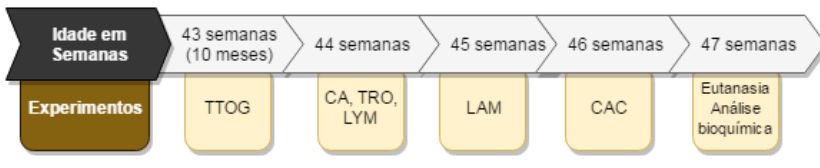


Figura 11 - Esquema representativo do bloco experimental 3: Ratos machos adultos, das linhagens SHR e SLA16, foram submetidos ao teste de tolerância oral a glicose (TTOG) e aos testes comportamentais de campo aberto (CA), teste de realocação de objetos (TRO), labirinto em Y modificado (LYM), labirinto aquático de Morris (LAM) e condicionamento aversivo contextual (CAC). Após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados e amostras de sangue foram coletadas para posterior análise bioquímica (Fonte: desenho próprio do autor - www.draw.io).

4.7.4 Bloco Experimental 4 - Efeito da metformina no perfil metabólico e na memória de machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Para avaliar o efeito do tratamento prolongado de metformina sobre o metabolismo e na memória, foram utilizados ratos machos jovens de 8 semanas de idade das linhagens SHR e SLA16, distribuídos aleatoriamente em grupos ($n = 5-7$ por grupo) que receberam o tratamento com o veículo (água deionizada 1 mL/Kg/dia via gavagem) ou a metformina (200 mg/Kg/dia via gavagem), durante 15 dias antes da realização dos testes comportamentais e prosseguiram até a finalização dos experimentos, totalizando de 40 dias de tratamento. O crescimento dos animais foi monitorado pelo registro semanal do peso corporal a partir das 8 semanas de idade até finalizarem os experimentos segundo o **item 4.4.4**. Os testes comportamentais, descritos no **item 4.5**, foram executados na seguinte ordem, com intervalo de um dia entre testes:

1. Campo Aberto (CA)
2. Teste de Realocação de Objetos (TRO)
3. Labirinto em Y modificado (LYM)
4. Labirinto aquático de Morris (LAM)
5. Teste do condicionamento aversivo contextual (CAC)

Um dia após os testes comportamentais foi realizado o TTOG em todos os grupos, conforme descrito no item 4.4.1. Devido à influência da anestesia cetamina/xilazina nos valores de séricos de triglicerídeos e colesterol (ÇAMKERTEN *et al.*, 2013) nos blocos 2 e 3, a anestesia este bloco experimental foi realizada numa câmara com isoflurano a 5% e imediatamente a eutanásia por decapitação. As amostras de sangue foram coletadas para avaliar os parâmetros bioquímicos conforme descrito no item 4.4.2.



Figura 12 - Esquema representativo do bloco experimental 4: Ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16 foram submetidos a um tratamento prolongado com metformina (200 mg/Kg via oral) ou controle (veículo). Após 15 dias os animais foram avaliados nos testes de campo aberto (CA), teste de realocação de objetos (TRO), labirinto em Y modificado (LYM), labirinto aquático de Morris (LAM) e condicionamento aversivo contextual (CAC). Seguidamente aos testes comportamentais os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para a análise bioquímica (Fonte: desenho próprio do autor – www.draw.io).

5. RESULTADOS

5.1 BLOCO EXPERIMENTAL 1 - CATEGORIZAÇÃO DOS GENES PERTENCENTES À ÁREA GENÔMICA DIFERENCIAL (AGD) ATRAVÉS DE ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO *IN SILICO*

A categorização dos genes do cromossomo 4 do rato, presentes na AGD, em vias relacionadas ao metabolismo e a processos neurobiológicos foi verificada através da análise bioinformática de enriquecimento. Esta foi realizada através do *software* Enrichr (último acesso: 13 de novembro de 2016) e revelou que a AGD possui genes relacionados significativamente com vias metabólicas da glicose, processos neurobiológicos, estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas. Estes resultados foram obtidos desde as bases de dados KEGG 2016, Wikipathways 2016 e Reactome 2016 (**Tabela 1**). Vias e funções com valores de $p < 0,05$ e valores de $z < -1,5$ foram consideradas significativas. Na base de dados Biocarta 2016 não foram encontradas vias do interesse de estudo para esta dissertação.

Tabela 1. Vias e genes, da AGD do cromossomo 4 do rato, associados à memória e ao metabolismo obtidos por análise *in silico* de enriquecimento de genes.

Base de dados	Vias		Valor de p	Valor de Z
KEGG 2016	Sinapse GABAérgica <i>sapiens_hsa04727</i>	<i>Homo</i>	0,020	-1,83
Wikipathways 2016	Danos oxidativos <i>musculus_WP1496</i>	<i>Mus</i>	0,009	-2,05
	Doença de Alzheimer <i>musculus_WP2075</i>	<i>Mus</i>	0,011	-1,97
	Glicólise e Gluconeogênese <i>sapiens_WP534</i>	<i>Homo</i>	0,025	-1,68
	Glicólise e gluconeogênese <i>musculus_WP157</i>	<i>Mus</i>	0,023	-1,67
	Receptores acoplados a proteína G, feromônio tipo C glutamato metabotrópico <i>Mus musculus_WP327</i>		0,017	-1,61
Reactome 2016	Transportador de neurotransmissor dependente de Na ⁺ /Cl ⁻ <i>sapiens_R-HSA-442660</i>	<i>Homo</i>	0,0004	-2,18
	Síntese de GABA, liberação, recaptação e degradação <i>sapiens_R-HSA-888590</i>	<i>Homo</i>	0,003	-2,14
	Via de sinalização CREB-Gastrina, via PKC e MAPK <i>sapiens_R-HSA-881907</i>	<i>Homo</i>	0,019	-2,48
	Glicólise <i>sapiens_R-HSA-70171</i>	<i>Homo</i>	0,018	-2,22

5.2. BLOCO EXPERIMENTAL 2 - AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA DE MACHOS JOVENS DAS LINHAGENS SHR E SLA16

5.2.1 Curva de crescimento dos machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Observou-se um aumento significativo do peso corporal ao longo das semanas (**Figura 13A**) e uma diferença entre as linhagens no ganho de peso corporal semanal (entre 8 e 13 semanas de idade) nos machos jovens SHR e SLA16 (**Figura 13B**). O Teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos dados de peso corporal monitorados nos grupos experimentais ($p > 0,20$).

A ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou diferença significativa no fator tempo nas duas linhagens [$F_{(5,90)}=436,44$; $p < 0,001$], indicando aumento de peso das linhagens durante o período de experimento (**Figura 13A**). Em relação ao ganho de peso semanal, representado por Δ (variação de peso semanal), a ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre os fatores tempo (repetição) e linhagem [$F_{(4,72)}=4,087$; $p < 0,01$]. O teste de *post-hoc Newman Keuls* indicou que nas semanas 9 e 11, houve ganho de peso significativamente maior para a linhagem SHR, em relação a SLA16 (**Figura 13B**).

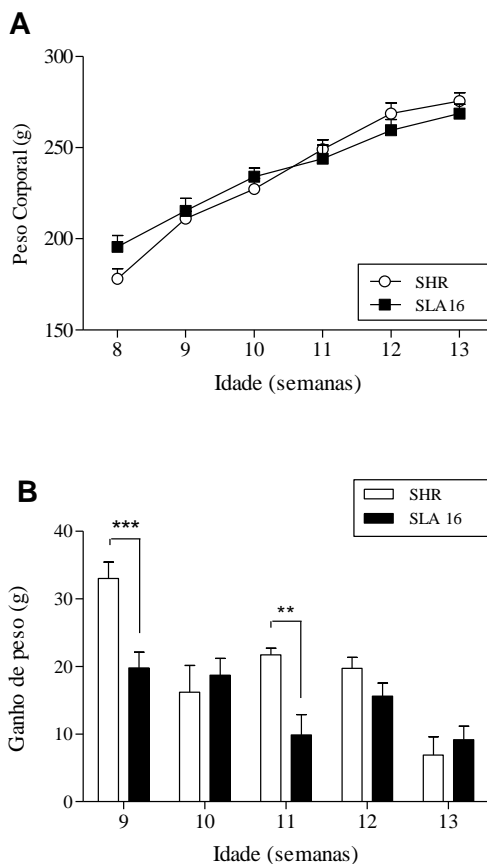


Figura 13 - Curva de crescimento (A) e ganho de peso semanal (B) de machos jovens das linhagens SHR e SLA16 no período de 8 a 13 semanas de idade. Os valores são expressos pelo peso corporal em gramas (A) e o ganho de peso por semana (B), representados como a média \pm E.P.M. de $n=10$ ratos por linhagem. (***) $p<0,001$; (**) $p<0,01$ SLA16 comparado ao controle genético SHR (ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

5.2.2 Habituação ao campo aberto em machos jovens SLA16 e SHR

Em relação à distancia percorrida no CA avaliada em blocos de 5 minutos, a ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou um

efeito significativo do fator repetição [$F_{(2,30)}=12,333$; $p<0,001$], mas não do fator linhagem. Esse resultado indica que ratos machos jovens, independente da linhagem, habituam ao CA em 15 minutos (**Figura 14A**). O teste de *post hoc Newman-Keuls* revelou no bloco de 10-15 minutos da habituação, uma menor distancia percorrida em relação aos dois primeiros blocos (de 1-5 e 5-10 min) do teste ($p<0,01$), sugerindo que os animais habituaram ao CA independentemente da linhagem nos últimos 15 minutos de uma exposição de 15 minutos (**Figura 14A**). Em relação atividade exploratória, o número de levantamentos foi analisado nos primeiros 5 minutos do teste, o teste T simples não pareado não revelou diferença entre a atividade exploratória das linhagens (**Figura 14B**).

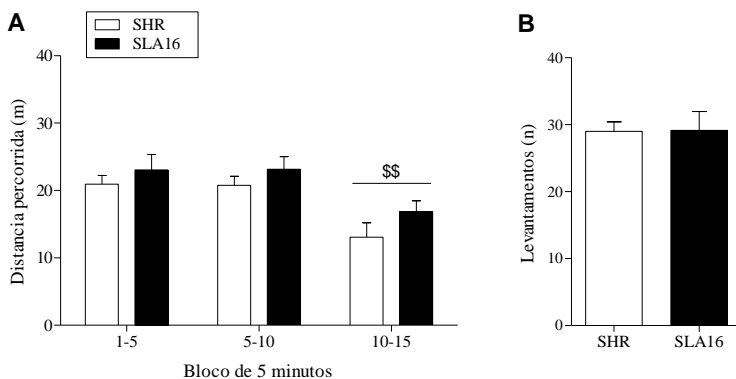


Figura 14 - Locomoção e atividade exploratória na habituação ao CA de machos jovens das linhagens SHR e SLA16. Os valores são expressos como a distância percorrida em blocos de 5 minutos (A) e número de levantamentos nos primeiros 5 minutos de teste (B), representados como a média \pm E.P.M. de $n=10$ ratos por linhagem. \$\$ indica uma diferença significativa ($p<0,01$) do último bloco experimental, de 10-15 minutos, em relação aos dois primeiros blocos experimentais, de 1-5 e 5-10 minutos respectivamente. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguidas pelo teste de pós-hoc de *Newman Keuls* (A) e teste-T no gráfico (B).

Indicadores de emocionalidade foram avaliados durante o teste do CA. Os parâmetros de tempo e distância percorrida no centro do aparato foram analisados nos machos jovens em blocos de 5 minutos. Em relação à distância percorrida no centro, a ANOVA de uma via de

medidas repetidas mostrou efeito significativo da linhagem [$F_{(1,15)}=18,851$; $p<0,001$; $SHR<SLA16$].

Por outra parte, a ANOVA de uma via com medidas repetidas no parâmetro de tempo no centro revelou uma diferença significativa no fator linhagem [$F_{(1,15)}=10,135$; $p<0,01$; $SHR<SLA16$] e no fator tempo [$F_{(2,30)}=6,513$; $p<0,01$] (**Apêndice 2**).

5.2.3 Memória de curta e longa duração avaliada pelo teste de realocação de objeto em machos jovens nas linhagens SHR e SLA16

Para avaliar a memória espacial de curta duração, o TRO foi realizado 24 horas após a habituação ao CA e foi dividido em três fases: familiarização aos objetos, teste 1 (uma hora e meia após a familiarização) e teste 2 (24 horas após a familiarização). O teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos valores de índice de discriminação dos objetos ($p> 0,20$), nas três fases do protocolo (familiarização, teste 1 e teste 2).

Na fase de familiarização, observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram uma investigação semelhante para os dois objetos, indicado pelo índice de discriminação de todos os grupos, próximo ao valor esperado de 50 % (**Figura 15**, Treino). Na fase do teste 1, a análise estatística realizada através do teste T contra o valor esperado do 50%, demonstrou que não houve diferença significativa do índice de discriminação das linhagens SHR e SLA16 para a memória curta duração. No teste 2, 24 horas após a familiarização, a linhagem SLA16 não discriminou o objeto realocado, por outro lado, foi observada uma tendência ($p=0,06$) da linhagem SHR em discriminar o objeto realocado (**Figura 15**, teste 1 e teste 2).

Estes resultados sugerem as linhagens SHR e SLA16 apresentam um prejuízo na memória de curta duração no TRO, por outro lado, a memória de longa duração da linhagem SLA16 se encontra prejudica enquanto os ratos SHR aparentemente possuem um bom desempenho no TRO após 24 horas.

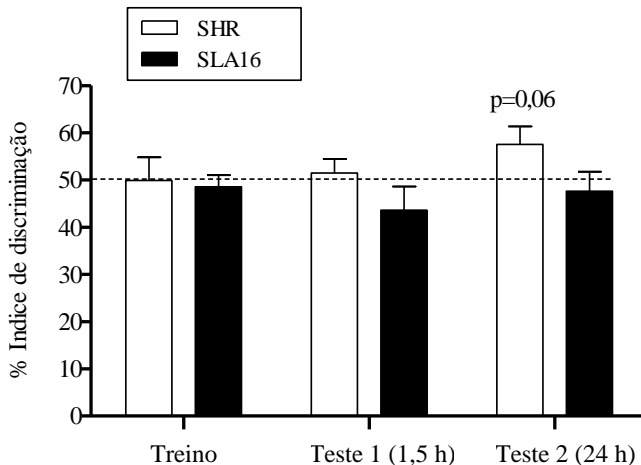


Figura 15 - Memória espacial de curta (1,5 h) e longa duração (24 h) em machos jovens das linhagens SLA16 e SHR avaliadas pelo TRO. As barras representam os valores de índice de discriminação do objeto realocado em relação ao objeto familiar, representados em porcentagem como a média \pm E.P.M. de $n=10$ ratos por linhagem. (Teste-T simples em comparação ao valor esperado de 50%).

5.2.4 Memória de curto prazo avaliado pelo teste do labirinto em Y modificado em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

O teste de LYM foi utilizado para avaliar a memória espacial de curta duração, no qual, na fase de treino o tempo de exploração e número de entradas nos braços “início” e “outro” foram analisados através do teste T comparado contra o valor teórico de 50 %, e na fase de teste os tempos de exploração e número de entradas nos braços “início”, “outro” e “novo” foram comparados contra o valor esperado de 33 %.

Durante a familiarização (treino), a porcentagem de entrada nos braços “inicia” e “outro” foram similares para as duas linhagens (**Figura 16A**). Em relação à porcentagem do tempo de permanência nos braços na sessão de treino, os valores foram similares para a linhagem SHR. Por outro lado, foi observada uma maior porcentagem de tempo de permanência no braço “outro”, de parte da linhagem SLA16 ($p<0,001$; **Figuras 16B**). Estes resultados indicam que a linhagem SLA16 possui uma aparente preferência pelo braço “outro” na sessão de treino.

Durante a sessão de teste, o teste T simples em comparação à porcentagem padrão esperada (33 %), mostrou que machos jovens das duas linhagens passaram mais tempo explorando o braço novo (% t_{SHR} =40%, $p<0,01$; % t_{SLA16} =40%, $p<0,01$; **Figura 16C**).

Foi observado que as diferenças entre os grupos não foram afetadas pela locomoção, visto que ambos os grupos tiveram um número total de entradas similares nos braços do aparato na sessão do teste ($p<0,05$; **Figura 16D**).

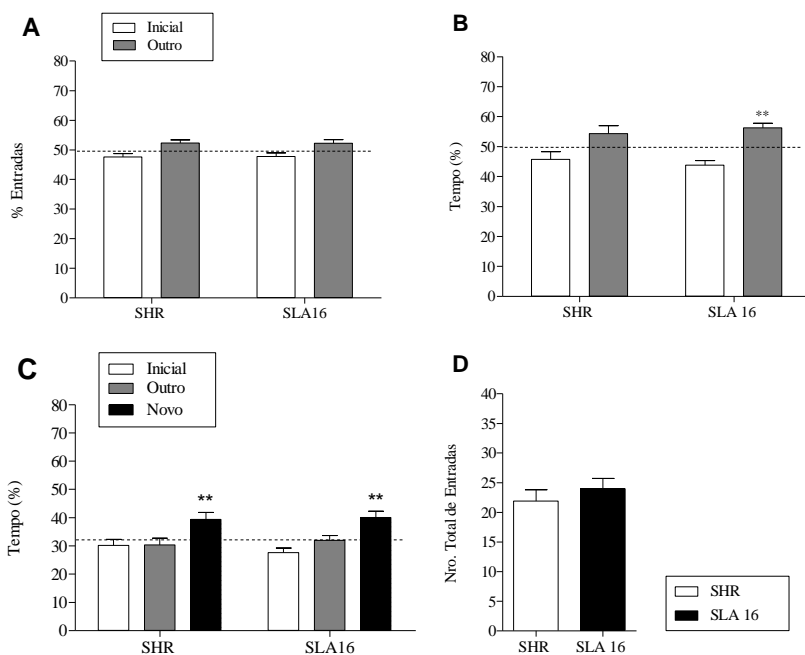


Figura 16 - Memória de curta duração (2h) avaliada pelo teste de LYM em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16. (A) Porcentagens de entrada nos braços na sessão de treino em ambas as linhagens. (B) Sessão de treino. Representam-se as porcentagens de tempo de permanência nos braços. (C) Sessão de teste. Número total de entradas nos braços na sessão de teste (D). Os resultados estão representados como a média da porcentagem \pm E.P.M. de $n=10$ ratos por grupo. * indica uma diferença significativa, (*) $p<0,05$ e (**) $p<0,01$, do tempo de exploração em relação ao valor esperado de 33% na sessão de treino e ao valor de 50% na sessão do teste. (Teste-T simples em comparação ao valor esperado).

5.2.5 Aprendizagem e memória espacial avaliada pelo teste do LAM em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Para avaliar a aprendizagem e a memória espacial de longa duração no teste do LAM, a média aritmética da latência para encontrar a plataforma de cada dia de treino foi analisada através da ANOVA de uma via de medidas repetidas nos machos jovens SHR e SLA16, e a latência para passar pelo local da plataforma foi analisada no dia do teste T não pareado. Em relação a media da latência para achar a plataforma cada dia na sessão de treino (desde dia 1 até dia 4) houve um efeito significativo do fator tempo independente da linhagem [$F_{(3,54)}=16,903$; $p<0,001$], indicando que os grupos experimentais aprenderam. O teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que os machos das duas linhagens apresentaram uma menor latência para encontrar a plataforma ($p<0,01$), a partir do segundo dia de treino (**Figura 17A**). Em relação à sessão do teste (dia 5) o teste T simples entre as linhagens, não revelou diferença na latência para o animal passar pelo local da plataforma (**Figura 17B**).

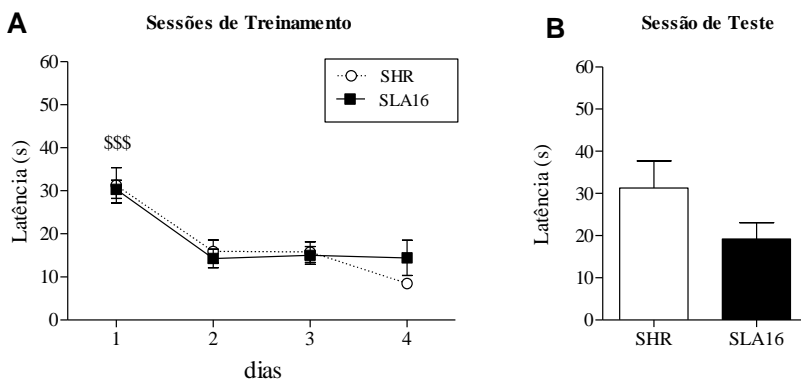


Figura 17 - Desempenho dos machos jovens SHR e SLA16 no labirinto aquático de Morris (LAM). Observam-se a curva da aprendizagem (A) e a sessão de Teste no dia 5 (B) no LAM. Os valores são expressos pela latência para encontrar a plataforma (média \pm E.P.M. de $n=10$ ratos por grupo). \$ indica diferença significativa para o fator repetição (\$\$\$) $p<0,001$ entre os dias de treinamento. (Na curva de aprendizagem foi utilizado ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste de Newman Keuls e na sessão de Teste foi utilizado teste-T entre as linhagens).

5.2.6 Avaliação da memória emocional através do teste do condicionamento aversivo contextual em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16

A avaliação da resposta no condicionamento aversivo foi dividido em duas fases de análise. A primeira, ao fim de analisar a resposta ao condicionamento aversivo entre as sessões de familiarização e teste e uma segunda para avaliar a diferença entre as linhagens em cada sessão. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos parâmetros medidos nos grupos experimentais ($p > 0,20$).

O teste T interseção revelou diferenças no tempo de congelamento entre as sessões de familiarização (T_f) e teste (T_t) ($p < 0,001$; $T_f < T_t$). O teste T intra-sessão não mostrou diferenças no tempo de congelamento entre as linhagens (**Figura 18A**).

Em relação ao parâmetro tentativa de escape (T_e), o teste T inter-sessão mostrou uma diferença significativa entre as sessões de familiarização (T_{e_f}) e teste (T_{e_t}) ($p < 0,05$; $T_{e_f} < T_{e_t}$). O teste T intra-sessão não revelou diferenças de linhagem (**Figura 18B**).

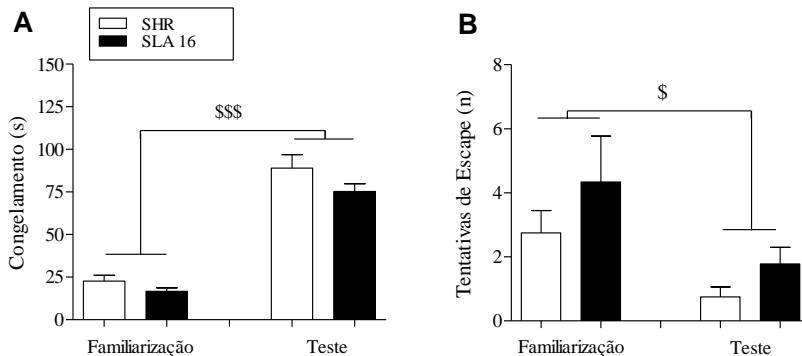


Figura 18 - Avaliação da memória emocional de longo prazo (de 5 dias) em machos jovens das linhagens SHR e SLA16. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. do tempo de congelamento (A) e tentativas de escape (B) nas sessões de familiarização e teste ($n=7-9$ ratos por grupo). \$ indica efeito do fator repetição, (\$) $p < 0,05$; (\$\$\$) $p < 0,001$. (Teste T intra-sessão entre as linhagens e inter-sessão entre a familiarização e o teste)

5.2.7 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos valores de concentração de glicose nos grupos experimentais avaliados no TTOG ($p > 0,20$). A ANOVA de uma via de medidas repetidas, mostrou interação significativa entre os fatores linhagem e tempo [$F_{(4,64)} = 2,928$; $p < 0,05$]. O teste de *post-hoc* de *Newman Keuls* revelou diferença entre as linhagens (SLA16 > SHR; $p \leq 0,05$) nos minutos 15 e 30 (**Figura 19A**). Além disso, o incremento do nível de glicose nos primeiros 15 minutos (**Figura 19B**), foi significativamente maior na linhagem SLA16 em relação à SHR ($p < 0,05$). Em relação à AUC (área sob a curva de glicose) nos machos jovens, o teste-T revelou efeito significativo entre as linhagens ($p \leq 0,01$; SHR < SLA16).

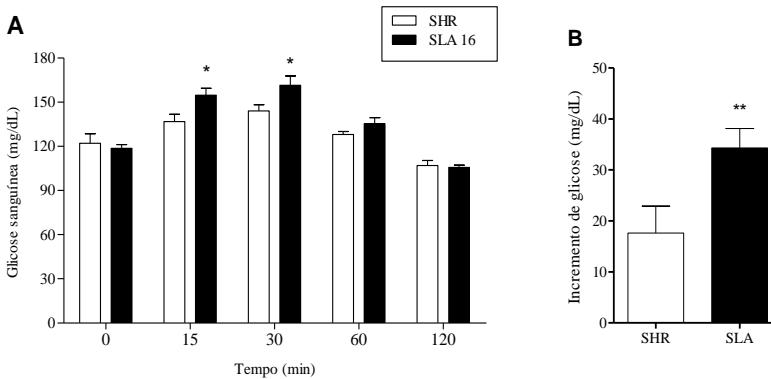


Figura 19 - Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em 120 minutos (A) e a variação dos níveis de glicose sanguínea nos primeiros 15 minutos do TTOG (B) em machos jovens das linhagens SLA16 e SHR. Os valores estão expressos como a o valor da glicose sanguínea (A) e a variação de glicose sanguínea em 15 minutos (média \pm E.P.M. $n=10$ ratos por grupo). * indica o efeito significativo entre as linhagens SLA16 e SHR (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$. (ANOVA de uma via de medidas repetidas, seguida pelo teste de *pós-hoc* de *Newman Keuls* na Figura 19A e teste T entre as linhagens na Figura 19B).

5.2.8 Níveis basais de parâmetros bioquímicos em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Os valores basais de glicose, colesterol e triglicerídeos foram mensurados em jejum nos machos jovens das linhagens SHR e SLA16. Embora o teste T não pareado, não mostrou diferença no nível basal de glicemia. Em relação aos níveis de colesterol total e triglicerídeos, nos machos jovens SLA16 foram significativamente maiores em comparação à linhagem SHR ($p < 0,05$; **Tabela 2**).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos dos ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16. Os valores na tabela se mostram como média \pm E.P.M. da concentração dos parâmetros bioquímicos,

Parâmetros bioquímicos	Linhagens	
	SHR	SLA 16
Glicemia (mg/gL)	121,9 \pm 6,47	118,3 \pm 2,59
Colesterol Total (mg/gL)	29,9 \pm 1,86	34,9 \pm 1,23 *
Triglicerídeos (mg/gL)	26,0 \pm 3,22	49,4 \pm 5,22 *

(*) indica diferença entre as linhagens, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.3. BLOCO EXPERIMENTAL 3 – PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA DE MACHOS ADULTOS DAS LINHAGENS SHR E SLA16

5.3.1 Teste do campo aberto (CA) em machos adultos das linhagens SLA16 e SHR

A análise da distância percorrida total, avaliada em blocos de 5 minutos, revelou que os machos adultos das linhagens SHR e SLA16 habitam ao CA em 15 minutos. O Teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos valores de distância percorrida no CA em 15 min ($p > 0,20$).

A ANOVA de uma via de medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tempo nos machos adultos [$F_{(2,20)}=11,754$; $p < 0,001$] observando-se que a atividade locomotora diminui com o tempo nos grupos experimentais (**Figura 20A**). Por outro lado, foi observada uma tendência de maior atividade locomotora na linhagem SLA16 em relação à SHR durante os 15 minutos de teste [$F_{(1,10)}=4,152$;

$p=0,069$; SHR<SLA16]. Esse resultado indica que os ratos machos adultos habituam ao CA em 15 minutos e sugere que a atividade locomotora é dependente da linhagem.

Quando avaliado a atividade exploratória, o número de levantamentos no primeiro bloco de 5 minutos, o teste T simples-não pareado mostrou uma diferença significativa entre as linhagens [$p<0,01$; SHR<SLA16; **Figura 20B**].

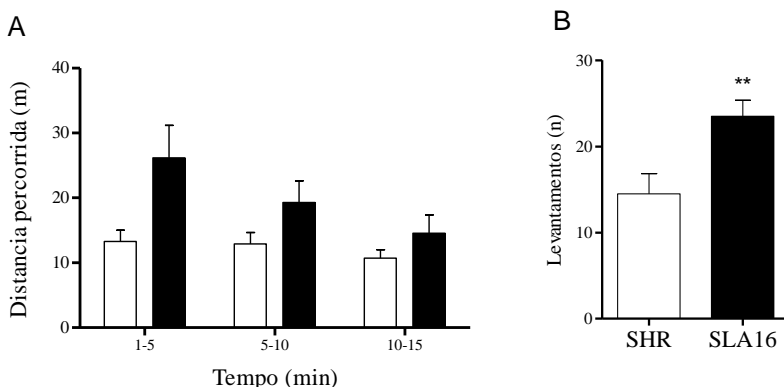


Figura 20 - Habituação ao CA durante uma exposição de 15 minutos em machos adultos das linhagens SHR e SLA16. A distância percorrida foi avaliada em blocos de 5 minutos, a ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tempo ($p<0,001$) (A). A linhagem SLA16 apresenta um maior número de levantamentos no primeiro bloco de 5 minutos em relação à SHR (Teste T entre as linhagens; $p\leq 0,01$) (B). Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. da distância percorrida. $n=6$ ratos por grupo. * indica diferença significativa de linhagem (**) $p<0,01$.

Em relação aos parâmetros relacionados à emocionalidade avaliada em blocos de 5 minutos durante a habituação ao CA, foi observada uma diferença entre as linhagens para o parâmetro distância percorrida no centro [$F_{(1,10)}=6,372$; $p<0,05$; SHR<SLA16] e o tempo no centro [$F_{(2,20)}=8,536$; $p<0,01$; SHR<SLA16] (**Apêndice 4**).

5.3.2 Memória espacial de curta e longa duração em machos adultos das linhagens SHR e SLA16 avaliados pelo teste de realocação de objetos (TRO)

Ao fim de avaliar a normalidade dos dados no TRO foi realizado o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Este revelou uma distribuição normal dos valores de índice de discriminação nas três fases experimentais ($p > 0,20$).

Na fase de familiarização, observou-se que os grupos experimentais apresentaram uma investigação semelhante por os dois objetos, indicado pelo índice de discriminação de todos os grupos próximo ao valor esperado de 50 % (**Figura 21**).

O teste T revelou diferença significativa nos índices de discriminação (ID) do grupo SHR nos testes 1 e 2, quando estes foram comparados contra o valor esperado de 50 % [ID%_{Teste 1} = 72%, $p < 0,001$; ID%_{Teste 2} = 70%, $p < 0,05$]. Estes resultados sugerem que os machos adultos SHR passaram mais tempo investigando o objeto realocado. Já para machos adultos SLA16, o teste T não indicou diferença significativa quando comparado com o valor teórico de 50 %.

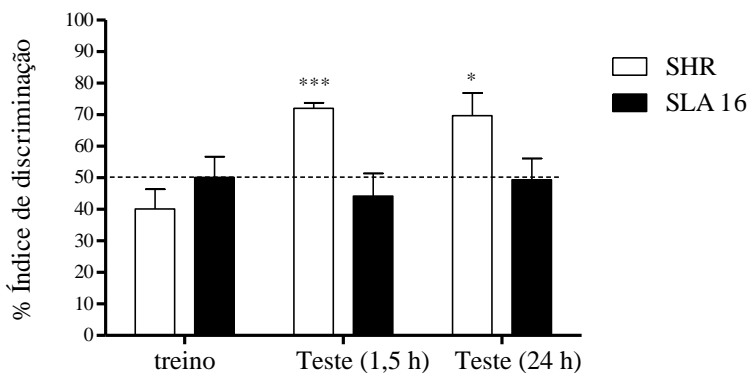


Figura 21 - Memória espacial de curta e longa duração avaliados em machos adultos SLA16 e SHR pelo TRO. O teste T em comparação a 50% mostrou um efeito significativo da linhagem SHR. Os valores do índice de discriminação, representado pelas barras, são expressos como a média \pm E.P.M. da porcentagem de discriminação do objeto realocado. * indica diferença em relação ao valor de 50%; (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$; $n=6$ ratos por grupo.

5.3.3 Memória de curto prazo avaliado pelo teste de labirinto em Y modificado, em machos adultos de 10 meses de idade, das linhagens SHR e SLA16

O teste *Kolmogorov-Smirnov* foi realizado com o fim de avaliar a normalidade dos dados. Este revelou uma distribuição normal na familiarização e no teste ($p > 0,20$).

Na fase da familiarização, o teste T simples em comparação contra a porcentagem esperada de 50%, revelou que as linhagens SHR e SLA16 tiveram uma porcentagem de entrada similar nos braços “início” e “outro” (**Figura 22A**). Em relação ao tempo de permanência, foi observada uma preferência pelo braço “outro” na linhagem SHR ($\%E_{SHR} = 54\%$, $p < 0,05$; **Figura 22B**). Por outro lado, a linhagem SLA16 apresentou um tempo de permanência similar para os braços na fase de treino (**Figura 22B**).

Na fase de teste, o teste T simples em comparação com a porcentagem esperada de 33%, revelou que os machos adultos das duas linhagens visitaram com maior frequência o braço novo ($\%E_{SHR} = 38\%$, $p < 0,05$; $\%E_{SLA16} = 37\%$, $p < 0,05$; **Figura 22C**).

Foi observado que as diferenças entre as linhagens não estiveram relacionadas com a locomoção ($p < 0,05$), visto que ambos os grupos tiveram número total de entradas similar (**Figura 22D**).

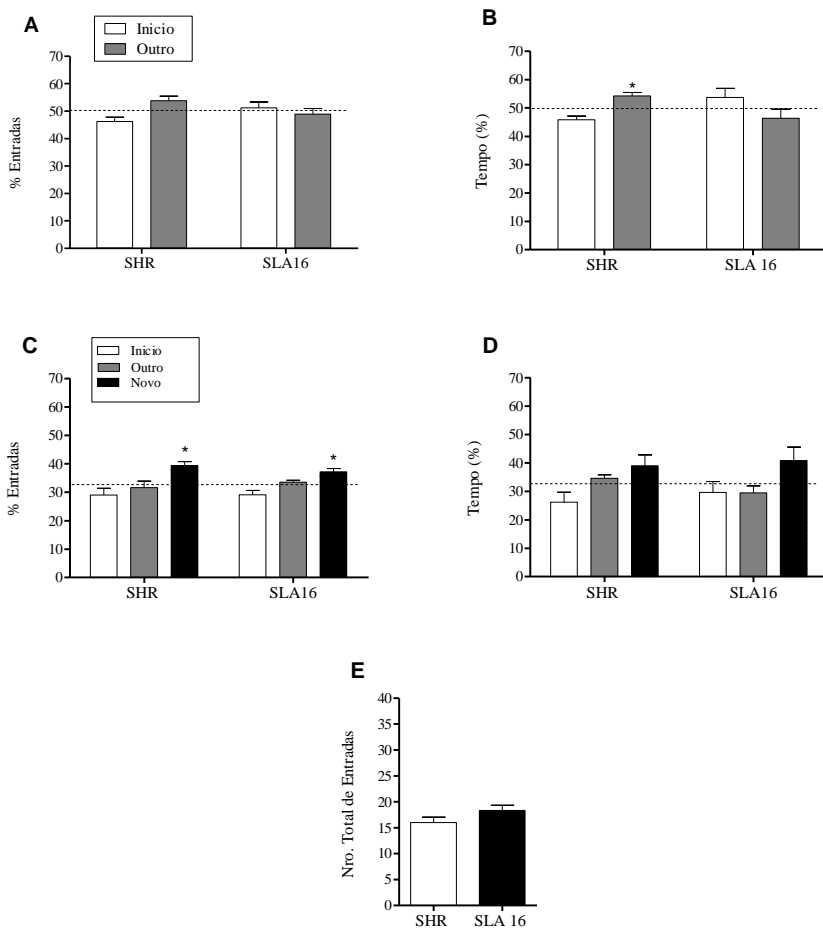


Figura 22 - Memória de curta duração avaliada pelo labirinto em Y modificado em ratos machos adultos das linhagens SLA16 e SHR (A-E). Sessão de familiarização, no gráfico se representam as porcentagens de entradas e tempo de permanência (A-B). Sessão de teste (C-D). Número total de entradas nos braços na sessão de teste (E). Os valores são expressos como a média da porcentagem de discriminação \pm E.P.M. $n=6$ ratos por grupo. (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$. (Teste T simples em relação ao valor esperado de 50% no treino e 33% na sessão de teste).

5.3.4 Aprendizagem e memória de longa duração de machos adultos SHR e SLA16 avaliados no labirinto aquático de Morris

A análise foi desenvolvida em duas fases: treino e teste. Na fase de treino (duração de 4 dias), a média aritmética da latência para encontrar a plataforma de cada dia, foi analisada através da ANOVA de uma via com medidas repetidas, e na fase do teste (no dia 5), a latência para passar pelo local da plataforma foi avaliada pelo teste T entre as duas linhagens.

Em relação à aprendizagem houve um efeito significativo do fator tempo [$F_{(3,54)}=16,903$; $p<0,001$]. O teste *post hoc* de *Newman Keuls* indicou que os machos das duas linhagens aprenderam a achar a plataforma ($p<0,001$), a partir do segundo dia de treino. A ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou uma tendência na latência para encontrar a plataforma entre as linhagens [$F_{(1,10)}=4,436$, $n=6$, $p=0,06$; SHR<SLA16; **Figura 23A**]. Em relação ao teste não foi observado diferença na latência para passar pelo local da plataforma entre as linhagens (**Figura 23B**).

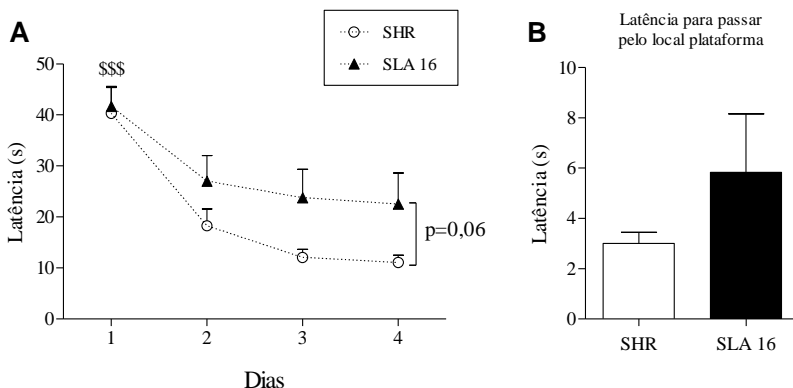


Figura 23 - Curva de aprendizagem durante a fase de treino (A) e latência para passar pelo local a plataforma no dia do teste (B) no LAM avaliados em machos adultos SHR e SLA16. Os valores de latência estão representados como média \pm E.P.M. de $n=6$ ratos por grupo. \$ indica efeito de repetição, (\$\$\$) $p<0,001$.

5.3.5 Avaliação da memória emocional através do teste de condicionamento aversivo contextual em machos adultos das linhagens SHR e SLA16

A análise do teste de condicionamento aversivo foi dividido em duas fases para o qual foi utilizado o teste T. Na primeira fase foram avaliadas as respostas de congelamento e tentativas de escape entre as sessões de familiarização e teste, e na segunda fase foi avaliado o efeito da linhagem entre as sessões. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal em todos os parâmetros analisados durante as sessões ($p > 0,20$).

O teste T pareado revelou diferença no tempo de congelamento entre as sessões de familiarização (T_f) e teste (T_t) ($p < 0,001$; $T_f < T_t$; **Figura 24A**) nos machos adultos SHR e SLA16, indicando que as duas linhagens evocam a memória após 5 dias da contextualização. Já o teste T intra-sessão não mostrou diferenças entre as linhagens. Em relação ao parâmetro de tentativa de escape, o teste T inter-sessão mostrou uma diferença significativa entre a familiarização e o teste ($p < 0,05$; **Figura 24B**). Já o teste T intra-sessão não revelou diferenças entre as linhagens para o parâmetro de tentativa de escape.

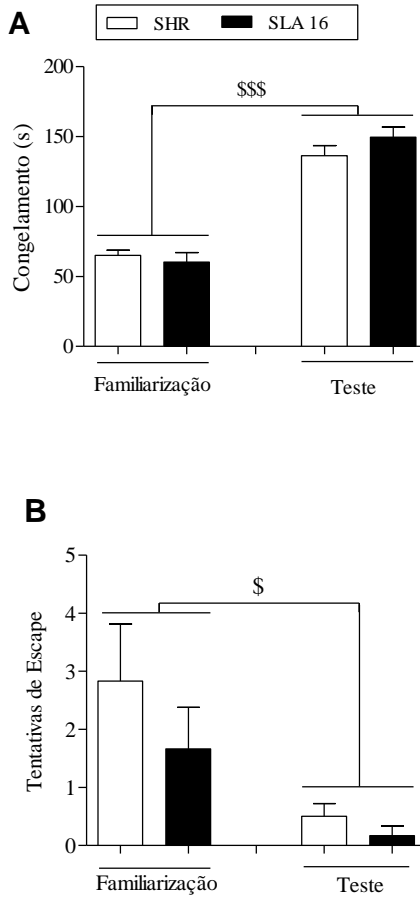


Figura 24 - Avaliação da memória emocional de longo prazo (5 dias) em machos das linhagens SHR e SLA16. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. do tempo de congelamento ($n=6$ ratos por grupo). \$ indica diferença entre Familiarização e Teste, (\$) $p<0,05$; (\$\$\$) $p<0,001$. (Teste intra-sessão e teste T inter-sessão)

5.3.6 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) avaliado em machos adultos das linhagens SHR e SLA16

O Teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos valores de glicemia nos grupos experimentais ($p > 0,20$). A ANOVA de uma via de medidas repetidas aplicado no TTOG, não mostrou diferenças significativas entre as linhagens ($p < 0,05$; **Figura 25A**). Além disso, O teste T revelou que o incremento dos níveis de glicose nos primeiros 15 minutos ($p < 0,05$; **Figura 25B**) e AUC foram similares nos machos adultos SHR e SLA16 ($p < 0,05$).

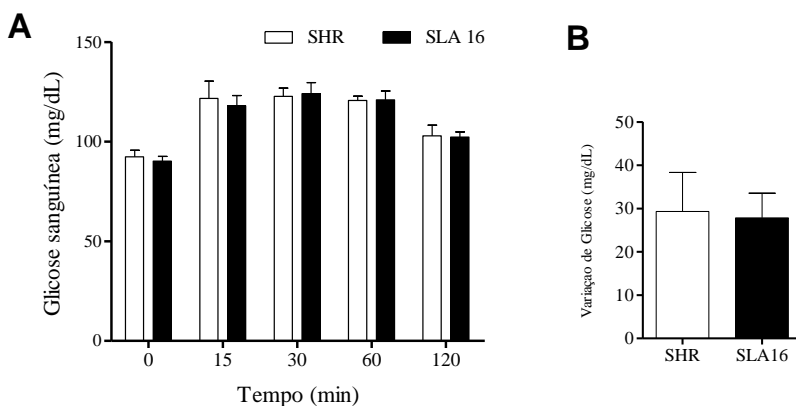


Figura 25 - Curva de tolerância a glicose (A) e incremento da glicose sanguínea nos primeiros 15 minutos (B) em machos adultos das linhagens SHR e SLA16. Os valores são expressos como a média da glicemia \pm E.P.M. $n=6$ ratos por grupo. (ANOVA de uma via com medidas repetidas seguidas pelo teste de *Newman Keuls*).

5.3.7 Níveis basais de parâmetros bioquímicos em machos adultos das linhagens SHR e SLA16

Os parâmetros bioquímicos basais nos machos adultos foram analisados por teste T simples não pareado. A glicemia basal nos machos adultos, em condições de jejum de 5 horas, foi similar entre as linhagens SHR e SLA16 ($p < 0,05$; **Tabela 3**).

Em relação aos lipídeos em condições de 2 horas de jejum, o colesterol total foi similar entre as linhagens. No entanto, os níveis de

triglicerídeos mostraram ser significativamente maiores na linhagem SLA16 ($p < 0,05$; **Tabela 3**).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos nos machos adultos das linhagens SHR e SLA16

Parâmetros bioquímicos	Linhagens	
	SHR	SLA16
Glicemia (mg/dL)	92,3 ± 3,4	90,2 ± 2,4
Colesterol Total (mg/dL)	33,7 ± 3,1	36,5 ± 6,2
Triglicerídeos (mg/dL)	33,8 ± 4,0	53,3 ± 5,4 *

O somatório dos experimentos contidos neste terceiro bloco experimental sugeriu que os machos adultos SLA16 possuem prejuízo no aprendizado/memória espacial acompanhado de níveis elevados de triglicerídeos, em comparação aos machos adultos SHR, sugerindo a influência da idade no prejuízo de funções metabólicas e neurobiológicas associadas ao aprendizado e memória espacial.

5.4 BLOCO EXPERIMENTAL 4 – EFEITO DA METFORMINA NO PERFIL METABÓLICO E NA MEMÓRIA DE MACHOS JOVENS DAS LINHAGENS SHR E SLA16

5.4.1 Efeito do tratamento com metformina 200 mg/kg/dia sobre a curva de crescimento em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Foi monitorado o peso corporal dos grupos experimentais de machos jovens descritos previamente no **item 4.4.4**; a) SHR controle (veículo), b) SHR tratado (metformina), c) SLA16 controle (veículo) e d) SLA16 tratado (metformina). O Teste *Kolmogorov-Smirnov* indicou uma distribuição normal dos valores de peso corporal dos grupos experimentais para cada semana ($p > 0,20$).

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou um aumento significativo do peso durante o período de tempo monitorado [$F_{(4,96)}=132,42$; $p < 0,001$], o teste de *post hoc* revelou que em cada semana os grupos experimentais aumentaram de peso significativamente ($p < 0,001$). Por outro lado, a ANOVA de duas vias de medidas repetidas não revelou diferenças significativas do peso corporal entre os grupos experimentais (**Figura 26A**). Em relação ganho de peso semanal, este teste estatístico mostrou efeitos significativos da linhagem

[$F_{(1,24)}=9,626$; $p<0,01$; $\text{SHR}>\text{SLA16}$] e tratamento [$F_{(4,72)}=10,570$; $p<0,01$; $\text{veículo}>\text{metformina}$] sobre o ganho de peso corporal (**Figura 26B**).

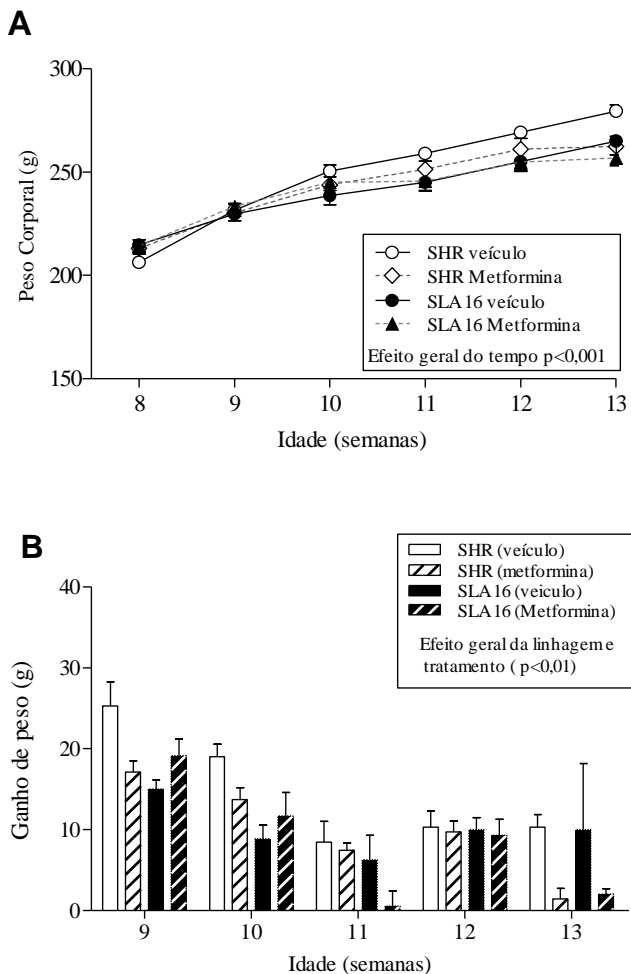


Figura 26 - Curva de crescimento (A) e ganho de corporal semanal (B) de machos jovens SHR e SLA16 tratados com metformina 200 mg/kg/dia ou veículo. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. de o peso corporal em gramas de $n=5-7$ ratos por grupo. (ANOVA de uma via com medidas repetidas seguidas pelo teste de *Newman Keuls*).

5.4.2 Efeito do tratamento com metformina no teste do campo aberto (CA) em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16

O Teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos valores de distância percorrida no campo aberto em 15 min em todos os grupos experimentais ($p > 0,20$). A análise demonstrou que o tratamento com metformina não modificou a habituação dos machos jovens das linhagens SHR e SLA16 ao CA durante 15 minutos.

A distância total percorrida foi analisada em blocos de 5 minutos. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator tempo para os machos adultos [$F_{(2,42)}=12,493$; $p < 0,001$]. O teste de *Newman Keuls* revelou que no último bloco (10-15min) a locomoção foi significativamente menor em relação aos outros blocos (**Figura 27**).

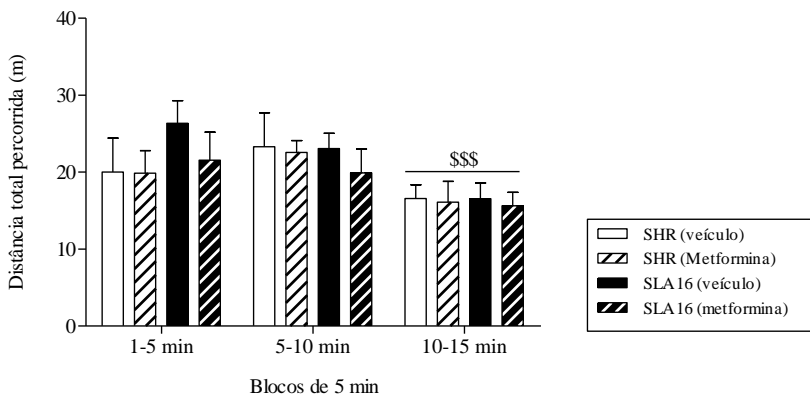


Figura 27 - Efeito da metformina na habituação ao CA em 15 min nos machos jovens SHR e SLA16. As barras representam os valores de distância percorrida e estão expressos como a média \pm E.P.M. $n=5-7$ ratos/grupo. \$ indica o efeito de repetição; (\$\$\$) $p < 0,001$. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *Newman Keuls*)

5.4.3 Efeito do tratamento com metformina no teste de realocação de objetos (TRO) em ratos machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Para determinar o efeito da metformina sobre a memória espacial de longa e curta duração, os animais tratados com metformina

ou veículo foram testados no TRO. O teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal dos valores de índice de discriminação (ID) no experimento nos ($p > 0,20$).

O teste T- simples contra valor esperado de 50%, não revelou diferença no grupo SHR tratados com o veículo e metformina na sessão de treino e nas sessões de testes 1 e 2. Entretanto, na sessão de treino da linhagem SLA16, os grupos tratados com veículo e metformina discriminaram os objetos de forma similar. Já no teste 1 (1,5 h após), o grupo veículo da linhagem SLA16 apresentou diferença no ID do objeto realocado ($ID\%_{teste1}=62, \%; p < 0,01$) mas grupo tratado com metformina não discriminou o objeto realocado. No teste 2 (24 h após), o grupo veículo da linhagem SLA16 não apresentou diferenças, mas a metformina melhorou a memória espacial de longa duração ($ID\%_{teste2}=60\%; p=0,09$) (**Figura 28**).

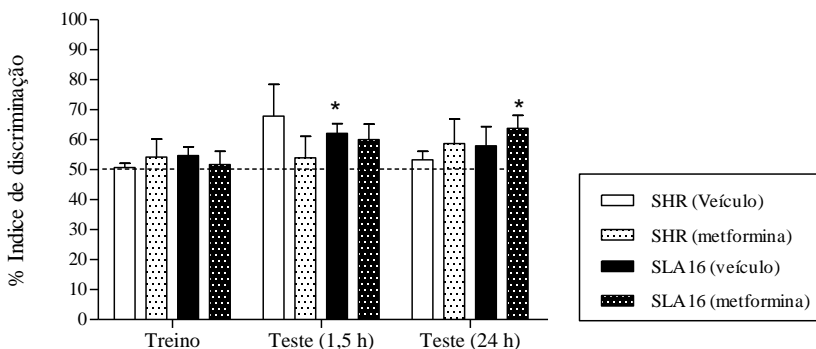


Figura 28 - Efeito da metformina na memória espacial de curta e longa duração em machos jovens SLA16 e SHR. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. $n=5-7$ ratos por grupo. * indica o efeito de linhagem (*) $p < 0,05$.

5.4.4 Efeito do tratamento prolongado da metformina na memória de curto prazo avaliado pelo teste de labirinto em Y modificado, em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Para avaliar o efeito da metformina na memória de curto prazo foi utilizado o teste T simples em comparação a porcentagem esperada na familiarização (50%) e no teste (33%). Na sessão de familiarização, todos os grupos testados tiveram tempo (**Figura 29A**) e número de entradas similares nos braços “novo” e “outro” (**Figura 29B**).

entanto não foram observados efeitos de linhagem, nem do tratamento nos machos SHR e SLA16 na aprendizagem durante o treino do LAM (**Figura 30A**). Em relação à latência para encontrar a plataforma, a ANOVA de duas vias, não mostrou diferenças para os fatores tratamentos e linhagem ($p>0,05$) (**Figura 30B**).

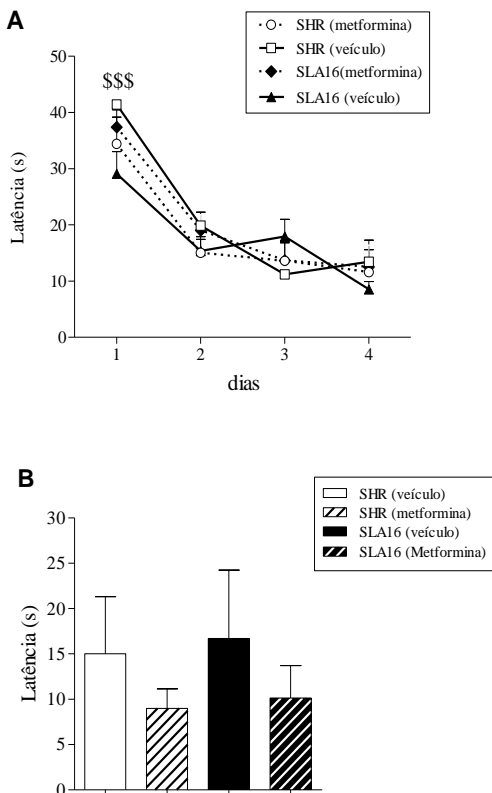


Figura 30 - Efeito da metformina na curva de aprendizagem em machos jovens SHR e SLA16 (A) e latência para encontrar a plataforma (B) no labirinto aquático de Morris. Valores da latência estão representados como média \pm E.P.M. de $n=5-7$ ratos por grupo. \$ indica o efeito do fator repetição, (\$\$\$) $p<0,001$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas para avaliar a aprendizagem (A) e ANOVA de duas vias para avaliar a memória de longa duração (B).

5.4.6 Efeito da metformina sobre a memória emocional de longa duração avaliada pelo medo condicionado

A análise do teste de MC foi dividido em duas fases de análise: a primeira fase para analisar o efeito da metformina sobre as linhagens na familiarização e teste através do teste T, e a segunda fase para analisar a sessão de extinção, através da ANOVA de duas vias de medidas repetidas. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* revelou distribuição normal em todos os parâmetros analisados durante as sessões ($p > 0,20$).

Em relação ao tempo de congelamento (TC), o teste T pareado entre as sessões de familiarização ($TC_f = 21,0s$) e teste ($TC_t = 122,6s$) revelou diferença significativa ($p < 0,001$). A ANOVA de duas vias foi utilizada para avaliar os fatores tratamento e linhagem nas sessões de familiarização e teste independentemente. O teste não revelou diferença entre os grupos na familiarização. Assim mesmo, na sessão do teste não foi observado efeito dos fatores nos grupos experimentais. Em relação à tentativa de escape, o teste T pareado entre as sessões de familiarização ($TC_f = 3,11 s$) e teste ($TC_t = 0,65 s$) revelou diferença significativa ($p < 0,001$). Em relação à análise intra-sessão para avaliar os efeito dos fatores tratamento e linhagem, na sessão de familiarização ($SLA_{16} > SHR$; $p < 0,05$). Na sessão de teste, a ANOVA de duas vias não revelou diferenças entre os grupos (**Figura 31**).

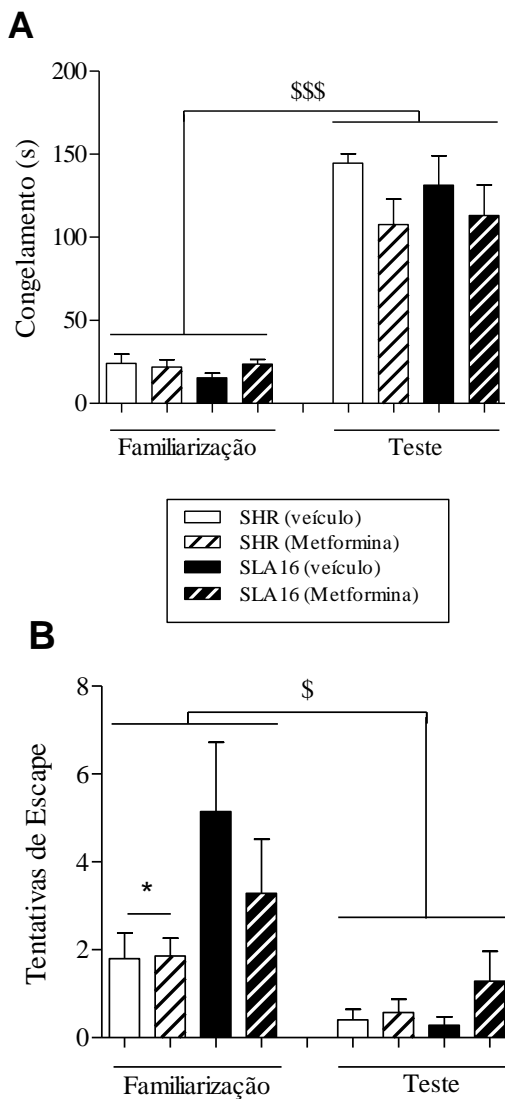


Figura 31 - Efeito da metformina sobre a memória emocional em machos das linhagens SHR e SLA16. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. do tempo de congelamento (n=5-7 ratos por grupo). \$ indica o efeito de repetição; (*) p<0,05; (\$\$\$) p<0,001.

5.4.7 Efeito do tratamento com metformina no teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

O teste de normalidade mostrou uma distribuição normal para o nível de glicose sanguínea em todos os tempos analisados ($p > 0,20$). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou uma interação entre os fatores linhagem, tratamento e tempo [$F_{(4,60)} = 3,177$; $p < 0,05$].

O teste de *post hoc* de *Newman-Keuls* revelou que no TTOG, nos minutos 15 e 30, os ratos tratados com o veículo da linhagem SLA16 teve glicemia significativamente maior que a linhagem SHR ($p < 0,01$), confirmando os resultados observados ratos machos jovens sem tratamento do **item 5.2.7 (Figura 32A)**.

O tratamento com metformina não alterou a curva de glicose da linhagem SHR em relação ao grupo SHR tratado com o veículo. No entanto, na linhagem SLA16, foi observado um efeito do tratamento prolongado com metformina sobre o incremento da glicose sanguínea no minuto 30, onde o nível de glicose do grupo SLA16 tratado com metformina foi significativamente menor ($p < 0,001$) do grupo SLA16 tratado com o veículo, mas similar aos valores da curva de glicose dos grupos de animais SHR tratados com o veículo e a metformina.

A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas na variação de glicose nos primeiros 15 minutos do TTOG dos grupos experimentais (**Figura 32B**).

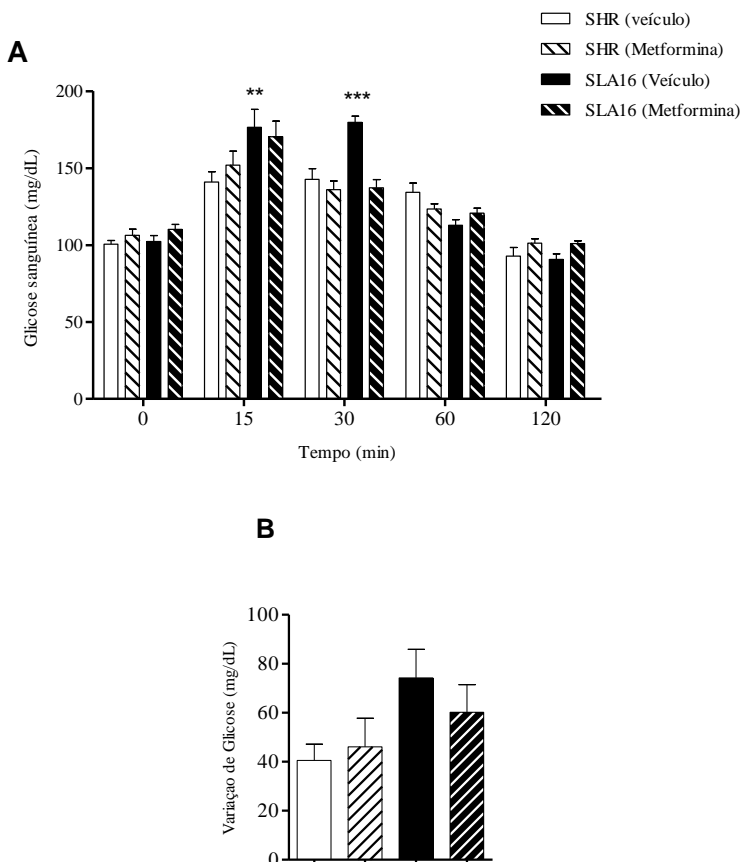


Figura 32 - Efeito do tratamento com metformina no TTOG em machos das linhagens SLA16 e SHR. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo geral de linhagem ($p \leq 0,01$) e tempo ($p < 0,001$), e uma interação entre os fatores tempo, tratamento e linhagem ($p < 0,05$). O teste de *post-hoc de Newman-Keuls* revelou que nos ratos tratados com o veículo, houve um efeito de linhagem nos minutos 15 e 30 (** $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$).

5.4.8 Efeito da metformina na glicemia e nos níveis de colesterol total e triglicerídeos séricos em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

Os valores basais de glicose em sangue e, níveis de colesterol e triglicerídeos séricos foram avaliados em jejum nos machos jovens das linhagens SHR e SLA16 tratados com a metformina e o controle (veículo). A ANOVA de duas vias não revelou diferença para os níveis de glicemia e colesterol sérico. Entretanto, foi observado um efeito do fator linhagem nos níveis de triglicerídeos [$F_{(1,15)}=28,031$; $p<0,001$; $SHR<SLA16$; **Tabela 4**].

Tabela 4. Valores basais de glicemia e níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em jejum de machos jovens tratados com metformina e controle (veículo).

Parâmetros bioquímicos	Veículo		Metformina	
	HR	LA16	SHR	SLA16
Glicemia (mg/gL)	00,00 ± 2,39	102,4 ± 3,83	106,4 ± 4,00	110,2 ± 3,2
Colesterol Total (mg/gL)	2,35 ± 9,46	59,8 ± 5,32	55,22 ± 3,48	58,24 ± 3,12
Triglicerídeos (mg/gL)	1,43 ± 6,72	112,16 ± 6,72***	55,76 ± 3,30	116,98 ± 15.63***

(***) diferença de linhagem; $p<0,001$

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam a hipótese de que as variações alélicas presentes na área genômica diferencial (AGD) influenciam no metabolismo, na memória espacial, destas linhagens, e são dependentes da idade. A análise *in silico* revelou que os genes pertencentes à AGD estão relacionados com metabolismo de glicose, estresse oxidativo, processos neurobiológicos e doenças neurodegenerativas. O estudo *in vivo* indicou que os machos jovens (2 meses) da linhagem SLA16 possuem um leve prejuízo na memória espacial de longo prazo acompanhado do metabolismo de glicose levemente alterado. Além de níveis de colesterol e triglicerídeos séricos superiores em relação à linhagem SHR. Este prejuízo na memória espacial dos machos SLA16 se torna mais evidente na idade adulta (10 meses), onde se observa um prejuízo cognitivo nas memórias espaciais de curta e longa duração, acompanhado de níveis elevados de triglicerídeos séricos em relação à linhagem SHR. Assim, o efeito da AGD no prejuízo de funções metabólicas e de memória espacial parece ser cumulativo ao longo do envelhecimento dos machos da linhagem SHR e SLA16.

Em relação ao tratamento com metformina, a alteração no metabolismo de glicose nos machos jovens SLA16 parece estar relacionada com a sensibilidade à insulina, devido ao fato que o tratamento prolongado com metformina melhora a curva de glicose da linhagem SLA16 em comparação a SHR. A diferença no valor de triglicerídeos nas linhagens mostrou ser independente do tratamento com metformina nos machos jovens. Além disso, o tratamento prolongado com metformina parece melhorar a memória de longo prazo da linhagem SLA16.

Apesar do presente estudo não revelar diferenças no teste de memória aversiva de longo prazo (5 dias) entre as linhagens SHR e SLA16, estudos prévios de nosso laboratório demonstram que a linhagem SLA16, em relação à SHR, exibe diferenças em relação à memória aversiva de 24 horas. O gene *Snca* foi sugerido como um dos responsáveis por estas diferenças, devido ao fato que a linhagem SLA16 possui uma expressão menor de *Snca* (hipocampo e estriado) em comparação à linhagem SHR (ANSELMINI, 2016). Sabe-se que níveis baixos deste gene têm sido associados com resistência à insulina (RODRIGUEZ-ARAUJO *et al.*, 2015). Estes dados somados ao fato que a linhagem SHR, o *background* gênico da linhagem congênica, apresenta resistência à insulina, hiperinsulinemia, e hipertrigliceridemia

(REAVEN, 1991) sugere que a alteração observada no metabolismo em machos jovens SLA16 poderia estar relacionada com o prejuízo na memória espacial em relação aos SHR.

A discussão do presente estudo foi realizada conforme os objetivos específicos dos quatro blocos experimentais.

6.1. Bloco experimental 1: CATEGORIZAÇÃO DOS GENES PERTENCENTES À ÁREA GENÔMICA DIFERENCIAL (AGD) ATRAVÉS DE ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO *IN SILICO*

A análise de enriquecimento de genes foi desenvolvida com o objetivo de estudar a relação dos genes presentes no *locus* diferencial com as vias metabólicas e funções neurobiológicas. Os resultados da análise *in silico* revelaram uma associação significativa da lista de genes da AGD com vias de funções neurobiológicas, doenças neurodegenerativas, estresse oxidativo e metabolismo. Além disso, uma análise bioinformática subsequente (**Apêndice 5**) de estas vias revelou genes significativamente contrastantes com os genes pertencentes à AGD. Destacam-se os genes *Cacna1d*, *Gnb3*, *Perk*, *Itp1* e *Snca*, por possuir funções metabólicas relacionadas a transtornos neurobiológicos já estabelecidas na literatura científica.

O gene *Cacna1d*, revelado nas vias de “sinapse GABAérgica” e “Doença de Alzheimer” codifica para a subunidade alfa 1C do canal de cálcio de tipo L. ZHANG e colaboradores (2011) associam o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP rs1006737) com o desenvolvimento o prejuízo na memória de trabalho espacial tanto em pessoas saudáveis como em pacientes com esquizofrenia ou transtorno bipolar. Além disso, também foi associado com uma redução na tarefa de aprendizado e formação da memória no hipocampo de indivíduos sadios (DIETSCHKE *et al.*, 2014). Em relação ao metabolismo, em humanos uma análise de associação do genoma revelou uma relação entre a DT2 e o gene *Cacna1d* (SOOKOIAN *et al.*, 2009). Enquanto que em camundongos observa-se que a deleção do gene *Cacna1d*, está associada com desenvolvimento de hiperinsulinemia, intolerância à glicose e diminuição do tamanho dos ilhotas pancreáticos (NAMKUNG *et al.*, 2001). Estes estudos sugerem ao gene *Cacna1d* como possível gene candidato para estudos futuros de nosso grupo sobre os prejuízos na memória relacionados com alterações metabólicas.

Em relação aos genes *Gnb3*, *Eif2ak3* e *Itp1* tem sido descrito alterações em relação ao metabolismo de glicose. O *Gnb3*, codifica para a subunidade beta 3 da proteína de ligação a nucleotídeos de guanina,

onde o polimorfismo em humanos (C825T) tem sido correlacionado o com resistência à insulina, pressão arterial e sobrepeso (CHEN *et al.*, 2003). O segundo, o gene *Eif2ak3* (Fator de iniciação de tradução eucariótica 2-alfa-quinase), também conhecido como *Perk*, regula a homeostase de glicose via modulação das funções das células β do pâncreas (WANG *et al.*, 2014). E por último, a mutação do gene *Itp1* (Receptor tipo 1 do Inositol 1,4,5-trifosfato) perturba a homeostase da glicose e aumenta a susceptibilidade à diabetes induzida por dieta (YE *et al.*, 2011). As variações alélicas de cada um destes genes, ou seu conjunto, poderiam influenciar na diferença metabólica de glicose periférica observada nas linhagens SHR e SLA16.

Em relação a processos neurobiológicos, os genes *Snca* e *Perk*, parecem ser chaves para o estudo das diferenças nas alterações das funções do SNC como o prejuízo da memória de longo prazo. Na depressão crônica, o gene *Perk* limita a expressão do receptor metabotrópico de glutamato no hipocampo (TRINH *et al.*, 2014). Assim também, a inibição da proteína PERK previne a neurodegeneração mediada por tau em um modelo de demência fronto-temporal em camundongo (RADFORD *et al.*, 2015). E sua repressão melhora as deficiências do receptor metabotrópico de glutamato-depressão de longo prazo (mGluR-LTD) num modelo murino de doença de Alzheimer (YANG *et al.*, 2016). É importante salientar o gene *Snca* (alfa-sinucleína) considerado como gene candidato por nosso grupo, foi também revelado através do enriquecimento *in silico*. Animais da linhagem SLA16 possuem níveis significativamente menores de SNCA nas regiões do hipocampo e estriado em comparação à linhagem SHR (ANSELMINI, 2016). RODRIGUEZ-ARAUJO e colaboradores (2015) afirmam que níveis baixos de alfa-sinucleína estão associados à resistência à insulina. O gene *Snca* parece ser chave para estudos futuros de nosso laboratório em relação às diferenças descritas neste trabalho, entre as linhagens SHR e SLA16.

Em conjunto, estes resultados demonstram que alguns genes presentes na AGD do cromossomo 4 do rato, estão significativamente associados com as funções neurobiológicas e vias metabólicas, que podem influenciar no metabolismo de glicose e nos processos de aprendizado e memória.

6.2. *Bloco Experimental 2* - AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA DE MACHOS JOVENS DAS LINHAGENS SHR E SLA16

Para avaliar o perfil metabólico dos machos jovens das linhagens SHR e SLA16 e analisar o desempenho em testes de memória de curta e longa duração, foram realizados: o teste de tolerância oral à glicose (TTOG), triglicerídeos e colesterol total, (perfil metabólico); e testes comportamentais: o campo aberto (CA); e o teste de realocação de objetos (TRO), labirinto em Y modificado (LYM), labirinto aquático de Morris (LAM) e condicionamento aversivo contextual (CAC) (memórias de curta e longa duração).

As análises bioquímicas revelaram diferenças no TTOG entre os machos jovens das linhagens, no qual a linhagem SLA16 apresentou uma intolerância à glicose, valores de colesterol e triglicerídeos séricos maiores, e ganho de peso menor em relação à linhagem SHR. Em relação aos comportamentos, a memória espacial de longa duração parece estar prejudicada na linhagem SLA16 em relação à SHR.

O ganho de peso nos machos jovens da linhagem SLA16 foi significativamente menor em comparação à linhagem SHR (**Figura 13**). Sugere-se que esta diferença poderia estar associada ao desenvolvimento da hipertensão nas linhagens SHR e SLA16. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que ratos jovens da linhagem SLA16 apresentaram uma pressão arterial significativamente menor em comparação com a hipertensão desenvolvida pelos animais SHR (CORREIA, 2015). Dickhout e Lee (1998) sugerem que uma maior velocidade de ganho de peso dos animais SHR, em comparação a WKY, esta associada com o desenvolvimento da hipertensão, devido ao fato que a idade de máximo ganho de peso, nesta linhagem, coincide com o período de idade de máxima hipertensão. Sendo assim, sugere-se que a diferença de hipertensão entre as linhagens SHR e SLA poderia ter mecanismos relacionados à regulação do ganho de peso corporal entre as linhagens.

Em relação às análises bioquímicas em condições de jejum, durante a avaliação do metabolismo de glicose exógena através do TTOG, os machos jovens da linhagem SLA16 mostraram uma AUC (área sob a curva) significativamente maior em relação à linhagem SHR, indicando uma alteração no processamento de glicose da linhagem SLA16 em relação aos SHR (**Figuras 19**). Em relação aos lipídeos, as concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol total, dos machos jovens da linhagem SLA16, foram significativamente maiores em relação aos machos da linhagem SHR (**Tabela 2**). Os valores de triglicerídeos, em ambas as linhagens, foram afetados pela anestesia

com cetamina, que diminui as concentrações de triglicerídeos séricos (SARANTEAS *et al.*, 2005). A alteração no metabolismo periférico de glicose pode ser uma consequência da perda da sensibilidade e/ou expressão dos receptores de insulina periféricos (VIOLLET *et al.*, 2012). Desencadeando, assim, o mecanismo compensatório que leva ao aumento da síntese de insulina, consequente perda da sua função regulatória sobre o tecido adiposo, e aumento dos níveis de triglicerídeos no sangue (REAVEN, 2005).

A diferença nos valores de colesterol poderia não ter uma associação com a alteração do metabolismo de glicose. Sheu e colaboradores (1993) observaram que pacientes com níveis aumentados de triglicerídeos são insulino-resistentes, intolerantes à glicose e hiperinsulinêmicos independentemente da concentração plasmática de colesterol.

Estudos revelam que a resistência à insulina nos SHR contribui para a fisiopatologia da hipertensão. A disfunção endotelial presente nos vasos mesentéricos da linhagem SHR, devido a uma deficiência de produção de NO dependente de PI3-quinase e o aumento da secreção de ET-1 dependente de MAPK, reflete na fisiopatologia de outros leitos vasculares, que contribuem diretamente para a elevação da resistência vascular periférica e hipertensão (POTENZA *et al.*, 2005). Por outro lado, um estudo revela que o tratamento com captopril (anti-hipertensivo inibidor da enzima conversora de angiotensina), diminui a pressão arterial sem afetar os níveis de glicose, insulina, ácidos graxos livres e resistência à insulina, em machos jovens SHR de 10 semanas de idade (SWISLOCKI *et al.*, 2002). Portanto, o fato da linhagem SLA16 possuir uma pressão arterial significativamente menor em comparação aos animais SHR (CORREA, 2015), porém um metabolismo de glicose levemente prejudicado, deveria ser estudado com mais detalhes, com o objetivo de determinar o efeito do metabolismo na fisiopatologia da hipertensão nestas linhagens.

Para avaliar o processo de aprendizagem não associativo, foi analisada a habituação dos animais no campo aberto (CA) durante 15 minutos. Os resultados demonstram que machos jovens SHR e SLA16 habituaram ao CA em 15 minutos de teste (**Figura 14A**). Para avaliar a influência da atividade motora e exploratória no teste de realocação de objetos (TRO) os parâmetro de distância percorrida e levantamentos foram analisados nos primeiros 5 minutos da habituação ao CA. A atividade locomotora deve ser controlada durante os testes de memória espacial na linhagem SHR para que este fator não interfira nas análises comportamentais (SONTAG *et al.*, 2013). Em relação à atividade

motora e exploratória, nos machos não foram observadas diferenças significativas dos parâmetros distância total percorrida (**Figura 14A**) e levantamentos entre as linhagens nos primeiros 5 minutos (**Figura 14B**), demonstrando que o componente locomotor e exploratório não influenciam no TRO nos grupos experimentais de machos. Estas características poderiam influenciar na aprendizagem e nas memórias de curta e longa duração avaliadas no TRO dos machos jovens. Por exemplo, Furlan e Brandao (2001) associaram uma atividade exploratória elevada no CA a uma maior atividade dopaminérgica. Além disso, uma atividade locomotora elevada associada a mecanismos serotoninérgicos poderia influenciar no processo de aprendizagem não associativo, que ocorre durante a habituação ao CA. A diferença na atividade locomotora e exploratória dos ratos SHR já foi descrita por VAN DEN BUUSE e DE JONG EM 1988, onde a linhagem SHR possui uma atividade locomotora e exploratória maior em comparação à linhagem WKY. Entretanto, no nosso estudo, as duas linhagens apresentaram prejuízo na discriminação do objeto realocado no teste 1 (memória de curta duração). No teste 2 (memória de longa duração), os ratos SLA16 também apresentaram prejuízo, porém, os SHR revelaram uma tendência de discriminar o objeto realocado (**Figura 15**). Sugerindo, assim, que a linhagem SHR apresentou um melhor desempenho na memória de longa duração em relação a SLA16.

Além disso, a habituação nos primeiros 5 minutos é um componente que influencia no aprendizado no TRO. Um estudo em nosso laboratório sugere que em exposições diárias de 5 min ao CA os machos jovens SHR e SLA16 não habituam (GRANZOTTO, 2016). Isto reforça a ideia de que uma atividade exploratória elevada e a dificuldade para habituar ao CA afetam a aprendizagem e memória no TRO. O componente emocional do CA pode influenciar no aprendizado durante a habituação. Machos jovens da linhagem SLA16 percorrem uma maior distância no centro do CA durante os 15 minutos de teste (**Apêndice 2**), dado que confirma estudos prévios de nosso laboratório e fortalece o efeito da AGD sobre o índice de emocionalidade (GRANZOTTO, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2013). Além disso, confirma a influência do QTL *Anxrr16* presente na AGD nos comportamentos relacionados à emocionalidade (RAMOS *et al.*, 1999).

Por outro lado, a memória espacial de curta duração não foi prejudicada no teste de LYM nos machos jovens SHR e SLA16 (**Figura 16C**), isto pode ser devido a que este aparato possui paredes fechadas o que dá mais segurança ao animal e não apresenta o componente emocional observado no CA. Por outro lado, nos machos jovens, no

teste que envolve um componente emocional (LAM, **Figura 17**; e CAC, **Figura 18**) os animais aprenderam e revelaram um bom desempenho quando foi avaliada a memória de longa duração, apesar de não existir diferenças entre as linhagens. Uma possível explicação é que diferentemente dos testes de TRO e LYM, o LAM possui uma natureza relativamente aversiva, devido ao estresse da natação. Isso pode gerar uma reatividade emocional nos animais que modifica o padrão de aprendizado/memória. (HARRISON, HOSSEINI & MCDONALD, 2009). O estresse gerado durante as exposições repetitivas ao teste poderia melhorar a aprendizagem devido a que implicam mecanismos de reforço da memória induzidos pelo componente aversivo (SHORS, 2001).

Tanto nos testes de TRO e LYM, a habituação ao CA é dependente do processamento no hipocampo, que envolve memória espacial (THIEL *et al.*, 1998). Neste ponto, cabe mencionar a possível influencia do componente metabólico, a resistência à insulina no hipocampo prejudica o aprendizado espacial e a plasticidade sináptica (GRILLO *et al.*, 2015). A intolerância a glicose observada na linhagem SLA16 poderia estar associada ao prejuízo da memória espacial de longa duração observado no LAM. ROSS e colaboradores (2009) relatam que o prejuízo na memória espacial em ratos, produzido por uma dieta alta em frutose, desenvolve uma resistência à insulina no hipocampo e aumento do nível de triglicérides sérico. Também, tem sido demonstrado que a linhagem SHR possui um prejuízo cognitivo que é dependente da idade e se apresenta acompanhada de uma resistência à insulina tanto periférica como central (córtex, hipocampo e estriado) (GRÜNBLAT *et al.*, 2015). Assim, para estudar a influência da idade no prejuízo da memória espacial e metabolismo, o **Bloco experimental 3** foi realizado em machos adultos das duas linhagens.

Os resultados obtidos neste segundo bloco experimental sugerem que os machos jovens da linhagem SLA16 parecem ser um bom modelo genético para o estudo de alguns fenótipos relacionados ao metabolismo periférico de glicose e lipídeos.

6.3. Bloco Experimental 3 – PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA DE MACHOS ADULTOS DAS LINHAGENS SHR E SLA16

A fim de avaliar a influência da idade na memória espacial e o perfil metabólico nos machos adultos SHR e SLA16 foram realizadas análises bioquímicas de tolerância oral à glicose (TTOG), triglicérides e colesterol total para avaliar o perfil metabólico; e testes

comportamentais para avaliar memória e aprendizado: o campo aberto (CA); e o teste de realocação de objetos (TRO), labirinto em Y modificado (LYM), labirinto aquático de Morris (LAM) e condicionamento aversivo contextual (CAC).

Em relação aos parâmetros bioquímicos os valores de TTOG, AUC, glicemia e colesterolemia foram similares entre as linhagens (**Figura 25; Tabela 3**). No entanto, a linhagem SLA16 apresentou níveis de triglicerídeos significativamente maiores em relação à linhagem SHR (**Tabela 3**). Em humanos, a hipertrigliceridemia foi associada à tolerância isolada à glicose em indivíduos sem resistência à insulina (SIMENTAL-MENDÍA, RODRÍGUEZ-MORÁN, GUERRERO-ROMERO, 2015). Além disso, foi observado que indivíduos, aparentemente saudáveis, podem apresentar intolerância à glicose sem apresentar hiperglicemia em jejum, devido ao fato que o pâncreas aumenta a secreção de insulina como mecanismo compensatório frente à resistência à insulina (CORRÊA *et al.*, 2007). Como consequência da resistência à insulina, este hormônio não pode suprimir a lipólise hepática e posteriormente se produz um aumento subsequente dos triglicerídeos no sangue (LEWIS *et al.*, 1995). Portanto, apesar de que não foram observadas alterações no metabolismo de glicose nos machos adultos, os níveis maiores de triglicerídeos nos machos adultos SLA16 e sua relação com a resistência à insulina devem ser explorados com mais detalhe. As diferenças das curvas de glicose (TTOG; **Figura 19 e Figura 25**) entre machos jovens e adultos poderia dever-se ao fato que ambos os grupos estão em momentos diferentes do desenvolvimento da resistência insulínica. Mas se sugere que outros parâmetros, como a insulinemia e o índice HOMA (*homeostasis model assesment*) sejam avaliados em conjunto com o TTOG para estudar um prejuízo metabólico (CORRÊA *et al.*, 2007).

Em relação à habituação ao CA nos machos adultos, observou-se que a linhagem SLA16 possui uma maior atividade exploratória (**Figura 20B**) e aparentemente maior atividade locomotora (**Figura 20A**) em relação à SHR. A atividade locomotora do SHR parece estar associada a um efeito chão, onde a locomoção se mantém similar durante os 15 minutos enquanto SLA16 diminui, sugerindo uma diferença comportamental na habituação entre duas linhagens (**Figura 20A**).

A avaliação da memória espacial através do TRO revelou que nos machos adultos da linhagem SLA16 aparentemente possuem um prejuízo na memória espacial em comparação à linhagem SHR, devido ao fato que a linhagem SLA16 explorou, tanto o objeto familiar como o

realocado de maneira semelhante. Por outro lado, a linhagem SHR explorou um tempo significativamente maior ao objeto realocado (**Figura 21**). Apesar dos ratos SLA16 possuírem uma maior atividade locomotora e exploratória no teste do CA em relação ao SHR, este fato aparentemente prejudicou o desempenho na discriminação do objeto realocado indicando um aparente prejuízo na memória espacial. A atividade dos ratos parece ser um fator de confusão em tarefas de memória espacial menor e, portanto, deve ser controlado em estudos futuros. Achados anteriores referentes sobre memória espacial de animais SHR devem ser interpretados com cautela, pois eles podem ter sido confundidos por um aumento na atividade locomotora destes animais (SONTAG *et al.*, 2016).

Além disso, os animais SLA16 aparentemente apresentaram uma tendência de um desempenho menor no aprendizado no teste de LAM em comparação aos animais SHR (**Figura 23**). O prejuízo cognitivo na memória espacial parece ser dependente da idade nos SHR e se apresenta acompanhado de uma resistência à insulina tanto periférica como central (córtex, hipocampo e estriado) (GRÜNBLAT *et al.*, 2015).

Estes dados, em conjunto, sugerem que o prejuízo na memória espacial nos machos é dependente da idade e acompanhado de níveis elevados de triglicérides. Também se sugere que o prejuízo na memória espacial e a hipertrigliceridemia na linhagem SLA16 poderiam estar relacionados com uma resistência à insulina no hipocampo (ROSS *et al.*, 2009).

6.4. Bloco Experimental 4 – EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA NO PERFIL METABÓLICO E MEMÓRIA EM MACHOS JOVENS DAS LINHAGENS SHR E SLA16

Machos das linhagens SHR e SLA16 que recebem um tratamento prolongado com metformina, 200 mg/kg, apresentam curvas de glicose semelhantes, indicando que o tratamento com metformina melhorou o metabolismo de glicose da linhagem SLA16 em relação à SHR (**Figura 32**). O tratamento com prolongado metformina em humanos reduz significativamente a AUC do TTOG, melhorando a resistência à insulina sem alterar os níveis séricos de insulina (ERIKSSON *et al.*, 2007). Isso sugere que os ratos SLA16 possuem uma alteração periférica na sensibilidade dos receptores de insulina, liberação pancreática de insulina ou o metabolismo hepático de glicose em relação aos ratos SHR (VIOLLET *et al.*, 2012).

Em todos os blocos experimentais com animais (2-4), ratos machos jovens, adultos e jovens tratados apresentaram níveis de triglicérides significativamente maiores na linhagem SLA16 em relação à linhagem SHR. O tratamento com metformina não modificou as concentrações de triglicérides e colesterol nos machos jovens de ambas as linhagens (**Tabela 4**). As concentrações elevadas de triglicérides, a resistência à insulina, hiperglicemia e hipertensão são marcadores clínicos comuns da síndrome metabólica (GRUNDY, 1999). É interessante mencionar que estudos prévios na linhagem SHR relatam que além destes serem ratos espontaneamente hipertensos, eles possuem uma resistência à insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia quando comparados com os ratos WKY (REAVEN, 1991). O aumento da concentração de triglicérides é a anormalidade lipídica mais comum na resistência à insulina, que se apresenta como consequência da falta do importante efeito supressor da insulina sobre a produção hepática de triglicérides de partículas lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) (LEWIS, *et al.*, 1995). Estudos prévios relatam que uma dieta com alto conteúdo graxo se associa com disfunção cognitiva e danos nas tarefas dependentes da memória hipocampal (ALZOUBI *et al.*, 2009). O fato de que os machos da linhagem SLA16 possuem um metabolismo de glicose significativamente alterado que é revertido pelo tratamento com metformina, e níveis de triglicérides maiores em comparação aos SHR, indica à linhagem SLA16 como possível modelo para o estudo de genes relacionados à síndrome metabólica. O tratamento prolongado com metformina em humanos reduz significativamente a AUC do TTOG, melhorando a resistência à insulina sem alterar os seus níveis séricos (ERIKSSON *et al.*, 2007). Isso sugere que os ratos SLA16 possuem uma alteração periférica na sensibilidade dos receptores de insulina, em relação aos ratos SHR.

A diferença observada na pressão arterial entre os machos das linhagens SHR e SLA16 (CORREA, 2015) poderia estar relacionada com a diferença no metabolismo da glicose observada. Um tratamento prolongado com metformina diminui a pressão arterial e os níveis de insulina nos animais SHR, sem afetar os níveis de glicose em comparação aos ratos WKY. Isso sugere que a hiperinsulinemia pode contribuir ao incremento da pressão arterial na linhagem SHR (VERMA, BHANOT & MCNEILL, 1994). Em conjunto, poderíamos, assim, postular uma possível relação entre o metabolismo de glicose e a pressão arterial influenciada pela AGD.

Em relação ao efeito do tratamento com metformina sobre o comportamento, nós devemos inicialmente comentar que alguns dados

atípicos encontrados, quando comparados com os blocos experimentais anteriores, podem ser explicados pelo fato de aqui os animais terem sido submetidos a um tratamento farmacológico repetido. Assim se sugere melhora de desempenho da linhagem SLA16 em tarefas relacionadas à memória de curta e longa duração, sem afetar o desempenho da linhagem SHR. Por outro lado, observou-se que os grupos tratados com o veículo apresentaram um pior desempenho nos teste de LYM (**Figura 29**), mas o tratamento crônico pareceu melhorar a memória dos animais congênicos no TRO (**Figura 28**). No entanto, o tratamento com metformina não afetou a locomoção/habituação no CA em 15 minutos nos machos jovens (**Figura 27**). Além disso, na linhagem SLA16 o tratamento com metformina parece melhorar a memória espacial de longa duração no TRO (**Figura 28**) e de curta duração no LYM (**Figura 29C**). Em relação à memória espacial da linhagem SHR, o tratamento com metformina não melhorou a memória de curta e longa duração no TRO (**Figura 28**), mas pareceu prevenir o prejuízo na memória dos SHR, gerado pelo estresse do tratamento, no LYM (**Figura 29C**).

Em relação à memória espacial avaliada pelo LAM, não foi observado efeito do tratamento com metformina. O estresse gerado pelo tratamento farmacológico *per se* pareceu melhorar a memória espacial dos ratos SLA16 em relação aos ratos SHR (**Figura 30**). Igualmente, no teste de condicionamento aversivo não foi observada diferença entre as linhagens. Isso talvez também seja fruto de um tratamento farmacológico prévio, pois Anselmi *et al.* (2016) mostraram diferenças entre as linhagens neste teste comportamental. Esta reatividade emocional diferencial das linhagens, quando submetidas a um estresse de imobilização, ou tratamento farmacológico, que afeta o comportamento basal das mesmas, terá que ser estudada com mais detalhes no futuro.

Outra explicação possível para o resultado que sugere um prejuízo na memória espacial na linhagem SLA16 é que isso poderia estar relacionado a uma alteração nos RI no hipocampo. Já foi demonstrado que o tratamento crônico via oral com metformina, em roedores, promove neuroproteção, reduzindo o prejuízo na aprendizagem e memória espacial induzido por estresse oxidativo no hipocampo (ALZOUBI *et al.*, 2014; OLIVEIRA & PEIXOTO, 2015).

Finalmente, o tratamento com metformina melhora o metabolismo de glicose da linhagem SLA16 em relação à SHR, e parece melhorar a memória espacial na linhagem SLA16, sugerindo uma possível alteração nos receptores de insulina no nível periférico e/ou

central, talvez no nível do hipocampo, que precisa ser estudada com mais cuidado no futuro.

7. CONCLUSÃO

A AGD do cromossomo 4 do rato possui genes que influenciam o metabolismo de glicose periférico, e aparentemente a memória espacial, que são atuantes ao longo do desenvolvimento dos animais e manifestam efeitos comportamentais tardios. Os ratos jovens da linhagem SLA16 possuem uma leve intolerância periférica de glicose, revertida pelo tratamento prolongado com metformina, e níveis de triglicerídeos e colesterol aumentados em relação aos SHR. Nos adultos, se sugere que a alteração no metabolismo glicêmico da linhagem SLA16 parece ser regulada por mecanismos compensatórios dependentes de insulina, que conseqüentemente reflete nos níveis de triglicerídeos aumentados na linhagem SLA16, em relação à SHR.

Em relação ao desempenho dos animais nos testes de memória, a linhagem SLA16 possui prejuízo na memória espacial dependente da idade em comparação à SHR. Machos jovens das linhagens SLA16 e SHR aparentemente possuem um leve prejuízo na aprendizagem/memória espacial de curta e longa duração, que quando adultos, o prejuízo se torna mais evidente na linhagem congênica em relação ao controle genético.

A metformina aparentemente melhora a memória espacial de curta e longa duração dos machos jovens SLA16, pelo que se sugere que o prejuízo na memória observado nesta dissertação esteja relacionado com uma alteração no metabolismo de glicose.

Em conjunto, os resultados *in vivo* aliados aos resultados *in silico* indicam que a linhagem SLA16 possui um metabolismo periférico alterado que pode contribuir com um prejuízo na memória espacial ao longo da vida, em comparação à linhagem SHR. Então, este trabalho propõe que a AGD, localizada no cromossomo 4, e o modelo genético de ratos SHR e SLA16, como importantes no estudo de genes e vias metabólicas associados com prejuízos no processamento neurobiológico da memória causados por algumas alterações metabólicas. De certa maneira, estes animais poderão nos levar no futuro a uma melhor compreensão das vias genéticas relacionadas a algumas patologias humanas, como, por exemplo, a doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITMAN TJ, GLAZIER AM, WALLACE CA, COOPER LD, NORSWORTHY PJ, WAHID FN, *et al.* (1999). Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics* 21: 76-83

AITMAN TJ, CRITSER JK, CUPPEN E, DOMINICZAK A, FERNANDEZ-SUAREZ XM, *et al.* (2008). Progress and prospects in rat genetics: A community view. *Nature Genetics* 40: 516-522

ANDREOLLO NA, SANTOS EF, ARAÚJO MR, LOPES LR. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arquivos Brasileiro de Cirurgia Digestiva* 25(1):49-51.

ANSELMI M, CORREA FJ, SANTOS JR, SILVA AF, CUNHA JA, LEÃO AHF, *et al.* (2016). Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 131: 182-191

ANSTEY KJ, LIPNICKI DM, LOW LF. (2008). Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 16(5):343-54.

ALZOUBI KH, ABDUL-RAZZAK KK, KHABOUR OF, AL-TUWEIQ GM, ALZUBI MA, ALKADHI KA. (2009). Adverse effect of combination of chronic psychosocial stress and high fat diet on hippocampus-dependent memory in rats. *Behavioral Brain Research*. 204:117-23

ATANUR SS, BIROL I, GURYEV V, HIRST M, HUMMEL O, MORRISSEY C, *et al.* (2010). The genome sequence of the spontaneously hypertensive rat: Analysis and functional significance. *Genome Research* 20: 791-803

BANKS WA, KASTIN AJ. (1998). Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* 19(5):883–9.

BELANGER M, ALLAMAN I & MAGISTRETTI PJ. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism* 14(6): 724-738.

BERNSTEIN HG, LENDECKEL U, BUKOWSKA A, ANSORGE S, ERNST T, STAUCH R, *et al.* (2008). Regional and cellular distribution patterns of insulin-degrading enzyme in the adult human brain and pituitary. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 35(2):216–24.

BLÁZQUEZ E, VELÁZQUEZ E, HURTADO-CARNEIRO V, RUIZ-ALBUSAC JM. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 5:161. doi: 10.3389/fendo.2014.00161.

BONDY CA, LEE WH e ZHOU J. (1992). Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Molecular and Cellular Neuroscience* (4), 305-314

CAI T, ZHANG X, ZHANG Z, ZHANG R, ZHU H, LIAO L. (2016). Effect of metformin on cognitive dysfunction in animal with insulin resistance: a non-quantitative systematic review of randomized controlled trials. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 9(2):3988-3994

CHEN YY, LI GW, LI CM, HUANG XH, JU ZY, SUN SX, *et al.* (2003). [Association between G-protein β -3 subunit (GNB(3)) gene C825T polymorphism, hypertension, insulin resistance and obesity]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Chinese medical Journal)*. 83(14):1229-32.

CHEN EY, TAN C M, KOU Y, DUAN Q, WANG Z, MEIRELLES GV, *et al.* (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14:128

CHOI YH, KIM SG, LEE MG. (2006) Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (11):2543-52.

CORRÊA, F. J. (2015) O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos. 2015. 121p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – *Programa de Pós-Graduação em Farmacologia*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,

CUKIERMAN T, GERSTEIN HC, WILLIAMSON JD. (2005). Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 48(12):2460-9.

CUKIERMAN-YAFFE, T., GERSTEIN, H. C., WILLIAMSON, J. D., LAZAR, R. M., LOVATO, L., MILLER, *et al.* (2009). Relationship Between Baseline Glycemic Control and Cognitive Function in Individuals With Type 2 Diabetes and Other Cardiovascular Risk Factors: The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes-Memory in Diabetes (ACCORD-MIND) trial. *Diabetes Care* 32(2), 221–226.

DELLU F., FAUCHEY V., LEMOAL M. AND SIMON H. (1997) Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 112–120.

DEVASKAR SU, GIDDINGS SJ, RAJAKUMAR PA, CARNAGHI LR, MENON RK, ZAHM DS. (1994). Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269(11):8445–54.

DE LA MONTE S, TONG M, SCHIANO I, DIDSBURY J. (2016). Improved Brain Insulin/IGF Signaling and Reduced Neuroinflammation with T3D-959 in an Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 55(2):849-864.

DERAKHSHAN F, TOTH C. (2013). Insulin and the brain. *Current Diabetes Reviews* 9(2):102–16.

DE MEDEIROS GF. (2012). Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR.LEW. *Anxrr16* como novo modelo genético para o estudo da ansiedade. Dissertação de mestrado. *Programa de Pós-graduação em Farmacologia*. Universidade Federal de Santa Catarina.

DE MEDEIROS GF, PEREIRA E, GRANZOTTO N & RAMOS A. (2013). Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. *PLOS ONE*, volume 8, issue 12

DE MEDEIROS GF, CORREA JF, CORVINO ME, IZIDIO GS & RAMOS A. (2014). The long way from complex phenotypes to genes: The story of rat chromosome 4 and its behavioral effects. *World Journal of Neuroscience* 4:203-215.

DI PAOLO G, KIM TW. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nature Review Neuroscience* 12:284–296

DIETSCHY JM, TURLEY SD. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Current Opinion in Lipidology* (2):105-12.

DIETSCHE B, BACKES H, LANERI D, WEIKERT T, WITT SH, RIETSCHEL M, *et al.* (2014). The impact of a CACNA1C gene polymorphism on learning and hippocampal formation in healthy individuals: a diffusion tensor imaging study. *NeuroImage*. 1;89:256-61.

DICKHOUT J , LEE R. (1998). Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *The American Physiological Society* 0363-6135/98

ECKERT A, KEIL U, MARQUES CA, BONERT A, FREY C, SCHUSSEL K, *et al.* (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* 66: 1627-34.

- ENNACEUR A, NEAVE N, AGGLETON JP. (1997) . Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental Brain Research* 113(3):509-19.
- ELIAS M.F, ROBBINS MA, SCHULTZ NR, STREETEN DHP, ELIAS PK. (1987). Clinical significance of cognitive performance by hypertensive patients. *Hypertension*, 9 192-197.705.
- ERIKSSON A, ATTVALL S, BONNIER M, ERIKSSON JW, ROSANDER B, KARLSSON FA. (2007). Short-term effects of metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 9 (4):483-9.
- FARR S, YAMADA K, BUTTERFIELD A, ABDUL M, XU L, et al. (2008) Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149 (5): 2628 - 2636
- FRANCESCHI M, TANCREDI O, SMIRNE S, MERCINELLI A, CANAL N. (1982). Cognitive processes in hypertension. *Hypertension*. 4 226-229.
- FURLAN SM, BRANDÃO ML. (2001).Effects of systemic injections of dopaminergic agents on the habituation of rats submitted to an open field test. *Neuropsychobiology* 43(2):83-90.
- FÜNFSCHILLING U, SUPPLIE LM, MAHAD D, BORETIUS S, SAAB AS, et al. (2012) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485(7399), 517-521.
- GAO C, LIU Y, LI L & HÖLSCHER C. (2013). New animal models of Alzheimer's disease that display insulin desensitization in the brain. *Reviews in the Neurosciences*, 24(6): 607–615, doi:10.1515/revneuro-2013-0034
- GHADERNEZHAD N, KHALAJ L, PAZOKI-TOROUDI H, MIRMASOUMI & M, ASHABI G. (2016). Metformin pretreatment enhanced learning and memory in cerebral forebrain ischaemia: the role

of the AMPK/BDNF/P70SK signalling pathway. *Pharmaceutical Biology*. 54(10):2211-2219. doi:10.3109/13880209.2016.1150306

GOLDSTEIN FC, ASHLEY AV, ENDESHAW Y, HANFELT J, LAH JJ, LEVEY AI. (2008). Effects of Hypertension and Hypercholesterolemia on Cognitive Functioning in Patients with Alzheimer's Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 22(4), 336–342.

GOUVEIA L, KETTELHUT I, FOSS M. (2000). Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 1357 -1362. ISSN 0100-879X

GRILLO CA, PIROLI GG, LAWRENCE RC, *et al.* (2015). Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes* 64:3927–3936 pmid:26216852

GRÜNBLAT, E., BARTL, J., LUHOS, D., KNEZOVIC, A., TRKULJA, V., RIEDERER, P., *et al.* (2015). Characterization of cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats, accompanied by brain insulin receptor dysfunction. *Journal of Molecular Psychiatry* 3:6

HALL, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 18 (3), 385-403

HANON O, LEYS D (2002). Cognitive decline and dementia in the elderly hypertensive. *Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System* 3; (suppl 1): s32 – s38.

HARRISON FE, HOSSEINI AH, MCDONALD MP.(2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research* 198(1):247-51

HARRIS, J.J., JOLIVET, R., ATTWELL, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75(5), 762-777.

HAVRANKOVA J, ROTH J, BROWNSTEIN MJ.

(1979) Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *Journal of Clinical Investigation* 64(2):636–42.

IRITANI N, FUKUDA E, NARA Y, YAMORI Y. (1977). Lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Atherosclerosis* 28(3):217-22.

IZÍDIO GS, OLIVEIRA LC, OLIVEIRA LF, PEREIRA

E, WEHRMEISTER TD, RAMOS A. (2011). The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. *Mamm Genome*. 22(5-6):329-40. doi: 10.1007/s00335-011-9327-5.

JEZOVA D, VIGAS M, SADLON J. (1985). C-peptide-like material in rat brain: response to fasting and glucose ingestion. *Endocrinol Exp* 19(4):261–6.

KLEINRIDDERS A, FERRIS HA, CAI W & KAHN CR. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes* 63(7): 2232-2243

KNARDAHL S, SAGVOLDEN T. (1979a). Open-Field behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behav. Neural Biology* 42: 187 - 200

KNARDAHL S, KARLSEN K. (1979b). Pasive-avoidance behavior of spontaneously hypertensive rats. *Neural Biology* 27: 9 – 22.

KULESHOV MV, JONES MR, ROUILLARD AD, FERNANDEZ NF, DUAN Q, WANG Z, *et al.* (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*. gkw377.

LATTANZI S, LUZZI S, PROVINCIALI L, SILVESTRINI M.(2015). Blood pressure variability in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: the effect on the rate of cognitive decline. *Journal of Alzheimers Disease*. 45(2):387-94.

LABUZEK K, SUCHY D, GABRYEL B, BIELECKA A, LIBER S, OKOPIEN B. (2010). Quantification of metformina by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol. Rep.* 62: 956-65.

LAM T, GUTIERREZ-JUAREZ R, POCAI A, BHANOT S, TSO P, *et al.* (2007) Brain glucose metabolism controls the hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Nature Medicine* 13, 171 - 180

LEWIS GF, UFFELMAN KD, SZETO LW, WELLER B, STEINER G. (1995) Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *Journal of Clinical Investigation* 95:158-66.

LI ZG, ZHANG W, SIMA AA. (2002). C-peptide prevents hippocampal apoptosis in type 1 diabetes. *International Journal of Experimental Diabetes Research* 3(4):241-5.

MENESES A, CASTILLO C, IBARRA M, HONG E. (1996). Effects of aging and hypertension on learning, memory and activity in rats. *Physiology and Behavior* 60: 341 – 345.

MERGENTHALER P, LINDAUER U, DIENEL GA, & MEISEL A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neuroscience* 36(10): 587–597.

MONDON CE, REAVEN GM (1988). Evidence of abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. *Metabolism*, 37: 303-305.

MORRIS RGM. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 11(1):47-60.

MOSCONI L, PUPI A, DE LEON MJ. (2008) Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Annals of New York Academic of Sciences*;1147:180-95.

MÜLLER CP, REICHEL M, MÜHLE C, RHEIN C, GULBINS E, KORNHUBER J. (2015). Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1851, Issue 8, Pages 1052-1065, ISSN 1388-1981

NAGALSKI A, KOZINSKI K & WISNIEWSKA M B. (2016). Metabolic pathways in the periphery and brain: contribution to mental disorders?. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 80:19-30 doi: 10.1016/j.biocel.2016.09.012.

NAMKUNG Y, SKRYPNYK N, JEONG MJ, LEE T, LEE MS, KIM HL, *et al.* (2001). Requirement for the L-type Ca²⁺ channel α 1D subunit in postnatal pancreatic β cell generation. *Journal Clinical Investigation* 108: 1015–1022

OKAMOTO K & AOKI K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 27:282-93.

OLIVEIRA WH, NUNES AK, FRANÇA ME, SANTOS LA, LÓS DB, ROCHA SW, *et al.* (2016). Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Research*. 1644:149-60.

OTT C, JACOBS K, HAUCKE E, NAVARRETE SANTOS A, GRUNE T & SIMM A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology* 2, 411–429.

O'KEEFE J, NADEL L (1978) The hippocampus as a cognitive map. Clarendon Press, Oxford

PERLMUTER LC, NATHAN DM, GOLDFINGER SH, RUSSO PA, YATES J, LARKIN M. (1988). Triglyceride levels affect cognitive

function in noninsulin-dependent diabetics. *The Journal of Diabetic Complications* 2(4):210-3.

PERNICOVA I, KORBONITS M. (2014). Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 143–156.

PINTANA H1, APAIJAI N, PRATCHAYASAKUL W, CHATTIPAKORN N, CHATTIPAKORN SC. (2012). Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sciences* 91(11-12):409-14

POTTS, M. B., & LIM, D. A. (2012). An Old Drug for New Ideas: Metformin Promotes Adult Neurogenesis and Spatial Memory Formation. *Cell Stem Cell*, 11(1), 5–6.

RAMOS A, BERTON O, MORME`DE P, CHAUOLOFF F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 1997; **85**: 57–69.

RAMOS A, MOISAN MP, MORMÈDE C, MORMÈDE P (1999) Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Mol Psychiatry* 4: 453–462.

RADFORD H, MORENO JA, VERITY N, HALLIDAY M, MALLUCCI GR. (2015). PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathologica* 130(5):633-42. doi: 10.1007/s00401-015-1487-z.

RAWLINGS A, SHARRETT AR, SCHNEIDER A, CORESH J, ALBERT M, COUPER D, et al. (2014). Diabetes in midlife and cognitive change over 20 years. A cohort study, *Ann Intern Med*. 161:785-793.

REAVEN GM. (2005). Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 34(1):49-62.

REAVEN GM. (1991). Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in the etiology and clinical course of hypertension. *The American Journal of Medicine* 90(2A):7S-12S.

RIBEIRO AM, BARBOSA FF, GODINHO MR, FERNANDES VS, MUNGUBA H, MELO T, *et al.* (2010). Sex differences in aversive memory in rats: Possible role of extinction and reactive emotional factors. *Brain and Cognition* 74: 145-151

RODRIGUEZ-ARAUJO G, NAKAGAMI H, TAKAMI Y, KATSUYA T, AKASAKA H, SAITOH S, *et al.* (2015). Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance. *Scientific Report* 10;5:12081.

SARANTEAS T, ZOTOS N, LOLIS E, STRANOMITI J, MOUROUZIS C, CHANTZI C, TESSEROMATIS C. (2005). Mechanisms of ketamine action on lipid metabolism in rats. *European Journal of Anaesthesiology*. 22(3):222-6.

SCHIFF SR. 1982. Conditioned dopaminergic activity. *Biological Psychiatry*. 17(2):135-54.

SCHREURS, B. G. (2010). The Effects of Cholesterol on Learning and Memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1366–1379.

SHAH K, DESILVA S & ABBRUSCATO T (2012) The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 12629-12655

SHEU, W. H. (1993). Insulin resistance, glucose intolerance, and hyperinsulinemia. Hypertriglyceridemia versus hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 13(3), 367-370. doi:10.1161/01.atv.13.3.367

SHORS TJ (2001). Acute Stress Rapidly and Persistently Enhances Memory Formation in the Male Rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, Volume 75, Issue 1, Pages 10-29

SIMENTAL-MENDÍA LE, RODRÍGUEZ-MORÁN M, GUERRERO-ROMERO F. (2015). The hypertriglyceridemia is associated with isolated impaired glucose tolerance in subjects without insulin resistance. *Endocrine Research* 40(2):70-3.

SOOKOIAN S, GIANOTTI TF, SCHUMAN M, PIROLA CJ (2009). Gene prioritization based on biological plausibility over genome wide association studies renders new loci associated with type 2 diabetes. *Genetics in Medicine* 11: 338–343

SONTAG TA, FUERMAIER AB, HAUSER J, KAUNZINGER I, TUCHA O, LANGE KW. (2013). Spatial memory in spontaneously hypertensive rats (SHR). *PLoS One* 8(8):e74660.

SOARES E, PREDIGER RD, NUNES S, CASTRO AA, VIANA SD, LEMOS C, *et al.* (2013). Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. *Neuroscience* 250: 565 – 577.

STRANAHAN AM, NORMAN ED, LEE K, CUTLER RG, TELLJOHANN RS, EGAN JM, *et al.* (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-age rats. *Hippocampus* 18: 1085-8.

TENNANT KA, BROWN CE. (2013). Diabetes augments *in vivo* microvascular blood flow dynamics after stroke. *Journal of Neuroscience* 4, 33 (49) 19194-19204

THIEL, C.M.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K.W. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, v. 85, n. 4, p. 1253-1262, 1998.

TOMLINSON DR, GARDINER NJ. (2008) Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews Neurosciences* 9(1):36-45.

TRINH MA, MA T, KAPHZAN H, BHATTACHARYA A, ANTION MD, CAVENER DR, *et al.* (2014). The eIF2 α kinase PERK limits the expression of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *Learning & Memory* 21(5):298-304.

VAN DEN BUUSE M, DE JONG W (1988) Open-field behaviour and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension* 10(4):667-84.

VERMA S, BHANOT S, MCNEILL JH.(1994). Metformin decreases plasma insulin levels and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Physiology* 267(4 Pt 2):H1250-3.

VINIK A, FLEMMER M. (2002). *Diabetes and macrovascular disease. The journal of Diabetes Complications* 16(3):235-45

VIOLLET B, GUIGAS B, SANZ GARCIA N, LECLERC J, FORETZ M, ANDREELLI, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 122(6), 253–270.

VORHEES CV, WILLIAMS MT. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858.

WANG CH, WANG CC, WEI YH. (2010). Mitochondrial dysfunction insensitivity, implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Annals of the New York Academic of Sciences* 1202: 157-65.

WANG R, MUNOZ EE, ZHU S, MCGRATH BC, CAVENER DR. (2014). Perk gene dosage regulates glucose homeostasis by modulating pancreatic β -cell functions. *PLoS One*. 2014 Jun 10;9(6):e99684

WILCOX, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clinical Biochemist Reviews* 26(2), 19–39.

WYSS JM, FISK G & VAN GROEN T. (1992). Impaired learning and memory in mature spontaneously hypertensive rats. *Brain Research* 592: 135 – 140.

WYSS JM, CHAMBLESS BD, KADISH I, VAN GROEN T. (2000). Age-related decline in water maze learning and memory in rats: Strain Differences. *Neurobiology of Aging* 21: 671 – 681.

YANG W, ZHOU X, ZIMMERMANN HR, CAVENER DR, KLANN E, MA T. (2016). Repression of the eIF2 α kinase PERK alleviates mGluR-LTD impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 41:19-24.

YE, R., NI, M., WANG, M., LUO, S., ZHU, G., CHOW, R. H., & LEE, A. S. (2011). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 mutation perturbs glucose homeostasis and enhances susceptibility to diet-induced diabetes. *The Journal of Endocrinology*, 210(2), 209–217. <http://doi.org/10.1530/JOE-11-0012>

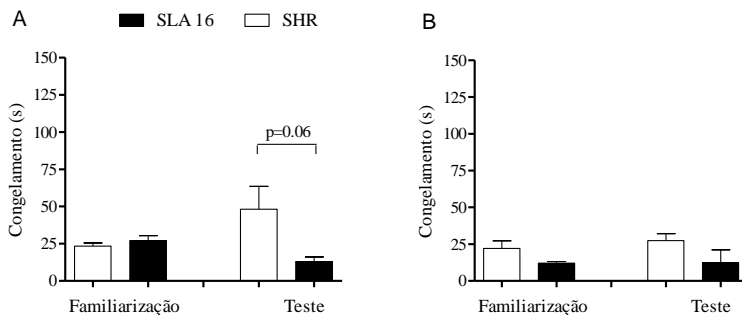
ZHANG Q, SHEN Q, XU Z, CHEN M, CHENG L, ZHAI, *et al.* (2012). The Effects of *CACNA1C* Gene Polymorphism on Spatial Working Memory in Both Healthy Controls and Patients with Schizophrenia or Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 37(3), 677–684.

ZHANG J & LIU Q. (2015). Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein & Cell* 6 (4), 254–264.

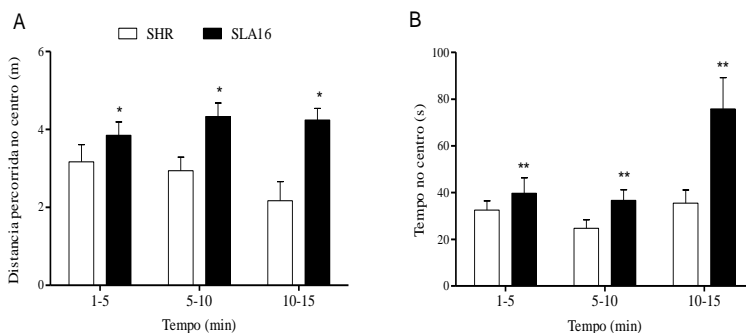
ZHOU, W., KAVELAARS, A., & HEIJNEN, C. J. (2016). Metformin Prevents Cisplatin-Induced Cognitive Impairment and Brain Damage in Mice. *PLoS ONE*, 11(3), e0151890.

APÊNDICE

Apêndice 1: Comportamento basal na caixa do condicionamento aversivo (em ausência de choque) em machos e fêmeas das linhagens SHR e SLA16. Para validar o comportamento basal de congelamento no experimento do condicionamento aversivo, o tempo de congelamento foi analisado em três exposições (dia 1, dia 2 e dia 7), utilizando o mesmo protocolo do **item 4.5.5** em ausência de choque. As exposições na caixa foram como segue: dia 1 (familiarização), dia 2 (exposição sem choque) e dia 7 (Teste). O teste T simples inter-sessão não mostra diferenças nos machos (**Apêndice 1A**) e nas fêmeas (**Apêndice 1B**). Por outra parte, o teste T simples intra-sessão revelou uma tendência de maior congelamento dos machos jovens SHR em relação a SLA16 ($p=0,06$)

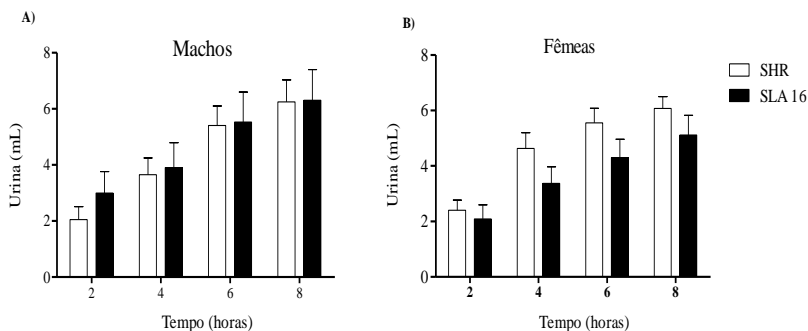


Apêndice 2: Parâmetros de emocionalidade em 15 minutos de habituação ao CA de machos jovens SHR e SLA16. Análise da distância percorrida (**A**) e tempo de permanência no centro (**B**) do campo aberto em machos jovens das linhagens SHR e SLA16. A ANOVA de uma via com medidas repetidas revelou efeito de linhagem para a (**A**) distância percorrida ($p<0,05$) e, (**B**) o tempo no centro ($p<0,001$). Valores de distância percorrida e tempo por períodos de 5 minutos estão representados como a média \pm E.P.M. de $n=10$ ratos por grupo. * indica efeito de linhagem (**) $p<0,001$; (*) $p<0,05$.

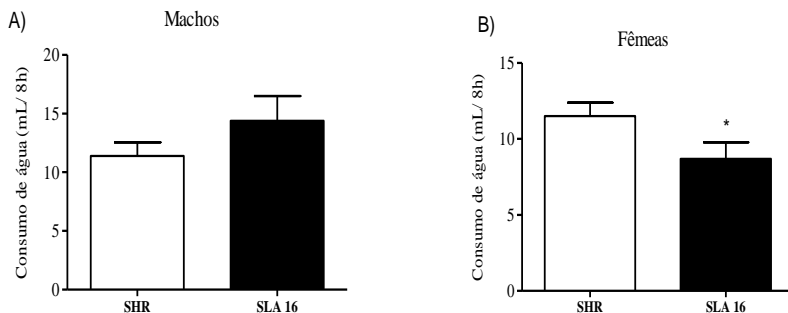


Apêndice 3: Avaliação do consumo de água, diurese e consumo de alimento em machos jovens das linhagens SHR e SLA16

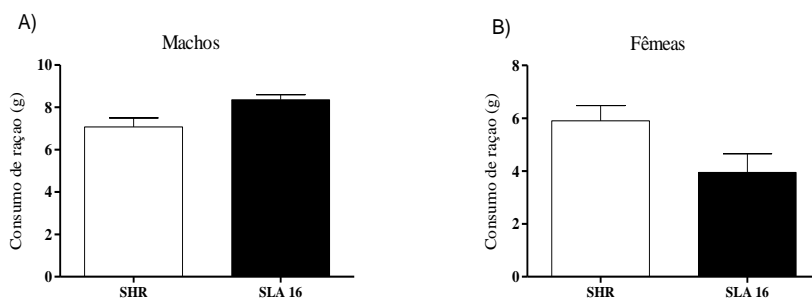
O Teste *Kolmogorov-Smirnov* revelou uma distribuição normal nas variáveis analisadas durante a exposição dos ratos à caixa metabólica ($p > 0,20$). Tanto em machos como fêmeas jovens a ANOVA de uma via de medidas repetidas não mostrou efeito de linhagem. Sugerindo que não existe diferença na diurese avaliada durante 8 h no período diurno entre as linhagens SHR e SLA16 (**Figura A e B**). Em relação ao consumo de água, embora o teste T simples não pareado não revelou diferenças em machos, nas fêmeas foi observado m efeito significativo da linhagem SHR>SLA16 ($p < 0,05$) (**Figura A e B**). Em quanto ao consumo de alimento (ração), tanto em machos como em fêmeas, não foi observada diferença significativa de linhagem avaliada pelo teste T simples não pareado ($p < 0,05$) (**Figura A e B**).



Diurese em machos (A) e fêmeas (B). ANOVA de uma via de medidas repetidas não revelou efeito de linhagem. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. do volume de urina acumulativo cada 2 h. $n=10$ ratos/grupo.

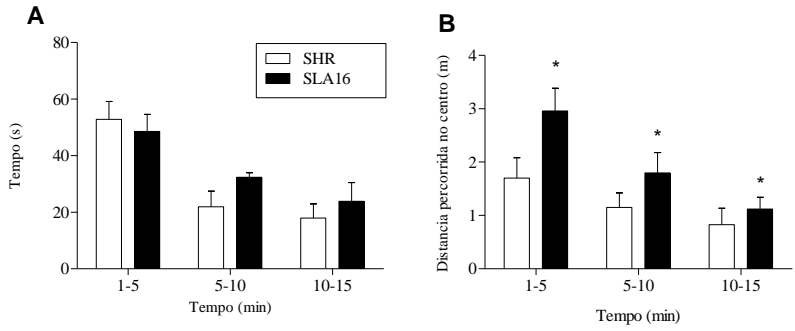


Consumo de água em machos (A) e fêmeas (B). O teste T simples não pareado revelou efeito de linhagem nas fêmeas, SLA16>SHR (**Figura B**). Além disso, um efeito de linhagem no incremento da glicemia nos primeiros 15 minutos (SHR>SLA16). Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. do volume de água consumido. $n=10$ ratos/grupo. *=Efeito linhagem $p<0,05$.



Consumo de alimentos em machos e fêmeas jovens das linhagens SHR e SLA16 o teste T simples não pareado não revelou diferença nas linhagens. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. do consumo de ração. $n=10$ ratos/grupo.

Apêndice 4: Parâmetros de emocionalidade nos machos adultos de 10 meses de idade SHR e SLA16. Em relação aos parâmetros relacionados à emocionalidade avaliada em blocos de 5 minutos durante a habituação ao CA, foi observada uma diferença entre as linhagens para o parâmetro distância percorrida no centro [$F_{(1,10)}=6,372$; $p<0,05$; SHR<SLA16] e o tempo no centro [$F_{(2,20)}=8,536$; $p<0,01$; SHR<SLA16]. * Denota efeito de linhagem.



Apêndice 5. Vias e genes relacionados a funções metabólicas e neurobiológicas, da AGD do cromossomo 4 do rato, obtidos por análise *in silico* de enriquecimento de genes.

Base de dados	Vias	Valor de p	Valor de Z	Genes
KEGG 2016	GABAergic synapse_Homo sapiens_hsa04727	0.020	-1.83	GABARAPL1, SLC6A13 GNB3, SLC6A11, CACNA1C, GNG12, SLC6A1
Wikipathways 2016	Oxidative Damage_Mus musculus_WP1496	0.009	-2.05	CDKN1B, C15, GADD45A, C1R, C3AR1
	Alzheimers Disease_Mus musculus_WP2075	0.011	-1.97	EIF2AK3, ITPR1, CACNA1C, BID, GRIN2B, TNFRS11A, SNCA
	Glycolysis and Gluconeogenesis_Homo sapiens_WP534	0.025	-1.68	GAPDH, SLC2A3
	Glycolysis and Gluconeogenesis_Mus musculus_WP157	0.023	-1.67	ENO2, HK2 GAPDH, SLC2A3
	GPCRs, Class C Metabotropic pheromone_Mus musculus_WP327	0.017	-1.61	ENO2, HK2 GPRC5A GRM7
Reactome 2016	Na+/Cl- neurotransmitter transporters_Homo sapiens_R-HSA-442660	0.0004	-2.18	GRC5D SLC6A6, SLC6A13
	GABA synthesis, release, reuptake and degradation_Homo sapiens_R-HSA-888590	0.003	-2.14	SLC6A12, SLC6A11, SLC6A1 SLC6A13
	Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and	0.019	-2.48	SLC6A1 RET, ITPR1

MAPK_Homo sapiens_R-HSA-881907			GRIN2B
Glycolysis_Homo sapiens_R-HSA-70171	0.018	-2.22	GNB3 GAPDH, TPI1
			ENO2, HK2

O teste exato de *Fisher* e a correção para o mesmo foram utilizados para contrastar a lista de genes da AGD com as bases de dados do *Enrichr*. Valores de $p < 0,05$ e $z < -1,5$ foram considerados estatisticamente significativos.

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de análise da metformina cloridrato

Certificado de Análise

Produto: Metformina Cloridrato		P.M: 165,6 g/ mol
Fórmula Molecular: $C_4H_8ClN_2$		Lote Interno: 25181
Lote Original: METB/0114030038		Data Val: 01/2019
Data Fab: 03/2014		Procedência: Brasil
Origem: Índia		DCB: 05782
Fabricante: Abhilash Chemicals		CAS: 1115-70-4
Data de Emissão: 18/04/2016		

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aspecto físico	Pó cristais branco ou quase branco.	De acordo
Solubilidade	Livemente solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em acetona e cloroeto de metileno.	De acordo
Identificação	Faixa de fusão/ IR/ Reação de cloretos	De acordo
Faixa de fusão	222°C a 226°C	222,5°C
Aparência de solução	Limpida e incolor.	De acordo
Substancias relacionadas (HPLC)	Cyanoguanidina – Máximo 0,02%	0,007%
	Qualquer outras impurezas – Máximo 0,1%	0,055% (Imp. B)
	Total – Máximo 0,5%	0,091%
Metais pesados	Máximo 10 ppm	< 10 ppm
Perda por secagem	Máximo 0,5%	0,37%
Cinzas sulfatadas	Máximo 0,1%	0,03%
Doseamento Metformina	98,5% - 101,0% (Base anidra)	99,24%

Referência: BP2015.
Metodologia: BP2015.
Conservação: Conservar em recipiente hermético protegido de umidade, ao abrigo de luz e calor. Controle da Temperatura: 15 a 30°C. Controle da Umidade: Não mais que 70%.
Classificação: Farmacêutico.
Conclusão: Todos os resultados estão dentro das especificações.
OBS.: Transcrição do certificado do Fornecedor. Certificado Original se encontra à disposição de nossos clientes. Esse produto encontra-se na embalagem original do fornecedor. Não foi realizado o processo de fracionamento nas instalações da Embrafarma.
Resultado: (X) Aprovado



Dra. Amanda Dias Garrido
CRF – SP 62927
Supervisora do Controle de Qualidade



Dra. Juliana Ferreira Peçanha
CRF – SP 38413
Unidade da Qualidade